

Flávia Ferreira Pinto

**CIRCOVÍRUS SUÍNO 2: VIREMIA, ELIMINAÇÃO E PERFIL
SOROLÓGICO EM GRANJAS COM E SEM SINAIS CLÍNICOS DA
SÍNDROME DA REFUGAGEM MULTISSISTÊMICA (SRM)**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.**

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa Dr.^a Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte
UFMG-Escola de Veterinária
2008**

Pinto, Flávia Ferreira, 1975-

P659c **Circovírus suíno 2 : viremia, eliminação e perfil sorológico em granjas com e sem sinais clínicos da síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) / Flávia Ferreira Pinto. – 2008.**

83 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Viroses em animais – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96

Tese defendida e aprovada em 29 de fevereiro de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Zélia Inês Portela Lobato
Orientadora



Profa. Adriana Cortez



Prof. José Lúcio dos Santos



Prof. Marcos Bryan Heinemann



Prof. Israel José da Silva

Agradecimentos

À professora Zélia Inês Portela Lobato pelos valiosos ensinamentos, confiança na realização desse projeto, atenção, paciência especialmente nas grandes dificuldades, grande contribuição para o enriquecimento de minha formação acadêmica e profissional e competente orientação durante todo projeto.

Aos professores Edel Figueiredo Barbosa e Roberto Guedes pela co-orientação, por terem auxiliado nas análises laboratoriais realizadas nos laboratórios de Microbiologia e Patologia Veterinária, pelo apoio e pelas sugestões que contribuíram em grande parte para a realização desse projeto.

Aos senhores proprietários das granjas, pela paciência apresentada com nossa equipe durante a realização de um projeto envolvendo um número grande de coletas e de animais, por disponibilizarem suas propriedades para o desenvolvimento do experimento.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realização do meu curso de pós-graduação.

A todos os professores que contribuíram com suas experiência teórica e prática para minha formação acadêmica durante o doutorado.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia Animal, Laboratório de Patologia Clínica e Microbiologia veterinária pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente a, Priscila, Marcos, Tulha, Fábila e Grazielle pela amizade, apoio e pela participação constante nas coletas e ensaios laboratoriais.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

A minha mãe, Maria Helena Ferreira Pinto, razão da realização desse trabalho, pelo apoio diário, presença, grande amor e por acreditar nos meus propósitos.

A todos que de alguma forma participaram para a realização desse trabalho

SUMÁRIO

	ABREVIATURAS	11
	RESUMO	12
	ABSTRACT	13
1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	14

CAPÍTULO 1

3.	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1.	CLASSIFICAÇÃO E PROPRIEDADES	14
3.2.	HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO	15
3.3.	TRANSMISSÃO	16
3.4.	PATOGENIA	18
3.4.1.	Células alvo e distribuição celular do CVS-2	18
3.4.2.	Alterações em tecido linfóides	18
3.5.	RESPOSTA IMUNE	19
3.6.	APRESENTAÇÕES CLÍNICAS, ACHADOS DE NECROPSIA E LESÕES MICROSCÓPICAS	19
3.6.1.	Síndrome da refugagem multissistêmica (SRM)	20
3.6.2.	Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)	20
3.6.3.	Falhas reprodutivas	21
3.6.4.	Doenças do complexo respiratório dos suínos (DCRS)	21
3.6.5.	Tremor congênito	21
3.6.6.	Enterites	21
3.7.	ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS INFECÇÕES	22
3.8.	DIAGNÓSTICO	22
3.8.1.	Síndrome da refugagem multissistêmica (SRM)	22
3.8.2.	Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)	23
3.8.3.	Falhas reprodutivas	23
3.8.4.	CVS-2 associado a casos de pneumonia	23
3.8.5.	Enterites	23
3.8.6.	Técnicas utilizadas para o diagnóstico	23
3.9.	MEDIDAS DE CONTROLE DA CIRCOVIROSE SUÍNA	24

CAPÍTULO 2

PERFIL SOROLÓGICO, VIREMIA E EXCREÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (CVS-2) EM ANIMAIS NATURALMENTE INFECTADOS PERTENCENTES A GRANJAS COM OU SEM A CIRCOVIROSE SUÍNA

	RESUMO	27
	ABSTRACT	27
1.	INTRODUÇÃO	28
2.	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS GRANJAS ESTUDADAS	28
2.2.	ANIMAIS ESTUDADOS	29
2.3.	MATERIAL COLETADO	29

2.3.1	Suabes	29
2.3.2.	Sangue e Soro	29
2.4.	ANÁLISE LABORATORIAL	30
2.4.1	Suabes nasais e retais	30
2.4.2	Sangue	30
2.4.3.	Soro	30
2.5.	EXTRAÇÃO DE DNA	30
2.5.1.	Amostras de suabes	30
2.5.2	Amostras de sangue total	30
2.6.	TESTE DE PCR	30
2.7.	TESTE DE IMUNOPEROXIDASE INDIRETA EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC)	31
2.8.	ACOMPANHAMENTO DOS DADOS ZOOTÉCNICOS, CARACTERIZAÇÃO DO MANEJO E LEVANTAMENTO DE FATORES DE RISCO A MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA CIRCOVIROSE SUÍNA	31
2.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3.	RESULTADOS	31
3.1.	VIREMIA, PERFIL SOROLÓGICO E CIRCULAÇÃO DO CVS-2 ...	31
3.2.	ACOMPANHAMENTO DE ÍNDICES ZOOTÉCNICOS, CARACTERIZAÇÃO DO MANEJO E LEVANTAMENTO DE FATORES DE RISCO A MANIFESTAÇÃO DA CIRCOVIROSE SUÍNA	32
4.	DISCUSSÃO	40
5.	CONCLUSÕES	44

CAPÍTULO 3

ESTUDO DO PERFIL SOROLÓGICO, VIREMIA E EXCREÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (CVS-2) EM GRANJAS COM E SEM A SÍNDROME DA REFUGAGEM MULTISSISTÊMICA (SRM)

	RESUMO	44
	ABSTRACT	44
1.	INTRODUÇÃO	45
2.	MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1.	GRANJAS SELECIONADAS	46
2.2.	ANIMAIS ESTUDADOS	46
2.3.	AMOSTRAS COLETADAS	46
2.3.1	Tecidos	46
2.4.	ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS	46
2.4.1.	Tecidos	46
2.5.	ACOMPANHAMENTO DOS DADOS ZOOTÉCNICOS, CARACTERIZAÇÃO DO MANEJO E LEVANTAMENTO DE FATORES DE RISCO A MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA CIRCOVIROSE SUÍNA	47
2.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
3.	RESULTADOS	47
3.1.	VIREMIA, PERFIL SOROLÓGICO E CIRCULAÇÃO DO CVS-2 ...	48
3.2.	ACOMPANHAMENTO DE ÍNDICES ZOOTÉCNICOS, CARACTERIZAÇÃO DO MANEJO E LEVANTAMENTO DE FATORES DE RISCO A MANIFESTAÇÃO DA CIRCOVIROSE	

	SUÍNA	48
4.	DISCUSSÃO	56
5.	CONCLUSÕES	58

CAPÍTULO 4

ESTUDO DA EXCREÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (CVS-2) NO SÊMEN DE SUÍNOS

	RESUMO	59
	ABSTRACT	59
1.	INTRODUÇÃO	59
2.	MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1.	ANIMAIS ESTUDADOS	60
2.2.	MATERIAL COLETADO	60
2.3.	ANÁLISE LABORATORIAL	60
2.3.1.	Obtenção do plasma seminal	60
2.3.2.	PCR	61
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.	CONCLUSÕES	63
5.	CONCLUSÕES GERAIS	63
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXO 1 (TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS COLETADAS NAS GRANJAS)	77
	ANEXO 2 (QUESTIONÁRIO)	79
	ANEXO 3 (AVALIAÇÃO DE MANEJO E FATORES PREDISPONETES)	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Resultados da PCR de amostras de suabes, sangue e presença de animais soropositivos para o CVS-2, determinado pela IPMC, nas Granjas 1 (SRM-) e 2(SRM+)	33
Tabela 2	Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 1(SRM-)	39
Tabela 3	Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 2(SRM+)	39
Tabela 4	Fatores de risco para a manifestação da circovirose suína em granjas sem (G1) e com (G2) sinais clínicos da síndrome da refugagem multisistêmica	40

CAPÍTULO 3

Tabela 5	Comparação entre os resultados obtidos da viremia, eliminação do CVS-2 em suabes e perfil sorológico das G1(SRM-) e G2(SRM+).	47
Tabela 6	Resultados da PCR de amostras de suabes, sangue e presença de animais soropositivos para o CVS-2, determinado pela IPMC, obtidos	

	no acompanhamento de 35 leitões por todo o ciclo de produção nas Granjas 1(SRM-) e 2(SRM+)	49
Tabela 7	Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 1(SRM+)	55
Tabela 8	Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 2(SRM+)	55
Tabela 9	Fatores de risco para a manifestação da circovirose suína em granjas sem (G1) e com (G2) sinais clínicos da síndrome da refugagem multisistêmica	56
CAPÍTULO 4		
Tabela 10	Resultado da PCR em amostras de sêmen, coletadas de machos reprodutores da Granja (P1)	62
Tabela 11	Resultado da PCR em amostras de sêmen, coletadas de machos reprodutores alojados em central de inseminação (P2).	62

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1	Distribuição dos títulos de anticorpos contra CVS-2, em amostras de soro coletadas de animais de diferentes categorias nas Granjas 1(SRM-), e 2(SRM+).	35
Figura 2	Percentual de amostras PCR positivas em suabes e sangue e média dos resultados sorológicos de animais em diferentes categorias nas Granjas G1(SRM-) e G2(SRM+)	37

CAPÍTULO 3

Figura 3	Distribuição dos títulos de anticorpos contra CVS-2, em amostras de soro coletadas de animais de diferentes categorias nas Granjas 1(SRM-), e 2(SRM+).	51
Figura 4	Percentual de amostras PCR positivas em suabes, sangue e média dos resultados sorológicos de animais em diferentes categorias nas Granjas G1(SRM-) e G2(SRM+)	53

ABREVIATURAS

CNPSA - Centro nacional de Pesquisas de Suínos e Aves

CPo - circovírus dos pombos

CVS - Circovírus suíno

DACVS - doenças associadas ao circovírus suíno

DCRS - doenças do complexo respiratório suíno

EDTA - ácido etilenodiaminoacético

HHPS - Hank's-Hepes-Penicilina-Estreptomicina

IPMC - imunoperoxidase em monocamadas de células

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MEM - meio Eagle modificado

ORF - região de abertura para leitura

PCR - reação em cadeia da polimerase

PVS - parvovirus suíno

SDNS - síndrome da dermatite e nefropatia suína

SFB - soro fetal bovino

SCS - síndrome da circovirose suína

SRM - síndrome da refugagem multissistêmica

SPF - livre de patógeno específico

SRRS - síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos

VDPBP - vírus da doença das penas e bico dos psitacídeos

VGA - vírus da anemia das galinhas

VIS - vírus da influenza suína

TBE - tris borato ácido etilenodiaminoacético

TE - tris ácido etilenodiaminoacético

RESUMO

Foi realizado o estudo do perfil sorológico (PS), viremia e eliminação do circovírus suíno tipo 2 (CVS-2) em granjas com e sem a manifestação clínica da síndrome da refugagem multissistêmica (SRM). O trabalho foi dividido em três etapas. Na primeira, foram amostradas 40 matrizes e 40 leitões de maternidade, na creche, recria e terminação para estabelecimento da distribuição e PS na granja. Na segunda etapa foi realizado um estudo com 35 leitões acompanhados da maternidade ao abate para estudo da cinética da eliminação viral e curva de títulos de anticorpos. Na terceira etapa foi realizado o acompanhamento da eliminação do CVS-2 em machos reprodutores por dois meses. As amostras de suabes nasais e retais, sangue, sêmem e tecidos de linfonodos, rim, fígado e pulmão coletadas foram submetidas à técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa do DNA do CVS-2. As amostras de soro foram testadas para presença de anticorpos anti-CVS pelo teste de imunoperoxidase indireta em monocamada de células (IPMC). A análise dos resultados nos dois primeiros trabalhos mostrou que a detecção do DNA foi mais freqüente em amostras de sangue e suabes de suínos provenientes de granja com sinais clínicos da SRM podendo ser indicativo de maior circulação viral. O perfil sorológico de granjas com e sem a manifestação da SRM apresentou diferenças, principalmente em relação à duração da imunidade passiva. No segundo trabalho verificou-se que a queda dos títulos de anticorpos anti-CVS-2 coincide com aumento do número de animais virêmicos e maior eliminação do vírus. No terceiro trabalho, o CVS-2 foi intermitentemente liberado no sêmen dos machos pertencentes aos dois sistemas de produção por um período de até dois meses, no qual ocorreu o término do trabalho. Os resultados obtidos comprovaram que o CVS-2 encontra-se amplamente disseminado nas granjas podendo ser excretado, independente da manifestação da SRM. Baixos títulos de anticorpos parecem ser importantes para o aparecimento de sinais clínicos e favorecem o aumento do número de animais virêmicos e eliminação do vírus.

Palavras chave: Circovírus suíno 2, PCR, IPMC, perfil sorológico, viremia, eliminação.

ABSTRACT

PCV-2 serology, viremia and shedding were studied in pigs from herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in three different experiments. In the first study, a comparative PCV-2 serology, viremia and shedding was evaluated in two herds using swabs, serum and blood samples from 40 pigs at different ages. In the second study, PCV-2 viremia, nasal and fecal shedding and seroprofile were evaluated in 35 animals at 8 to 19, 30 to 35, 56 to 70, 85 to 100 and 150 days of age. In the third, study, the presence of PCV-2 DNA was tested in boar semen and PCV-2 shedding was demonstrated in naturally infected boars. Swabs, blood, tissues and semen were evaluated for the presence of nucleic acid of PCV2 by polymerase chain reaction (PCR). The presence of serum antibodies specific to PCV-2 was tested by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). PCV-2 DNA was more frequently detected in swabs samples from pigs of herd with PMWS, which may indicate a high PCV-2 circulation. There are differences in the serologic profile of herds with and without PMWS, especially concerning maternal antibodies duration. In the second study, it was demonstrated that the decrease of antibodies was concomitant with increase of the number of viremic animals and more shedding. The results of the third study indicated that PCV-2 virus may be shed intermittently in semen of naturally infected boars from two different herds for a period of two months. In conclusion, PCV-2 was widely distributed in pigs of different ages from herds with and without PMWS. It seems that low antibodies levels influence the occurrence of disease, viremia and PCV-2 shedding.

Keywords: Porcine circovirus 2, PCR, IPMA, serologic profiles, viremia, shedding

1. INTRODUÇÃO

A produção de suínos vem passando por uma intensa modernização nos últimos anos, caracterizada por uma melhora na nutrição, rápida evolução genética, investimentos em melhorias nas instalações, sistema de manejo e sanidade. Esse fato, associado à instabilidade de preços da carne suína nos últimos anos fez com que os animais passassem a ser criados de forma mais intensiva com objetivo de aumentar a produtividade e obtenção de maiores lucros. O aumento do número de animais por metro quadrado e a mistura de leitões com diferentes *status* imunológico levou os plantéis a se tornarem mais susceptíveis a uma série de enfermidades, dentre elas a síndrome da refugagem multissistêmica (SRM). A doença vem assumindo grande importância na suinocultura mundial devido à elevação imposta no custo de produção, relacionada às altas taxas de mortalidades, diminuição do ganho de peso e piora na conversão alimentar.

A SRM tem sido considerada por muitos pesquisadores como um dos principais problemas sanitários dos países produtores de suínos. Um estudo feito por Cavalcante (2002) registrou perdas parciais ocorridas com um surto da doença no Paraná em uma granja de 1.200 matrizes. Constatou-se um prejuízo de R\$10.000,00 por mês com refugagem de leitões, queda de 5,0 Kg no peso médio ao abate, mortalidade de 3,5 a 10% na creche e uma diminuição na produção de quilo de carne/matriz/ano.

Nos últimos anos várias pesquisas têm sido desenvolvidas sobre a infecção com o CVS-2 e manifestação da SRM. Entretanto, a epidemiologia da doença ainda permanece pouco entendida. O fato de existir elevado número de animais soropositivos em granjas que apresentam ou não a SRM e as doenças associadas ao circovírus suíno (DACVS) permanece desconhecido. Ainda há dúvidas sobre a circulação do vírus em cada fase do

ciclo de produção e quais seriam os fatores de risco que poderiam estar contribuindo para manifestação clínica da SRM. Esses questionamentos levam a necessidade de realização de novas pesquisas visando esclarecer fatores epidemiológicos e da patogênese da doença. Esses estudos podem contribuir para adoção de medidas de manejo mais eficientes na prevenção e controle da doença e estabelecimento de um correto programa de vacinação.

2. OBJETIVOS

Esse estudo foi dividido em três partes, com os seguintes objetivos:

1- Estudar a excreção do CVS-2 e o perfil de títulos de anticorpos em animais naturalmente infectados, pertencentes às várias fases do ciclo de produção de suínos (gestação, maternidade, creche, recria e terminação) e comparar os índices zootécnicos e medidas de manejo adotadas nas granjas com e sem sinais clínicos da SRM.

2- Acompanhar a curva de anticorpos, viremia e eliminação do CVS-2 em leitões a partir da maternidade, por todo o ciclo de produção, e comparar os dados obtidos com índices zootécnicos e as medidas de manejo adotadas nas granjas.

3- Identificar, por um período de dois meses, a presença do DNA do CVS-2 no sêmen de machos utilizados na técnica de inseminação artificial.

CAPÍTULO 1

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Classificação e propriedades

Circovírus suíno (CVS) é formado por um genoma circular covalentemente ligado em

sua extremidade, constituído de uma única fita senso negativo de DNA, com aproximadamente 1760 bases, coberto por um capsídeo icosaédrico (Allan e Ellis, 2000).

O vírus foi classificado dentro da família *Circoviridae*, composta pelos gêneros *Gyrovirus*, onde está incluído o vírus da anemia das galinhas (VGA) e pelo gênero *Circovirus* onde estão incluídos o vírus da doença das penas e bico dos psitacídeos (VDPBP), o circovírus dos pombos (CPo) e o circovírus suíno (CVS) (Tood, 2000).

Dois tipos de circovírus suíno foram descritos e, subsequentemente, nomeados de circovírus suíno 1 (CVS-1) e circovírus suíno 2 (CVS-2) (Meehan et al., 1998). O CVS-1 e o CVS-2 apresentam uma similaridade entre a sequência de DNA total variando de 68 a 76% (Meehan et al., 1998; Fenaux et al., 2000). Isolados de CVS-2 de diferentes regiões geográficas ou de suínos com diferentes síndromes apresentaram uma similaridade superior a 94,6 a 99% na sequência de nucleotídeos (Hamel et al., 1998, Fenaux et al., 2000).

O CVS-1 contém sete regiões de abertura de leitura (ORFs), que codificam proteínas que excedem 5 KDa, e o CVS-2 contém 11 (ORF's) codificando proteínas de 2 a 36 KDa (Hamel et al., 2000). As duas principais ORFs são a ORF1 e a ORF2 (Meehan et al., 2001). A região ORF 1 esta associada a produção de proteínas de replicação (Hamel et al., 1998) e a ORF 2 caracteriza-se por codificar a principal proteína do capsídeo que induz a formação de anticorpos neutralizantes (Hamel et al., 1998; Fenaux et al., 2004), podendo tomar parte também em eventos tardios da replicação viral (Nawagitgul et al., 2000). Entre CVS-1 e CVS-2, ORF1 apresenta maior identidade que ORF2 com 83% na sequência total de nucleotídeos e 86% na sequência total de aminoácidos. Por outro lado, a ORF2 é mais variável, apresentando

uma similaridade entre a sequência total de nucleotídeos de 67% e 65% entre aminoácidos (Morozov et al., 1998). Ambos os tipos de CVS compartilham pelo menos um antígeno, que podem ser distinguidos utilizando-se a técnica de PCR, hibridização *in situ* ou por anticorpos monoclonais (Chae, 2004).

Estudos recentes de genotipagem mostraram haver dois genótipos de CVS-2 (1 e 2). Grau-Roma et al. (2007) analisaram 87 sequências da região ORF2 do CVS-2, obtida do DNA viral provenientes de animais com diferentes condições clínicas, provenientes de granjas com e sem a manifestação da SRM. Os autores verificaram que em animais provenientes de granjas com sinais clínicos foi isolado o genótipo 1 e em animais oriundos de granjas sem sinais clínicos foi encontrado o genótipo 2, sendo o genótipo 1 considerado mais patogênico. Em surtos mais recentes da SRM na America do Norte, foi identificado, utilizando a técnica de análise de restrição de fragmentos, um novo genótipo de CVS-2, denominado CVS-2b, causador de altas taxas de mortalidade (Harding et al., 2007). No Brasil, Castro et al. (2007), sequenciaram amostras oriundas do Estado de Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina e verificaram que as mesmas pertenciam a dois grandes conglomerados distintos. Nesse trabalho não foi possível relacionar as diferenças genéticas com os sinais clínicos apresentados pelos animais.

3.2. Histórico e distribuição

O CVS-1 foi identificado pela primeira vez no Canadá, em 1974, como um contaminante persistente de linhas celulares de rim suíno (PK-15 ATCC-CCL33) (Tischer et al., 1974). Este vírus foi considerado não patogênico, pois nenhuma doença foi relacionada à presença desse agente (Tischer et al., 1986; Allan et al., 1995). Já em 1991, no Canadá, foi relatada a primeira descrição da SRM, uma doença

até então considerada nova e que foi associada por Clark (1997) a infecção por um novo circovírus nomeado de circovírus suíno 2.

Em 1996, a SRM foi associada à presença do CVS-2 nos Estados Unidos e na região da Bretanha na França (Segalés e Domingo, 2002). Desde então, casos da síndrome foram diagnosticados em plantéis da Espanha (Segalés et al., 1997), Reino Unido (Kennedy et al., 1998), Irlanda (Spillane et al., 1998), Dinamarca (Allan et al., 1999), Japão (Onuki et al., 1999), Taiwan (Allan e Ellis, 2000), Coreia (Choi et al., 2000), Hungria (Kiss et al., 2000), Itália (Martelli et al., 2000), Alemanha, Austrália, Lituânia e Bélgica (Ohlinger et al., 2000), Holanda (Wellenberg et al., 2000), Suíça (Borel et al., 2001), México (Trujano et al., 2001), Filipinas (Maldonado et al., 2004), Bulgária (Motovski e Segalés, 2004), Nova Zelândia (Garkayenko et al., 2005) e Romênia (Cadar et al., 2007). Atualmente, sabe-se que o CVS-2 encontra-se amplamente distribuído no mundo, podendo ser encontrado em animais provenientes de granjas que apresentam ou não sinais clínicos da doença (Rodríguez-Arriola et al., 2000; Laroche et al., 2003; Rose et al., 2003) e, a maioria das idades encontra-se sorologicamente positiva (McKeown et al., 2005).

No Brasil, a primeira identificação e tipificação molecular do vírus, acompanhada pela descrição da manifestação clínica da síndrome foi realizada por Zanella et al. (2001), em um trabalho realizado no Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves (CNPSA) da Embrapa em Concórdia, Santa Catarina. Em 2002 casos da síndrome foram diagnosticados em Goiás, por Sobestiansky et al. (2002). Em 2003 o vírus foi diagnosticado em Minas Gerais por Pinto et al. (2003), em São Paulo por Castro et al. (2003) e no Rio Grande do Sul por Barcellos e Pescador (2003). Em 2005, o vírus foi detectado novamente no estado de Minas Gerais por Barbosa (2005) em 12 rebanhos.

Em 2007, Lobato et al. estudaram o perfil sorológico de quatro granjas (três com e uma sem sinais clínicos da SRM), uma das granjas localizava-se no estado do Paraná, uma em São Paulo e duas no estado de Minas Gerais. O número de descrições da circovirose suína em rebanhos brasileiros vem crescendo nos últimos anos e, atualmente, o vírus se encontra disseminado no plantel nacional.

3.3. Transmissão

O CVS-2 foi detectado em amostras de suabes nasais, retais, tonsilares (Caprioli et al., 2006) e oculares, na orofaringe, secreção bronquial, urina e em fezes (Krakowka et al., 2000; Bolin et al. 2001; Shibata et al., 2003; Sibila et al., 2004; Segalés et al., 2005) de animais que apresentam ou não sinais clínicos da SRM, sendo que animais sadios apresentam menores quantidades do vírus que animais doentes (Segalés et al., 2007). Estes trabalhos indicam que o vírus pode ser excretado por todas as vias de eliminação estudadas.

Secreções nasais ou aerossóis têm sido sugeridos como potencial via de transmissão horizontal, visto que esta foi utilizada com êxito em infecções experimentais realizadas por alguns pesquisadores. Krakowka et al. (2000) inocularam, por via intranasal, 26 leitões gnotobióticos, com CVS-1, CVS-2 e PVS e observaram que suínos infectados com CVS-2 e PVS desenvolveram sinais clínicos e lesões histopatológicas características da SRM. Shibata et al. (2003) ao realizarem a infecção experimental, via intranasal, de 16 suínos SPF, detectaram o DNA viral em suabes orofaríngeano, nasal e de fezes a partir do primeiro dia pós-inoculação em 15 animais. Caprioli et al. (2006) infectando 12 suínos SPF pela via oronasal, verificaram que quatro animais apresentavam o DNA do CVS-2 nos tecidos e lesões histológicas compatíveis com a SRM. Burch (2007) mostrou que suínos pertencentes a rebanhos com e sem sinais

clínicos da SRM apresentavam o DNA do CVS-2 em amostras de suabes nasais a partir da primeira semana de vida e no soro e fezes a partir de 9 semanas. Esses dados sugerem a transmissão do vírus da porca para os leitões e mostra que a via nasal pode ser a mais importante rota de transmissão do CVS-2.

A eficiência da transmissão horizontal na disseminação do CVS-2 foi comprovada por Kristensen et al. (2006) ao observarem a infecção por contato direto entre suínos infectados e susceptíveis pela mistura dos mesmos em um único lote. Jorsal et al. (2006) verificaram que todos os 14 animais sadios colocados em contato direto ou indireto com animais de um rebanho com sinais clínicos da SRM desenvolveram a doença.

A transmissão vertical do CVS-2 tem sido sugerida por vários autores. West et al. (1999) e O'Connor et al. (2001) isolaram o CVS-2 em fetos abortados e recém nascidos. A detecção do vírus em leitões recém-nascidos foi realizada por Bogdan et al. (2001), podendo estar relacionado não somente com falhas reprodutivas, mas também como o desenvolvimento da doença multissistêmica posteriormente na vida do animal (Segalés et al., 2007). Sanchez et al. (2001) ao inocularem fetos em útero aos 57, 75 e 92 dias de gestação, verificaram a ocorrência de uma maior replicação do CVS-2 em fetos inoculados aos 57 dias quando comparado aos de 75 e 92 dias de gestação. Os mesmos autores também observaram que fetos inoculados aos 75 e 92 dias de gestação não apresentaram lesões histopatológicas, quantidades elevadas do vírus no coração e anticorpos contra o CVS-2 aos 21 dias pós-inoculação enquanto fetos inoculados aos 57 dias apresentaram uma miocardite que resultou em falha cardíaca, podendo tornar-se mumificado. Jonhson et al. (2002), ao realizarem infecção experimental de fetos, no terço final de gestação, com o CVS-2, observaram nascimento de natimortos, fetos

parcialmente mumificados e de leitões fracos e normais. Estudos realizados por Pensaert et al. (2004) e Nauwynck et al. (2007) mostraram que embriões podem ser infectados pelo CVS-2 em estágios iniciais de desenvolvimento, antes da formação da zona pelúcida. Os últimos autores observaram que embriões suínos são mais susceptíveis a uma infecção pelo CVS-2 em estágios mais avançados de desenvolvimento (15% no estágio de mórula, 50% na fase inicial de blastocisto e 100% na fase final de blastocisto sem a zona pelúcida). A transmissão vertical também foi descrita por Shibata et al. (2006) ao demonstrarem a presença do CVS-2 em duas amostras de colostro coletadas de 33 porcas sugerindo a transmissão oral via ingestão de colostro. Embora haja fortes evidências da transmissão vertical, não se sabe como ela acontece ou se é um evento freqüente.

A transmissão transplacentária foi detectada em trabalho realizado por Park et al. (2005) ao infectarem fêmeas pela via intranasal. Por outro lado, Segalés et al. (2007) citaram que, Cariolet et al. (2001), ao infectarem fêmeas SPF pela via intramuscular, observaram sinais clínicos da SRM, porém o CVS-2 não foi encontrado nos tecidos dos leitões ao nascimento.

A transmissão do vírus via sêmen foi sugerida uma vez que o CVS-2 foi detectado em amostras de sêmen de machos infectados naturalmente ou experimentalmente. Larochelle et al. (2000), ao infectarem experimentalmente quatro machos detectaram o DNA do CVS-2 no sêmen, de forma intermitentemente, do 5º ao 47º dia pós-infecção, no qual ocorreu o término do experimento. Kim et al. (2001) ao pesquisarem o CVS-2 nas frações do sêmen coletadas de 28 animais verificaram que todas as amostras de plasma seminal apresentavam resultado positivo na PCR. Reicks et al. (2007) ao analisarem o sêmen coletado de 240 animais, detectaram o DNA do CVS-2 em 61 amostras, com predomínio

de animais positivos entre 9 a 12 meses de idade. Rose et al. (2007) ao utilizarem sêmen infectado com CVS-2 para inseminação artificial de porcas SPF soropositivas para CVS-2 observaram a infecção de fetos durante a gestação, assim como a manifestação de desordens reprodutivas (fetos mumificados). Entretanto, a transmissão do CVS por esta via, ainda não está totalmente comprovada.

3.4. Patogenia

3.4.1. Células alvo e distribuição celular do CVS-2

O DNA ou antígeno do CVS-2 pode ser detectado numa ampla variedade de células. O DNA viral foi detectado principalmente no citoplasma de histiócitos, células gigantes multinucleadas e outras células da linhagem monócitos/macrófagos tais como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas foliculares de tecidos linfóides (Rossel et al, 1999; Allan e Ellis, 2000). Esporadicamente, também é possível encontrar o vírus no citoplasma de células epiteliais respiratórias e do rim, células endoteliais vasculares, linfócitos, células ductulares e acinares pancreáticas e no núcleo de monócitos/macrófagos, células musculares, hepatócitos e enterócitos (McNeilly et al., 1999; Rossel et al, 1999 e 2000). Com o progresso da infecção via plasma e células associadas a viremia, principalmente monócitos, o conteúdo viral dentro dos tecidos linfóides diminui e a infecção torna-se sistemicamente distribuída aos tecidos não linfóides com a resposta granulomatosa inflamatória nesses órgãos resultando em doença fatal (Krakowka et al., 2002).

Sabe-se que o CVS-2 não carrega sua própria polimerase e sua replicação depende da polimerase celular presente no núcleo das células durante a fase S do ciclo celular (Tischer et al, 1986). Pesquisas mostram que

o tropismo celular do CVS-2 parece mudar com a idade do suíno. Sánchez et al. (2003) observaram que fetos inoculados aos 57 dias de gestação apresentam altas quantidades de vírus em cardiomiócitos (com alta atividade mitótica), sendo também encontrado em macrófagos e hepatócitos. Em leitões infectados no primeiro dia de nascimento, o vírus pode ser encontrado principalmente em macrófagos e outros tipos celulares. Linfócitos T também são encontrados infectados quando suínos são inoculados depois do nascimento (Rossel et al, 1999, Darwich et al, 2004).

3.4.2. Alterações em tecido linfóides

A depleção linfóide em conjunto com infiltração histiocítica é a principal característica de SRM (Kiupel et al., 1998; Rossel et al., 1999, Chianini et al., 2003). Nos linfonodos a principal alteração celular consiste na diminuição de células dendríticas foliculares, células interdigitais e linfócitos interfoliculares (Sarli et al., 2001). Também foi observada uma redução ou perda completa de células B e células CD45 (Chianini et al., 2003). Depleções em áreas associadas a células B nos linfonodos têm sido relacionadas a apoptose induzida pelo vírus. A taxa de depleção linfóide parece estar relacionada ao estágio da infecção. Quanto maior o avanço da infecção maior a depleção linfóide em áreas foliculares (Rossel et al. 1999; Chianini et al. 2003; Darwich et al. 2003). Todos esses eventos levam a crer na existência de uma condição de imunossupressão. Mais especificamente, o vírus provoca imunossupressão por interferir com a apresentação de antígenos, pela indução de apoptose principalmente de células B (Allan e Ellis, 2000), ativação das citocinas, inibição da atividade de componentes do complemento (Segalés et al., 2001).

Segalés et al. (2001) avaliaram alterações na população de leucócitos periféricos em suínos infectados com SRM e demonstraram

haver uma significativa diminuição do número de linfócitos T CD4+ e um significativo aumento de granulócitos. Células B também mostraram drástica redução, resultado este compatível com a depleção linfóide ocorrida nas áreas B. Em outro estudo, Darwich et al. (2002) observaram uma diminuição do número de linfócitos T, principalmente CD8+ e CD4+/CD8+ (Segalés e Mateu, 2006) e linfócitos B e que a quantidade do CVS em tecidos linfóides estava relacionada com a taxa de depleção destes tecidos. A imunossupressão associada com a infecção por CVS-2 provavelmente leva a alta incidência de outras infecções, o que sugere uma inabilidade destes animais em montar uma resposta imune efetiva para outros microrganismos, fato esse observado em rebanhos infectados (Krakowka et al., 2002).

3.5. Resposta imune

Um modelo típico de infecção viral, com ativa soroconversão durante a fase de crescimento tem sido descrito para o CVS-2. Estudos recentes indicam que leitões perdem a imunidade materna entre três a nove semanas de idade (Rodríguez-Arrijoja, 2002) e apresentam um reaparecimento dos anticorpos por volta das 13 a 15 semanas, mantendo os títulos a níveis altos até a idade de abate (Quintana et al., 2001; Rodríguez-Arrijoja et al., 2002). Entretanto, Vanderputte et al. (2001) e Vigre et al. (2003) mostraram que o decaimento da imunidade materna pode variar entre duas semanas a vários meses e os anticorpos colostrais podem ser parcialmente protetores. Porém, ainda que aconteça uma resposta imunológica humoral, uma percentagem de suínos de recria e terminação é eficiente na eliminação da infecção (Rodríguez-Arrijoja, 2002; Segalés e Domingo, 2002).

Uma leucopenia associada com o desenvolvimento da SRM pode ser detectada antes do aparecimento de sinais clínicos (Nielsen et al., 2003) pela diminuição de

linfócitos B, seguidos pelos linfócitos T. Entretanto, animais com sintomas clínicos raramente apresentam o DNA viral nessas células (Darwich et al., 2004). A associação do vírus com os linfócitos parece ser esporádica e diminui com a idade podendo ser devido a remoção de células vírus positivas decorrentes da linfopenia relacionada às DACVS (McCullough et al., 2007).

O vírus não induz morte de células dendríticas e, não há evidências de uma transmissão de células dendríticas para linfócitos, mesmo ativadas (Vincent et al., 2003). A associação do vírus com monócitos pode explicar a leucopenia devido a uma incorreta sinalização das células infectadas, ineficácia no processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos e interferência com a homeostase (Vincent et al., 2005). Em outros trabalhos as células dendríticas permanecem competentes e podem apresentar grandes quantidades de antígenos que escapam do endossoma (McCullough et al., 2007). As células dendríticas e macrófagos parecem tolerar o CVS-2 permanecendo inaparente ao sistema imune. Entretanto, sinais imunomodulatórios permanecem normais e as células reconhecem antígenos mediados por receptores “toll-like” (Vincent et al., 2005).

3.6. Apresentações clínicas, achados de necropsia e lesões microscópicas

O CVS-2 tem sido consistentemente detectado, por vários pesquisadores, em suínos portadores das doenças associadas ao circovírus suíno (DACVS) também conhecidas como síndrome da circovirose suína (SCS), que compreendem a síndrome da refugagem multisistêmica (SRM) (Chae, 2004) e a síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS) (Rossel, et al. 2000; Olvera et al., 2004). Outras condições relacionadas à infecção pelo vírus tais como uma miocardite fetal e falhas reprodutivas, doenças do complexo respiratório suíno que incluem uma pneumonia proliferativa e

necrosante e uma traqueíte necrosante, tremor congênito e uma enterite (Darwich et al., 2004) têm sido descritas.

3.6.1. *Síndrome da refugagem multisistêmica (SRM)*

A doença afeta principalmente animais de 5 a 15 semanas de idade, raramente apresentando sinais clínicos em animais lactentes e adultos (Allan e Ellis, 2000; Segalés e Domingo, 2002). Clinicamente a doença caracteriza-se por refugagem progressiva, baixa condição corporal, depressão, aumento dos linfonodos, edema generalizado, dispnéia, icterícia e palidez da pele, diarreia, úlcera gástrica, tosse, distúrbios do sistema nervoso e febre (Larochelle et al., 1999; Allan e Ellis, 2000; Tood, 2000; Darwich et al., 2004).

Macroscopicamente, pode ser observada uma linfadenopatia generalizada, pulmões não colapsados com áreas de consolidação nos lóbulos antero-ventrais e atrofia do timo. Menos freqüentemente, podem ser observadas hepatite atrofica e lesões nos rins (nefrite intersticial linfocitária e pielite) (Allan e Ellis 2000; Darwich et al., 2003, 2004). Ulceração na parte esofagiana do estômago tem sido descrita. Porém, segundo Allan e Ellis (2000), não está relacionada à ação direta do vírus sobre o tecido.

As lesões microscópicas consistem em variados graus de depleção linfóide, juntamente com uma infiltração de células gigantes multinucleadas e de monócitos/macrófagos (Chae, 2004). As lesões linfóides são observadas em quase todos os tecidos, incluindo linfonodos, tonsilas, placas de Peyer's, baço e timo. Em alguns casos, corpúsculos de inclusões intracitoplasmáticas basofílicas contendo material do CVS-2 podem ser encontrados em células da linhagem histiocítica (Rossel et al, 1999). Outros achados histológicos são: pneumonia intersticial linfocitária

multifocal, graus variados de hepatite, infiltração linfocítica ou linfocitocitária podem ser encontradas no interstício renal, atrofia das vilosidades intestinais com variada regeneração de células epiteliais glandulares ou da cripta (Rossel et al, 1999, 2000; Allan e Ellis, 2000).

3.6.2. *Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)*

É uma doença vascular de causa imunomediada que acomete leitões em crescimento com idade entre 12 a 14 semanas, podendo ser encontrada em leitões terminados com aproximadamente 150 dias ou mesmo fêmeas de reposição (Chae, 2005). Caracteriza-se clinicamente por lesões hemorrágicas multifocais na pele, edema subcutâneo, baixa condição corporal, progressiva perda de peso, dispnéia, taquipnéia e palidez de pele (White e Higging, 1993). As lesões são mais freqüentemente encontradas nos membros traseiros e abdômen, podendo se disseminar para o tórax, flanco e orelhas (Harding, 2004).

Macroscopicamente, observa-se a presença de máculas de coloração púrpura, bordas irregulares e pápulas que se coalescem na região do períneo, membros traseiros, dianteiros e no abdômen. Com o progresso da infecção, as lesões envolvem o tórax, flanco e orelhas (Ramos-Vara et al., 1997). Os rins se encontram aumentados de tamanho, pálidos e cobertos por uma hemorragia petequial, de aproximadamente 2 a 4 mm de diâmetro (Duran et al., 1997). As lesões microscópicas são caracterizadas por uma hipersensibilidade imunomediada do tipo 3, causada pela deposição de complexos imunes nos vasos e paredes de capilares glomerulares (Drolet et al., 1999). Observa-se uma glomerulonefrite fibrinonecrotica e uma vasculite necrosante severa (Duran et al., 1997; Choi e Chae, 2001; Choi et al., 2002). Nos linfonodos, podem ser encontradas depleção linfóide

com necrose de linfócitos nas regiões do córtex e paracórtex e presença de células gigantes multinucleadas (Choi e Chae, 2001).

3.6.3. Falhas reprodutivas

A associação do CVS-2 à falhas reprodutivas foi descrita no Canadá por Gauvreau e O'Connor (1999), West et al. (1999), O'Connor et al., (2001) respectivamente. Desordens similares foram descritas em Iowa e na Europa por Janke (2000) e Ohlinger et al. (2000), respectivamente. As granjas afetadas apresentaram casos de abortamento, aumento do número de natimortos e mumificados, apresentando quantidades variadas de antígenos em tecidos fetais e lesões cardíacas de leitões com quadro de miocardite. Pesquisas têm concluído que as doenças reprodutivas associada com o CVS-2 podem ser uma manifestação clínica, mais recente, causadas pelo vírus.

3.6.4. Doenças do complexo respiratório suíno (DCRS)

As doenças do complexo respiratório suíno são um problema na fase de crescimento com idade em torno de 16 a 22 semanas. Podem ser caracterizadas por menor desenvolvimento, aumento da conversão alimentar, letargia, anorexia, febre, tosse e dispnéia (Thacker, 2001). A pneumonia observada pode ser devido a uma combinação de agentes bacterianos e virais tais como CVS e síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (SRRS), vírus da influenza suína (VIS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida* (Halbur, 1998; Thacker, 2001). A identificação do CVS-2 em casos de uma pneumonia proliferativa necrosante por Ellis et al. (1999b) e a constante detecção do vírus em casos da DCRS, examinados na Coreia, sugerem sua participação direta no

desenvolvimento das doenças (Kim et al, 2003), embora também possa estar envolvido um sinergismo com outros patógenos causadores de doenças respiratórias. Em 50% dos casos diagnosticados do complexo respiratório apresentavam a participação do CVS-2 e do vírus causador da SRRS. Infecções experimentais utilizando os dois agentes induziram a lesões pulmonares e problemas respiratórios mais severos (Allan et al., 2000b).

3.6.5. Tremor congênito

O tremor congênito afeta animais lactentes, com sinais clínicos amplamente variáveis e caracterizados por tremores de intensidade média a severos. O número de leitões afetados pode ser considerável dentro de um rebanho. Tremores severos podem levar a morte durante a primeira semana de idade por inanição. Leitões com idade acima de uma semana podem se recuperar mas não acompanham o crescimento normal da leitegada. Os tremores são bilaterais e afetam a musculatura esquelética podendo se acentuar por estímulos externos tais como barulhos súbitos ou frio excessivo. São somente observadas lesões em casos severos de tremores com retardo da deposição de mielina na medula espinhal, porém não se tem demonstrado a presença do vírus em células deste tecido (Lukert, 1999). A associação do CVS-2 em casos de tremor congênito é controversa. Hines e Lukert (1994) foram os primeiros a descreverem essa associação e Stevenson et al. (2001), identificaram o ácido nucléico do CVS-2 no cérebro e medula espinhal de leitões afetados. Porém, estudos mais recentes, como o desenvolvido por Kennedy et al. (2003), não comprovam a hipótese do envolvimento do CVS-2 na doença.

3.6.6. Enterites

Quadros de uma enterite granulomatosa

podem ser observados em manifestações clínicas de circovirose suína. Os casos geralmente estão associados a uma taxa de morbidade que pode variar de 10 a 20% e mortalidade entre 50 a 60%. A doença ocorre em suínos com idade entre 40 e 70 dias e os sinais clínicos observados são uma diarreia que no início apresenta uma coloração amarelada que se torna bastante escurecida. Ocorre uma diminuição do crescimento dos animais e tratamento com antibióticos geralmente não apresenta eficiência. As lesões histopatológicas predominantes caracterizam-se por uma inflamação granulomatosa e depleção linfóide nas placas de Peyer localizadas por todo o intestino. Nenhuma outra lesão microscópica tem sido encontrada em outros órgãos (Chae, 2005).

3.7. Associação com outras infecções

Infecções com CVS-2 têm sido freqüentemente observada em combinação com outros agentes bacterianos e virais tais como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (SRRS), vírus da influenza suína, parvovirus suíno (PVS), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kim et al., 2002; Pallares et al., 2002), causando sinais clínicos e lesões mais severas que as apresentadas por animais infectados somente infectados com o CVS-2 (Allan et al., 2000b; Ellis et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Opriessnig et al., 2004). Infecções por *Lawsonia intracellularis* (Segalés et al., 2001) e *Cryptosporidium parvum* (Nuñez et al., 2003) foram descritas em casos de enterite granulomatosa causada pelo CVS-2.

Infecções onde o único agente detectado foi o CVS-2 somente foram encontradas em 15% dos casos onde ocorre a manifestação da SRM. Estas infecções podem muitas vezes dificultar o diagnóstico ou causar sinais clínicos e lesões mais severas (Allan

et al., 2000b; Ellis et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Opriessnig et al., 2004). A presença do CVS-2, encontrada em associação com outros agentes tem levado alguns autores a sugerir que uma variedade de agentes pode compartilhar um mecanismo comum e afetar o sistema imune, permitindo a progressão da infecção pelo CVS-2 em síndrome (Krakowka et al., 2001; Kim et al., 2003). Aumento da mortalidade devido a uma única ou múltipla infecção concorrente foi observado em suínos nas fases iniciais e finais de crescimento (Kim et al., 2002), contribuindo com um aumento de mortalidade de 1-2% a 10-25% quando outros fatores permanecem inalterados (Chae, 2004).

3.8. Diagnóstico

3.8.1. Síndrome da refugagem multissistêmica (SRM)

Para o diagnóstico de um animal com a SRM deve-se obedecer três critérios principais: 1) presença de sinais clínicos compatíveis; 2) presença de lesões microscópicas características; 3) detecção do CVS-2 nas lesões. O uso destes três critérios separadamente é insuficiente para o diagnóstico da síndrome (Sorden, 2000; Chae, 2004) já que o CVS-2 pode ser encontrado em animais com e sem sinais clínicos da SRM e uma infecção subclínica ocorre na maioria das granjas (Segalés e Domingo, 2002).

Segalés et al. (2003) observaram que em rebanhos com boas práticas de produção apresentavam índices de mortalidade baixos e pequeno número de animais refugos, devido a presença da SRM, doenças entéricas, falhas no manejo ou nutrição. E devido à necessidade de diferenciar entre um plantel com SRM de um diagnóstico individual de um suíno com a síndrome, estabeleceu no International Pig Veterinary Society, 2004, cinco critérios para o

diagnóstico de rebanho.

1) ocorrência de casos clínicos, caracterizados principalmente por perda de peso progressiva em elevado número de animais. Esse fato requer o levantamento do histórico da granja e comparação do número de animais refugos mês a mês; 2) aumento da taxa de mortalidade de no mínimo 5%, que a encontrada normalmente na granja. Muitas vezes, a avaliação da taxa de mortalidade deverá ser realizada por métodos estatísticos; 3) confirmação de casos individuais de SRM, através de uma amostragem estatisticamente significativa de animais do rebanho; 4) levantamento da presença e prevalência de patógenos que podem resultar no diagnóstico diferencial com a SRM; 5) obtenção de diagnóstico histopatológico positivo em pelo menos cinco animais do rebanho.

3.8.2. Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)

Casos da SDNS são esporádicos dentro de um rebanho, acometendo menos de 0,5% de um determinado grupo de animais. O diagnóstico é baseado na presença do CVS-2 dentro das lesões de pele, rim ou tecidos linfóides e presença de sinais clínicos compatíveis (Brito et al., 2002).

3.8.3. Falhas reprodutivas

O envolvimento do CVS-2 em casos de aborto e mumificação fetal pode ser confirmado pela presença de lesões histopatológicas caracterizadas por uma miocardite linfocitocitária fetal, e/ou uma fibrose do miocárdio e visualização de abundante quantidade de antígeno viral nas lesões (Kim et al., 2004).

3.8.4. CVS-2 associado a casos de pneumonia

Casos de pneumonia são comuns em leitões

infectados com o CVS-2. Porém, grande parte dos animais, também são co-infectados com outros agentes bacterianos oportunistas, como o *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou *Pasteurella multocida*. Para o diagnóstico da pneumonia associada ao CVS-2 deve-se encontrar na histopatologia uma pneumonia necrotizante e bronquiolite ulcerativa, bronquiolite obliterante fibrosa, inflamação e fibroplasia na lamina própria e em áreas peribronquiolares e inflamação granulomatosa no septo alveolar (Kim et al., 2003).

3.8.5. Enterites

O diagnóstico de uma infecção com CVS-2 associado a uma enterite granulomatosa pode ser realizado com base em três critérios: 1) presença de diarreia, 2) lesões microscópicas localizadas nas placas de Peyer, mas não nos linfonodos, 3) presença do CVS-2 nas lesões. Caso sejam observadas lesões microscópicas da SRM nos linfonodos, o caso deve ser diagnosticado como de SRM (Kim et al., 2004).

3.8.6. Técnicas utilizadas para o diagnóstico

A detecção do vírus pode ser realizada pelas técnicas de cultivo viral, PCR, imunistoquímica, hibridização *in situ* ou indiretamente pela detecção de anticorpos utilizando métodos sorológicos (Calsamiglia et al., 2002; Segalés e Domingo, 2002).

A imunistoquímica e a hibridização *in situ* são as técnicas mais utilizadas na rotina laboratorial para a detecção do CVS-2. Elas permitem localizar o vírus em infecções dos tecidos ou de células, fornecendo detalhes da arquitetura celular e tissular, de modo que, a presença do CVS-2 em lesões pode ser estudada em um mesmo campo (Choi et al.,

2000). Muito embora a utilização da hibridização *in situ* tenha, recentemente, se tornado importante ferramenta para o auxílio no processo de diagnóstico da circovirose suína, o uso da técnica permanece ainda restrito, devido a sua complexidade técnica e alto custo, principalmente, quando comparada a imunistoquímica (Kim e Chae, 2002 a,b).

A PCR tem mostrado ser uma técnica mais sensível que a hibridização *in situ*, podendo ser utilizada para detecção do DNA do CVS-2 em tecidos contendo lesões histopatológicas da síndrome (Kim e Chae 2001b, c). A vantagem da PCR é poder realizar a detecção do DNA do CVS-2 em amostras coletadas de animais vivos, tais como sangue, fezes, urina, suabes nasal, oral, retal, ocular, tonsilar e sêmen (Krakowka et al., 2000; Laroche et al., 2000; Margar et al., 2000; Shibata et al., 2003). A utilização da PCR, juntamente com a interpretação conjunta de resultados fornecidos pela análise histopatológica dos tecidos pode ser uma alternativa para o diagnóstico da síndrome (Chae, 2004).

Várias técnicas para a detecção de anticorpos contra o CVS-2 foram desenvolvidas: imunofluorescência indireta, ELISA e imunoperoxidase em monocamadas de células (IPMC). Essas técnicas podem ser utilizadas para avaliar a presença de anticorpos nos plantéis, embora a detecção de anticorpos séricos isoladamente não constitua indício da circovirose suína. O fato de haver uma ampla distribuição do CVS-2 e do perfil de soroconversão ser relativamente similar entre granjas com ou sem sinais clínicos, dificulta o diagnóstico da SRM por métodos sorológicos (Segalés e Domingo, 2002). Entretanto, técnicas sorológicas vêm sendo empregadas para estudos epidemiológicos visando correlacionar títulos de anticorpos e viremia em animais naturalmente infectados pelo CVS-2 (Alborali et al., 2003; Brunborg et al., 2004; Segalés et al., 2005; Carasova et

al., 2007), determinar a influência de anticorpos maternos no desenvolvimento das infecções experimentais com o CVS-2 (Caprioli et al., 2003), detecção do CVS-2 no soro de fetos e recém nascidos (Farnham et al., 2003), correlação entre a presença de anticorpos neutralizantes e proteção contra a replicação do vírus e desenvolvimento das DACVS (Meerts et al., 2006), acompanhamento do status sorológico de suínos infectados naturalmente desde o nascimento até o abate (McIntosh et al., 2006), estudos sorológicos comparativos de rebanhos com e sem a síndrome (Laroche et al., 2003; Sibila et al., 2004), efeito dos títulos sorológicos de porcas infectadas na mortalidade leitões lactentes (Hassing et al., 2006), detecção do CVS-2 no soro e relação com o perfil de eliminação (Shibata et al., 2003).

3.9. Medidas de controle da circovirose suína

As principais medidas de controle para DACVS são baseadas na correção de fatores de manejo, boas medidas de higiene e biossegurança, diminuição de fatores de risco e redução de fatores estressantes aos animais. Não existe nenhum tratamento eficaz para o controle da síndrome. Na prática, vem sendo utilizadas vacinas e antimicrobianos de amplo espectro, adicionados à ração ou injetáveis, para diminuir os efeitos provocados pela infecção com patógenos causadores de doenças respiratórias e digestivas, frequentemente associados à infecção pelo CVS-2. Os melhores resultados vêm sendo alcançados adotando-se mudanças no manejo, baseadas principalmente no postulado constituído por 20 pontos, publicado por Madec et al. (2001), obtendo uma diminuição da mortalidade e de perdas econômicas. Em resumo, as recomendações propostas podem ser descritas em 4 regras principais:

1) Limitar o contato entre suínos - Sabe-se que o vírus pode ser transmitido pelo contato entre suínos. Evitar misturas entre lotes de

idades e origens diferentes ajuda a limitar a prevalência da doença dentro do rebanho. Diminuição do contato direto e indireto, (utilização de instrumentos cirúrgicos, fezes ou pessoas), também deve ser adotada. A transmissão acontece frequentemente quando se agrupam um grande número de suínos em baias grandes.

2) Diminuir as condições de estresse - A exposição ao estresse físico (variação de temperatura, excesso de gases e correntes de ar) ou excesso de exposição a microrganismos patogênicos causa maior stress ao sistema imune. A superativação do sistema imune pode levar ao desenvolvimento da síndrome, a menos que haja um alto nível de anticorpos colostrais.

3) Boas condições de higiene - A limpeza e desinfecção de prédios e instrumentos, uso de desinfetantes adequados e manejo “todos dentro, todos fora” podem reduzir a prevalência da doença.

4) Boa nutrição - Fornecimento de uma nutrição adequada para o crescimento do animal e desenvolvimento do sistema imune. Fornecimento de colostro nas primeiras horas de vida e após a desmama, estimular os leitões a ingerir dietas de alta qualidade e com altos níveis de antioxidantes que auxiliam o desenvolvimento e ação do sistema imune.

Para atingir esses quatro pontos, torna-se necessário à adoção de várias outras ações visando alterar medidas de manejo e ambiente: limitar a mistura de suínos, diminuição ou abolição da transferência cruzada após 24 horas de nascimento dos leitões, redução do tamanho e utilização de divisões sólidas entre as baias, reduzir, diminuir a densidade animal, nutrição adequada, aumento do acesso à alimentação, adequado fornecimento de colostro, não cortar os dentes de leitões, controle de temperatura e ventilação, uso de uma “baia hospital”, descarte de animais mortos, política de tratamento ou manutenção de animais doentes, boa qualidade e correta circulação de ar pelas instalações,

tratamento de porcas contra parasitas antes do parto, implementar medidas mais rigorosas de higiene, limpeza e desinfecção eficaz, desinfecção do ar e da água (Madec et al., 2001).

A técnica de soroterapia pode ser utilizada para a prevenção e controle da SRM. Para sua realização tem sido coletado soro de animais em fase final de crescimento (acima de 90 kg) e aplicado em leitões após a desmama ou quando se inicia os sinais clínicos da síndrome (Madec et al., 2001). Na prática, essa técnica tem sido cada vez menos utilizada, devido à grande proporção de resultados insatisfatórios, baixas condições de higiene ao se processar o soro dentro de uma granja e possível risco de disseminação de outras enfermidades.

O papel da nutrição e da utilização de substâncias antioxidantes também é importante para a manutenção da saúde dos animais. Vários plantéis têm se beneficiado da utilização de rações adicionadas de altos níveis de substâncias antioxidantes que neutralizam os radicais livres, responsáveis pelo ataque a membranas celulares e comprometimento do sistema imune (Madec et al., 2001). A vitamina E tem sido associada às funções reprodutivas, nervosas, circulatórias, musculares e atuação no sistema imune, sendo essencial para o funcionamento das células dos animais. Pesquisas têm demonstrado que o status do sistema imune de ratos, galinhas e leitões podem ser favorecidos ao se utilizar dietas com altos níveis de vitamina E. Experimento realizado por Babinszky et al. (1991), mostrou que os níveis de vitamina E no colostro ou leite podem ser aumentados quando altos níveis de vitamina E são adicionados à ração de porcas gestantes ou em lactação. Este fato pode favorecer o status imunológico de leitões lactentes. Resultado semelhante foi encontrado por Baekbo e Hassing (2003), que observaram que grupos de leitões com 0 a 1/mg de vitamina E/L de sangue apresentavam

14,6% de mortalidade, e grupos de leitões com níveis maiores que 3/mg de vitamina E/L de sangue apresentavam 6,7% de mortalidade.

As vacinas contra o CVS-2 vêm sendo apontadas como uma das mais seguras e poderosas ferramentas para prevenção de surtos da circovirose suína (Joisel et al., 2006). Países da América do Norte e Europa vêm utilizando alguns tipos de vacinas que tem alcançado resultados satisfatórios. Nesses países tem-se trabalhado com duas principais linhas de vacinações: vacinas utilizadas na imunização de matrizes, visando à transferência de anticorpos maternos e vacinas utilizadas para imunização de leitões. Recentemente, foi lançada no Brasil, uma vacina comercial para ser utilizada na imunização de matrizes, mas os resultados a campo ainda não são muito bem conhecidos.

A vacinação de matrizes vem sendo realizada há mais de um ano e meio na França e Alemanha, utilizando uma vacina inativada. Para a circovirose suína, sabe-se que a imunidade passiva recebida pelo leitão é suficiente para que os animais se tornem parcialmente protegido de uma infecção pelo CVS-2 e suficiente para proteger o animal contra mortalidade (Allan et al., 2002; McKewon et al., 2005; Ostanello et al., 2005; Calsamiglia et al., 2006) e manifestação de sinais clínicos (Rodríguez-Arriola et al., 2002; Rose et al., 2003; Sibila et al., 2004), mesmo porque quando os níveis de anticorpos maternos declinam, a doença se manifesta. A vacinação de matrizes seis e três semanas antes do parto levou, em algumas granjas, a uma diminuição de mortalidade de até 50% em animais de creche e terminação (Joisel et al., 2006). Leitões nascidos de matrizes não vacinadas e com baixos níveis de anticorpos apresentam uma duração da imunidade materna variando entre três a oito semanas de idade. Porém, leitões nascidos de porcas vacinadas e com passagem de altos níveis de

anticorpos colostrais podem levar a uma duração de anticorpos passivos por até 10 a 15 semanas, sendo que estes apresentam atividades soroneutralizantes. Mesmo a duração da proteção conferida aos leitões, pela vacinação de matrizes, descrita como limitada por algumas semanas, estudos demonstraram que a soroconversão pode ocorrer entre seis e 15 semanas de idade dos leitões (Halbur e Opriessning, 2004; Charreyre et al., 2005). Portanto a imunidade passiva poderia proteger o leitão na fase de maior infecção viral (creche), visto que a doença afeta principalmente animais de cinco a 16 semanas de idade (Larochelle et al., 1999; Allan et al., 2000a; Tood, 2000; Darwich et al., 2004).

Vários tipos de vacinas têm sido utilizadas em protocolos de vacinações de leitões, mas, nem todas as técnicas demonstram bons níveis de proteção contra desafios. A vacinação de leitões vem sendo acompanhada em alguns países da Europa e América do Norte utilizando vacina inativada quimérica preparada a partir do gene da ORF2 do CVS-2 clonado no genoma do CVS-1 (considerado não patogênico para suínos). A vacinação é realizada em leitões de três a quatro semanas de idade, com uma única dose. A vacina se adaptou bem para imunização de leitões provenientes de granjas que apresentam passagem de baixos níveis de anticorpos colostrais contra CVS-2, devendo a vacinação ser realizada quando a imunidade materna está em declínio. Animais vacinados apresentaram menor manifestação de sinais clínicos da circovirose suína e, redução de lesões histopatológicas. A vacina se mostrou bastante segura e não apresentou risco de reversão de virulência causada por alterações na seqüência de nucleotídeos ou recombinação da amostra vacinal com vírus de campo, fato esse observado na utilização de algumas vacinas quiméricas vivas. Vacinas utilizadas na imunização de leitões estão em processo de avaliação pelo

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para registro no Brasil, devendo estar disponíveis em breve no mercado brasileiro.

No Brasil, foram utilizadas vacinas autógenas, produzidas por alguns laboratórios particulares, tem se tornado uma prática bastante difundida para auxiliar no controle da circovirose suína. Assim, como na utilização de vacinas comerciais, existem protocolos para imunização de leitões e matrizes, sendo os resultados positivos em boa parte das granjas onde as vacinas autógenas estão em uso. As vacinas são preparadas a partir da coleta de órgãos de animais na fase inicial da doença, onde existe uma grande concentração do CVS-2 distribuído em órgãos linfóides. O uso de vacinas autógenas para controle da circovirose tem auxiliado na redução de mortalidade e diminuição de sinais clínicos da síndrome (Costa et al., 2007). Entretanto, em 2008 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento proibiu o uso de vacinas autógenas, medida essa que contribuiu para que a indústria de produção de suínos buscasse novos métodos de controle da enfermidade.

CAPÍTULO 2

PERFIL SOROLÓGICO, VIREMIA E EXCREÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (CVS-2) EM ANIMAIS NATURALMENTE INFECTADOS PERTENCENTES A GRANJAS COM OU SEM A CIRCOVIROSE SUÍNA

RESUMO

O estudo da excreção, viremia do CVS-2 e perfil sorológico foi realizado em um rebanho sem (G1) e outro com (G2) animais manifestando a síndrome da refugagem multissistêmica (SRM). Foram coletadas

amostras de suabes nasal e retal, sangue total e soro de 40 matrizes, leitões de maternidade, creche, recria e terminação. Os suabes e sangue foram submetidos à técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e as amostras de soro foram testadas por imunoperoxidase indireta em monocamada de células (IPMC). O perfil sorológico dos rebanhos com e sem a presença da síndrome mostrou-se diferente, podendo ser caracterizado por uma menor taxa de anticorpos em leitões de 25 a 40 dias na G2 e aos 70 a 80 dias na G1. A detecção do DNA do CVS-2 foi mais freqüente em amostras de suabes de suínos provenientes de granja com sinais clínicos podendo ser indicativo de uma maior circulação do vírus. Os níveis de anticorpos e uma contaminação do ambiente com o CVS-2 parecem ser fatores importantes para a ocorrência da SRM, visto que, são diferentes nas duas granjas analisadas.

Palavras chave: Circovírus suíno 2, perfil sorológico, eliminação, diagnóstico, PCR

ABSTRACT

A comparative PCV-2 serology, shedding and viremia study was performed in pigs from herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In each herd, 40 nasal and faecal swabs, serum and blood samples were collected at 15-30 days intervals from pigs from 8 to 120 days of age and sows. Swabs and blood were evaluated for the presence of nucleic acid of PCV2 by polymerase chain reaction (PCR) as well as for the presence of antibodies specific for PCV2 in serum by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). Serologic profiles for PCV-2 were very different in two herds and were characterized by a gradual decrease in antibody at 25 to 40 days in G2 and at 70 to 80 in G1. The PCV-2 DNA detection was more frequent in swabs samples from pigs of PMWS herd, wich may indicate a PCV-2 circulation. Antibodies levels appear to

influence the occurrence of disease, since titers were different in pigs from two herds.

Keywords: Porcine circovirus 2, serologic profiles, shedding, diagnosis, PCR.

1. INTRODUÇÃO

Circovírus suíno tipo 2 (CVS-2) é o agente responsável pela síndrome da refugagem multissistêmica (SRM), causadora de graves prejuízos em decorrência do aumento da mortalidade pós-desmame, diminuição do desempenho dos animais e aparecimento de altas taxas de refugagem. Ensaios sorológicos indicam que o agente encontra-se amplamente disseminado em rebanhos suínos de todos os continentes, com uma soroprevalência em torno de 100% na idade de abate (Larochelle et al., 2003; Lopéz-Soria et al., 2005). Entretanto, o número de animais soropositivos e a distribuição dos títulos de anticorpos podem variar de rebanho para rebanho de acordo com a idade, fase de produção e manifestação de sinais clínicos da SRM (Larochelle et al., 2003).

Sabe-se que o vírus encontra-se disseminado em quase 100% dos rebanhos comerciais mundiais, sendo a maioria dos animais se infecta durante algum ponto da fase de crescimento (Larochelle et al., 2003), com ou sem a observação da ocorrência da síndrome. Para a manifestação da SRM, destaca-se a existência de fatores desencadeantes como co-infecções com agentes bacterianos e virais tais como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (SRRS), vírus da influenza suína, parvovirus suíno (PVS), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kim et al., 2002; Pallares et al., 2002), ou co-fatores como imunizações e estresse (Krakowka et al., 2001).

Estudos demonstram que o DNA do CVS-2 pode ser detectado em amostras de suabes nasais, retais, tonsilares (Caprioli et al., 2006) e oculares, na orofaringe, secreção bronquial, urina e em fezes (Bolin et al 2001; Shibata et al., 2003; Sibila et al., 2004; Segalés et al., 2005), podendo ser, essas vias, utilizadas para estudo da circulação e eliminação viral de rebanhos que apresentam ou não sinais clínicos da SRM. A transmissão do CVS-2 por secreções nasais ou aerossóis foi apontada como principal via de transmissão horizontal (Krakowka et al., 2000; Shibata et al., 2003; Caprioli et al., 2006). Transmissão vertical foi sugerida por West et al. (1999) e O'Connor et al. (2001) ao isolarem o CVS-2 em fetos abortados e recém-nascidos e por Bogdan et al. (2001) ao detectarem o vírus em neonatos.

Em função da necessidade do desenvolvimento de mais estudos sobre a eliminação, viremia e perfil sorológico de granjas com o CVS-2, os objetivos desse trabalho foram (1) realizar o estudo da cinética da eliminação viral e circulação do CVS-2 nas diversas fases de produção de suínos de duas granjas positivas para a presença do patógeno, uma com e outra sem sinais clínicos da circovirose suína; (2) estudar a curva de títulos de anticorpos; (3) acompanhar alguns índices zootécnicos e medidas de manejo aplicadas em cada uma das granjas tentando correlacionar com a distribuição do vírus; (4) comparar a eliminação viral, perfil sorológico e medidas de manejo adotadas nas duas granjas estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização das granjas estudadas

Foram selecionadas para estudo duas granjas com produção em ciclo completo e

criação de suínos em um único sítio, localizadas em dois municípios no estado de Minas Gerais. A Granja 1 (G1 SRM-) possuía um plantel constituído de 550 matrizes e localizava-se no município de Esmeraldas. A propriedade foi caracterizada como positiva para a presença de CVS-2 pela realização de uma nested-PCR em amostras de tecidos de dois animais necropsiados na própria granja e, durante o momento do estudo, não apresentou animais com sinais clínicos ou histórico de ocorrência da síndrome.

A Granja 2 (G2 SRM+) era constituída por um plantel de 500 matrizes e localizava-se no município de Pará de Minas. O diagnóstico da SRM na granja foi baseado em quatro critérios: (1) técnica de nested-PCR em amostras de tecidos coletados de animais de 80 dias de idade; (2) visualização de sinais clínicos da síndrome no momento em que se iniciou o experimento (presença de elevado número de leitões refugos na fase de recria, aumento de linfonodo inguinal, palidez de pele, tosse e dificuldade respiratória); (3) lesões encontradas na necropsia (rins pálidos e com petéquias, hiperplasia de polpa branca no baço, linfonodos aumentados de volume e hemorrágicos) e, (4) lesões histopatológicas tais como: nefrite intersticial linfocitocitária multifocal e presença de células gigantes multinucleadas, depleção linfóide moderada e discreta proliferação de macrófagos no baço e linfonodos, broncopneumonia intersticial aguda com infiltrado de macrófagos, hiperplasia de placas de Peyer com intensa proliferação de macrófagos.

2.2. Animais estudados

Devido a ausência de estudos prévios de prevalência da infecção do CVS-2 no Brasil na ocasião do delineamento experimental deste estudo, para estimar o número de animais a serem amostrados, considerou-se uma prevalência mínima de 10% de animais

eliminando vírus, sendo amostrados aleatoriamente, num período de 48 horas em cada granja, 40 animais de cada categoria, para se obter 95% de intervalo de confiança na detecção de pelo menos um animal positivo (Martin et al., 1987). Foram amostradas 40 matrizes (20 em período de lactação e 20 em gestação), 40 leitões no setor de maternidade (8 a 19 dias de idade), 40 leitões na fase de creche (25 a 40 dias de idade), 40 leitões na recria (70 a 80 dias de idade) e 40 leitões no setor de terminação (100 a 120 dias de idade) em cada uma das granjas. Houve um intervalo de oito meses entre a realização das coletas em cada granja.

2.3. Material coletado

2.3.1 Suabes

Amostras de células e secreções nasais foram obtidas pela introdução de um suabe na narina. Células e fezes da região retal foram obtidas pela introdução de suabe no reto. O material coletado foi imerso em solução de PBS (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7.4) acrescido de 100U/ml de penicilina e 0.1mg/ml de estreptomicina e identificado. A alíquota resultante foi armazenada a -20°C até o momento do uso para pesquisa da presença do CVS-2 pelo teste de nested-PCR.

2.3.2 Sangue e Soro

As amostras de sangue (8 mL) foram coletadas na veia cava cranial ou veia jugular em tubos de soro identificados de 10 mL. Uma parte do sangue total foi misturado à uma solução de anticoagulante (EDTA) e submetido ao teste de PCR para pesquisa do vírus. Outra parte foi coletada em tubos sem anticoagulante e o soro obtido testado para presença de anticorpos anti-circovírus suíno pelo teste de imunoperoxidase indireta em monocamada

de células (IPMC).

2.4. Análise laboratorial

2.4.1. Suabes nasais e retais

Os tubos contendo tampão PBS, com os respectivos suabes, foram processados de acordo com o protocolo descrito por Ellis et al. (1999a), com algumas modificações: 500 µL da amostra homogeneizada foi separada e centrifugada a 8.500 g, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso em 500 µL de um tampão de digestão (10 mM Tris pH 8,5; 1 mM de EDTA; 0,5% Tween 20, 50 mg de proteinase K). O preparado foi incubado a 56°C por quatro horas e, posteriormente, aquecido a 95°C por oito minutos para inativação da proteinase K. As amostras processadas foram armazenadas a -20°C até a extração do ácido nucléico.

2.4.2. Sangue

As amostras de sangue total foram armazenadas a 4°C e o DNA extraído em um período de 24 horas após realizada a coleta, como descrito no item 2.5.1.

2.4.3. Soro

A amostra de sangue total, coletada sem a presença de uma solução de anticoagulante foi centrifugada a 8.500 g, por 15 minutos, à temperatura ambiente, para separação do soro da fração celular do sangue. O soro obtido foi estocado a -20°C até o momento do uso, como descrito no item 2.5.2..

2.5. Extração do DNA

2.5.1. Amostras de suabes

A técnica utilizada para a extração do DNA foi descrita de forma detalhada no Anexo 1.

Em resumo, o DNA foi extraído utilizando a técnica com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (pH 7,8 - 8,0), de acordo com protocolo publicado por Sambrook et al. (1989).

2.5.2. Amostras de sangue total

A técnica utilizada para a extração do DNA foi descrita de forma detalhada no Anexo 1. Resumidamente, para extração do DNA das amostras de sangue, utilizou-se o kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

2.6. Teste de nested PCR (nPCR)

A técnica da nPCR utilizada foi descrita de forma detalhada no Anexo 1. Resumidamente, amostras de suabes e sangue foram analisadas, pela nPCR, utilizando pares de iniciadores espécie-específica para a detecção do CVS-2. Para a reação externa foram utilizados os iniciadores descritos previamente por Ellis et al. (1999a), os quais amplificam um fragmento de 481 pares de bases: 5'-CGGATGTTGTAGTCCTGGTCG-3' e 5'-ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA-3'. Os iniciadores utilizados na reação interna foram descritos por Kim e Chae (2001a), e amplificam um segmento de 225 pares de bases: 5'-G ATTGTATG GCGGGAGGAT-3', e o antisenso 5'-AT TGACGAT TTGTTCCCCC-3'. A amplificação foi realizada no volume final de 20 µl utilizando 1,25 mM MgCl₂, 1X tampão PCR, 200 µM de cada dNTP, 10,00 µM de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase e H₂O q.s.p. Ambas as reações foram realizadas utilizando 35 ciclos, aquecimento 95° C por um min., 65° C por um min., 72° C por um min. A reação finalizou-se com uma etapa de extensão a 72° C por 10 min.

2.7. Teste de Imunoperoxidase indireta em monocamada de células (IPMC)

A técnica de IPMC utilizada foi descrita de forma detalhada no Anexo 1. Brevemente, células PK15 infectadas com uma suspensão viral de CVS-2, obtido a partir de tecidos de animais com sinais clínicos de circovirose suína foram fixadas uma placa de 96 poços. Soros dos suínos foram diluídos a 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 e 1:5120 e acrescentados a placa. A placa foi incubada à 37°C por uma hora e posteriormente lavada duas vezes com Tween 20 0.05% e NaCl 0.85%, e foram adicionados 40 µL de proteína G na diluição de 1:3000. Após incubação a reação foi revelada utilizando 950 µL de tampão acetato de sódio 50mM pH5,0 + 50 µL de AEC (3-amino-9-etil-carbazil) + 0,5 µL de água oxigenada 30%. Posteriormente, a placa foi lavada com uma solução de PBS por duas vezes. Os resultados foram agrupados como: negativo (título <20), positivo com baixo título (20 e 80), positivo com título intermediário (320 e 1280), positivo com título alto (≥ 5120).

2.8. Acompanhamento dos dados zootécnicos, caracterização do manejo e levantamento de fatores de risco para a manifestação clínica da circovirose suína

Os dados zootécnicos das granjas estudadas foram coletados visando estabelecer uma correlação com as análises das amostras obtidas durante o experimento. Foram analisados: número de leitões desmamados por porca/ano; percentagem de mortalidade na creche, recria e terminação; dados de performance reprodutiva; peso a desmama, saída de creche e ao abate; sinais clínicos relacionados com a doença e idade de ocorrência.

Para caracterização do manejo foram investigados alguns dados qualitativos:

qualidade de ar dentro dos galpões (presença de gás amônia); temperatura medida nos diferentes setores de produção; existência de ventilação natural ou artificial; tipos de instalações nas várias fases; densidade populacional dentro das baias; características da desmama; adoção do manejo “todos dentro-todos fora” e em que fases; programa sanitário e de biossegurança; introdução de animais; movimento de pessoas e veículos; medicamentos utilizados e procedimentos para controle de enfermidades, de acordo com informações obtidas no questionário (Anexo 2).

2.9. Análise estatística

A comparação da frequência de amostras PCR positivas, estudos sorológicos, viremia e análise de distribuição dos títulos de anticorpos de suínos sorologicamente positivos nas fases de produção dos dois rebanhos foram analisadas utilizando os teste de Fisher ou Qui-Quadrado ou teste de Kruskal-Wallis. Os dois primeiros testes foram utilizados para a análise de variáveis dicotômicas e o último para variáveis ordinais. Diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Viremia, perfil sorológico e circulação do CVS-2

O número de amostras PCR positivas em suabes e sangue e a frequência de animais sorologicamente positivos, coletadas nas G1(SRM-) e G2(SRM+), pode ser visualizado na Tabela 1. Na categoria porca, a G2, apresentou maior número de suabes nasais e retais positivos quando comparada a G1 ($P < 0,05$). As duas granjas possuíam altas taxas de animais virêmicos e de soropositivos nessa categoria (Tab. 1). Entretanto, na G1, o título de anticorpos das porcas contra o CVS-2 era maior, em

relação a G2 ($P < 0,05$) (Fig. 1).

Na maternidade, assim como na categoria porcas, a G2(SRM+), apresentou taxas mais altas de amostras de suabes PCR positivas quando comparada a G1 ($P < 0,05$). Nas duas granjas analisadas houve uma queda do número de animais virêmicos na maternidade, quando comparado a categoria porcas e, na G1(SRM-), decréscimo também do número de suabes positivos (Fig. 2). Os títulos de anticorpos encontrados nas duas granjas eram similares, nessa categoria (Fig. 1).

Na creche da G1(SRM-) verificamos um aumento de número de animais eliminando o CVS-2 e do número de virêmicos quando comparados aos leitões do setor de maternidade ($P < 0,05$). Nessa fase visualizava-se um predomínio de altos títulos de anticorpos (Fig. 1). Entretanto, 7% dos animais eram soronegativos. Na G1, o decaimento da imunidade passiva pode ser observado entre o final da fase de creche e início da recria. Na recria, observamos um decréscimo do número de leitões virêmicos e títulos de anticorpos mais heterogêneos (47,5% de soronegativos e 52,5% de soropositivos) (Fig 2). Soroconversão ocorre entre a fase de recria e terminação sendo 90% dos animais soropositivos (Tab. 1), com predomínio de maior número de animais apresentando alto título de anticorpos (Fig. 1 e 2).

Na creche da G2(SRM+), ao contrário da G1, verificamos um número similar de animais virêmicos e menor proporção de animais eliminando o CVS-2, quando comparados aos leitões do setor de maternidade da própria granja (Tab. 1). A análise sorológica mostrou que o decréscimo dos títulos de anticorpos, conferidos pelo colostro, inicia-se mais cedo que na G1, entre a fase final de maternidade e início de creche (Fig. 2). Na creche, em relação à fase anterior, ocorre um decréscimo de animais eliminando o vírus (Tab. 1), e

aumento da taxa de animais soronegativos (45,0%). Na recria, ocorre um aumento da taxa de animais com altos títulos de anticorpos (33%). A soroconversão pode ser observada entre a fase de recria e terminação, voltando a maioria dos animais a apresentarem altos títulos de anticorpos (Fig 1 e 2).

3.2. Acompanhamento de índices zootécnicos, caracterização do manejo e fatores de risco para a manifestação da circovirose suína.

A coluna destacada em negrito e sublinhada na Tab. 2 marca o mês de início do trabalho de coleta de material realizado nas G1(SRM-) e G2(SRM+). Analisando os índices zootécnicos, das duas granjas estudadas (Tab. 2 e 3), verificamos que, durante o ano de avaliação, a maioria dos dados permaneceu dentro dos valores aceitáveis em cada sistema de produção para a genética mantida na granja, segundo alvos de produtividade estabelecidos pela empresa fornecedora da genética. Entretanto, três meses após a data da coleta na G1 (a partir de abril de 2005), visualizou-se um aumento nas taxas de mortalidade na fase de creche, recria e terminação. Já na G2, a taxa de mortalidade da fase de recria/terminação permaneceu com valores elevados de março de 2005 a fevereiro de 2006 e o peso aos 150 dias abaixo do considerado satisfatório, de abril de 2005 a fevereiro de 2006.

Inserir Tab 1

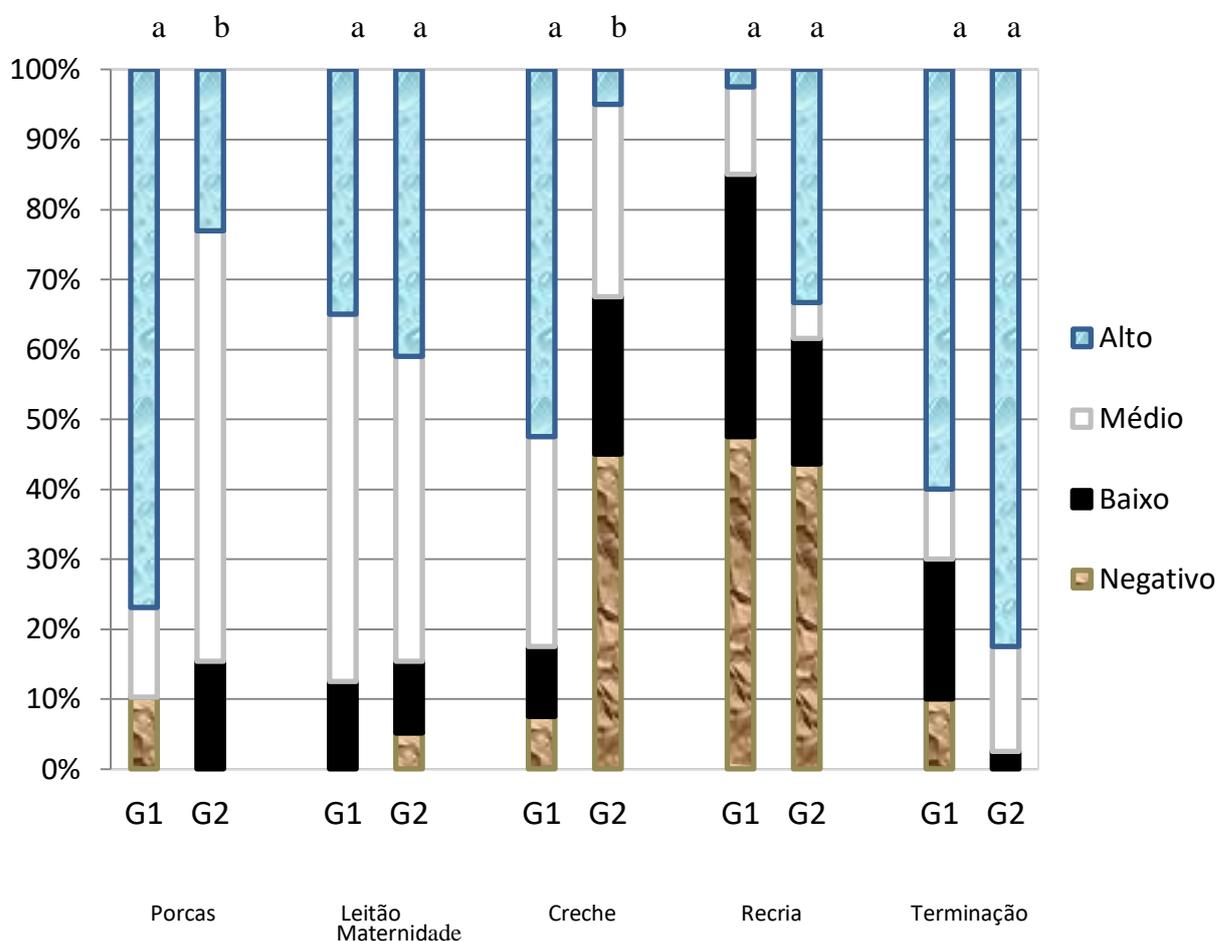


Figura 1. Distribuição dos títulos de anticorpos contra CVS-2, em amostras de soro coletadas de animais de diferentes categorias nas Granjas 1(SRM-), e 2(SRM+). Amostras negativas (título <20), positivo com baixo título (20 e 80), positivo com título médio (320 e 1280), positivo com título alto (≥ 5120); *a e b*- Análise dos títulos de anticorpos, comparando categorias de animais das G1(SRM-) e G2(SRM+), utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Letras iguais correspondem a resultados estatisticamente iguais e letras diferentes a resultados estatisticamente diferentes. Comparação foi realizada entre colunas, na mesma categoria animal e as diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

Inserir Figura 2

Tabela 2. Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 1(SRM-).

	Índices alvo	Jul. 2004	Ago. 2004	Set. 2004	Out. 2004	Nov. 2004	Dez. 2004	Jan. 2005	Fev. 2005	Mar. 2005	Abr. 2005	Mai. 2005	Jun. 2005	Jul. 2005
% mortes creche	1 a 1,5¹	1,3	1,1	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	1,4	1,7	3,8	2,1	3,2	2,5
% mortes recria/term.	1¹	0,2	0,5	1,5	0,8	1,1	1,3	0,7	0,7	1,0	2,5	2,7	2,6	2,8
*Peso aos 21 dias	> 6 kg²	5,9	6,1	5,7	5,5	5,6	5,8	5,9	5,8	6,1	5,9	6,4	6,4	6,4
*Peso aos 63 dias	24 a 26 kg²	25,1	24,8	24,6	25,0	23,0	24,6	23,0	21,6	21,9	22,3	23,7	23,0	26,7
*Peso aos 150 dias	100 kg²	107,9	103,1	105,3	104,0	102,3	102,2	98,6	99,2	100,4	100,4	97,9	98,9	98,2
Nasc. totais/parto	12,5 a 14,4²	11,9	12,2	12,8	12,9	13,5	12,6	12,8	13,4	12,7	12,8	12,0	12,3	11,4
Nasc. vivos/parto	11,8 a 13,2²	11,0	11,2	11,6	11,7	12,2	11,3	11,7	11,6	11,6	11,5	10,9	11,1	10,4
Leitões desmamados	11,4 a 12,5²	10,6	9,7	11,2	11,2	11,3	11,0	10,8	11,0	10,6	10,9	10,2	10,3	10,0

Células destacadas em negrito - Índices zootécnicos acima dos valores considerados aceitáveis para um sistema de produção. *Peso aos 21, 63 e 150 dias - são ajustados para esta idade pelo programa de gerenciamento SuinSoft; ¹ Sugestão de alvo de parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos modernos e com alta tecnologia descritos por Sesti e Sobestiansky, 1998; ² Parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos com alta tecnologia para granjas com genética DB, 2005. (www.dbdanbred.com.br/resultados DB).

Tabela 3. Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 2 (SRM+).

	Índices alvo	Fev. 2005	Mar. 2005	Abr. 2005	Mai. 2005	Jun. 2005	Jul. 2005	Ago. 2005	Set. 2005	Out. 2005	Nov. 2005	Dez. 2005	Jan. 2006	Fev. 2006
% mortes creche	1 a 1,5¹	0,9	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,1	0,5	0,5	0,2	0,40	1,0	0,90
% mortes recria/term.	1¹	1,3	3,3	3,9	5,1	4,7	3,0	3,6	2,2	3,9	2,9	3,03	6,4	4,77
*Peso aos 21 dias	> 6 kg²	5,5	5,5	5,5	5,0	5,3	5,2	5,4	5,5	6,0	5,9	5,49	5,9	6,23
*Peso aos 63 dias	24 a 27 kg²	19,1	22,	21,6	23,4	21,9	24,2	21,3	21,4	25,0	24,0	23,45	22,6	22,4
*Peso aos 150 dias	100 kg²	98,0	96,8	90,7	87,7	89,0	90,3	90,8	91,8	90,6	91,0	87,94	89,5	91,1
Nasc. totais/parto	13 a 14,5²	13,4	13,0	12,7	13,8	11,8	13,7	12,5	12,5	13,9	13,1	13,37	12,2	12,7
Nasc. vivos/parto	12 a 13,4²	12,4	11,9	12,2	13,2	11,6	13,0	11,7	11,9	13,2	12,4	12,71	11,9	11,95
Leitões desmamados	11,5 a 13²	12,2	11,4	11,5	12,9	11,3	12,3	11,0	11,3	12,8	12,0	11,62	11,8	11,14

Células destacadas em negrito - Índices zootécnicos acima dos valores considerados aceitáveis para um sistema de produção. *Peso aos 21, 63 e 150 dias - são ajustados para esta idade pelo programa de gerenciamento SuinSoft; ¹ sugestão de alvo de parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos modernos e com alta tecnologia descritos por Sesti e Sobestiansky, 1998; ² Parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos com alta tecnologia para granjas com genética Pen Ar Lan, 2005. (www.penarlan.com.br/mídia).

Os fatores predisponentes a manifestação da circovirose suína podem ser visualizados na Tabela 4. A tabela com maiores detalhes pode ser visualizada no Anexo 3.

Tabela 4. Fatores de risco para a manifestação da circovirose suína em granjas sem (G1) e com (G2) sinais clínicos da síndrome da refugagem multisistêmica.

Fatores predisponentes	G1	G2
Limpeza e desinfecção adequada	Sim	Não
Vacinação	Rinite atrófica (porcas) Doença de Glasser (leitões)	Rinite atrófica (porcas)
Animais com sinais clínicos de circovirose suína	Não	Sim (a partir de 70 dias)
Maternidade		
Idade de desmame	21 dias	16 a 21 dias
Manejo “todos dentro todos fora”	Sim	Sim
Vazio sanitário suficiente	Sim	Não
Creche		
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Sim
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Sim
Manejo “todos dentro todos fora”	Sim	Sim
Vazio sanitário suficiente	Não	Sim
Limpeza e desinfecção adequada	Não	Sim
Recria e Terminação		
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Não
Separação e tratamento de refugos	Sim	Não
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Sim
Manejo “todos dentro todos fora”	Não	Não
Vazio sanitário suficiente	Não	Não
Limpeza e desinfecção adequada	Não	Não

4. DISCUSSÃO

Na categoria porca, o elevado número de animais virêmicos sugere haver uma grande exposição desses animais ao CVS-2, nas G1(SRM-) e G2(SRM+). A presença de porcas soropositivas, com predomínio de título alto e médio de anticorpos, como observado na G1 e G2, pode ser indicativa da presença contínua de replicação viral ou exposição freqüente desses animais ao vírus. Entretanto, a infecção das porcas com o CVS-2 parece ser maior na G1, que apresentou maior número de porcas com título de anticorpos mais alto que os encontrados na G2 (predomínio de título médio) ($P < 0,05$).

Nas duas granjas analisadas, leitões de maternidade, com idade entre oito e 19 dias, já se encontravam soropositivos para o CVS-2, sendo os anticorpos, provavelmente, provenientes do colostro. O fato de nenhuma das duas granjas realizarem o acompanhamento da mamada das leitegadas e não assegurarem que todos os leitões nascidos ingeriram adequadas quantidades de anticorpos colostrais poderia estar prejudicando a transferência de anticorpos maternos. Esse fato pode ser observado principalmente na G1 cujas porcas apresentavam um predomínio de alto título de anticorpos e a maioria dos leitões com título médio. Outro problema identificado na G1 é a presença de 10% das porcas

amostradas serem soronegativas, que não transferiram aos leitões anticorpos contra o CVS-2. Na G2, os resultados sorológicos sugerem haver uma melhor eficiência que G1, no processo de transferência de anticorpos colostrais (porcas com predomínio de título médio e maior número de leitões com título variando entre médio e alto).

O menor número de animais virêmicos e de suabes positivos encontrado em leitões na maternidade, quando comparado a porcas na maternidade, principalmente na G1 ($P < 0,05$), pode estar relacionado a menor contaminação do ambiente pelo CVS-2, em função de um melhor e mais frequente manejo de limpeza e desinfecção realizado nesse setor, embora tenha sido encontrado uma elevada taxa de porcas virêmicas eliminando o vírus. Também não se pode descartar uma contaminação precoce dos leitões por ingestão de colostro. Shibata et al. (2006) isolaram o CVS-2 em uma amostra de colostro e detectaram o DNA do CVS-2 em amostras coletadas de diferentes porcas. Outro importante fator que poderia estar contribuindo é a presença de proteção conferida pela imunidade passiva, transmitida via colostro, e o predomínio de leitões com médios a altos níveis de anticorpos colostrais que os protegem parcialmente contra uma infecção pelo CVS-2. Trabalho realizado por McKeown et al. (2005) mostrou que a viremia foi reduzida em leitões com altos níveis de anticorpos e que a presença de baixos níveis de anticorpos maternos não protegem os leitões de uma infecção experimental com o CVS-2, o que é conseguido em leitões com altos níveis de anticorpos passivos. Porém, os autores comentam que esta proteção é parcial, provavelmente porque uma resposta conjunta humoral e celular seja requerida para proteção total do animal contra uma infecção (Fenaux et al., 2003). Estudos recentes demonstram que a menor replicação viral está relacionada à presença de maior taxa de anticorpos neutralizantes e não a

deteção de altas taxas de anticorpos totais (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007). No nosso estudo, não foi testado à presença de anticorpos neutralizantes nos animais. Entretanto, não descartamos a possibilidade do menor número de leitões virêmicos estarem relacionados à presença de animais com altos títulos de anticorpos, sendo grande parte dos mesmos, anticorpos neutralizantes. Mesmo porque, no nosso trabalho, a coleta das amostras de leitões foi realizada entre oito e 19 dias de idade, podendo nesta fase já haver a presença de anticorpos neutralizantes. Meerts et al. (2006) detectaram a presença de anticorpos neutralizantes a partir do 10º dia pós-infecção experimental de oito leitões SPF e verificaram que os mesmos estavam presentes até 21 dias de idade, onde ocorreu o término do acompanhamento.

Nas duas granjas ocorria, após a desmama, a formação de novos lotes e o agrupamento de animais com níveis de imunidade diferentes, em salas com baias vazadas que possibilitavam o maior contato entre leitões que favorece a transmissão horizontal. Na G1, o ambiente da creche parece apresentar maior contaminação com o CVS-2, pois encontramos maior número de animais virêmicos e maior deteção do CVS-2 em secreções e excreções que na G2. Provavelmente, os fatores que contribuem para menor contaminação da creche da G2, são o bom manejo de limpeza e desinfecção utilizados nesse setor, alojamento dos leitões na densidade correta de (0,33 m² por leitão) e maior tempo de vazio sanitário (7 dias), o que não era adotado de forma tão eficiente na G1. Entretanto, na G1, a diminuição mais tardia da quantidade de soropositivos e títulos de anticorpos, que se deu na recria e, maior exposição ao vírus na fase anterior (creche) podem contribuir para a não manifestação clínica da circovirose suína na granja, visto que os animais expostos ainda apresentam maiores títulos de anticorpos colostrais e, provavelmente, encontram-se parcialmente protegidos, por um período

suficiente para que pudessem desenvolver sua própria resposta imunológica contra o CVS-2. O declínio da imunidade passiva posteriormente, já na recria, somado ao fato dos animais serem submetidos a uma melhor condição de manejo, diminuindo alguns fatores tidos como desencadeantes da SRM, podem ter contribuído para a não manifestação de sinais clínicos, uma vez que estudos demonstram que o prolongamento da imunidade materna para o CVS-2 ou o retardo na infecção de leitões pode beneficiar o controle da SRM. Entretanto as altas taxas de mortalidade observadas na creche, recria/terminação, a partir de abril de 2005 na G1, podem estar associadas a uma infecção subclínica com o CVS-2 e/ou pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, visto que oito meses após o término do trabalho registrou-se um surto de circovirose associado a manifestação clínica da pneumonia enzoótica (em comunicação com o veterinário que acompanhava a granja).

Na G2, a maioria dos animais torna-se susceptível a uma infecção pelo CVS-2 em estágios mais iniciais do ciclo de produção (creche e recria), já que a imunidade passiva decresce entre o final da fase de maternidade e início da creche. Trabalhos realizados por Vanderputte et al. (2001) e Vigre et al. (2003) mostraram que o decaimento da imunidade materna pode variar entre duas semanas a vários meses e os anticorpos colostrais podem ser parcialmente protetores. Na creche foram agrupados animais com diferentes status imunológicos. Uma maior exposição ao vírus na fase inicial de desenvolvimento do leitão (maternidade) pode também contribuir para uma maior infecção dos animais que apresentam baixos títulos de anticorpos colostrais na creche e recria e, provavelmente, não se encontram totalmente protegidos na fase de maior ocorrência de descrições da síndrome, de 5 a 15 semanas de idade. Esse fator associado a um maior desafio relacionado a falhas no manejo poderiam estar contribuindo para a manifestação da SRM a partir de 70 dias de

idade (recria), levando a um aumento da mortalidade em animais de recria e terminação (70 a 110 dias de idade), assim como uma diminuição do peso final dos animais.

Nas duas granjas a soroconversão foi observada entre a fase de recria e terminação. Lobato et al. (2007) ao estudarem o perfil sorológico de quatro granjas, uma sem e três com a SRM, verificaram que em todas as granjas a soroconversão ocorria entre a fase de recria e terminação, independente da diminuição da imunidade passiva ocorrer na creche ou recria. O sangue foi a amostra que mais frequentemente apresentou resultados positivos (Tab. 1). Resultado similar foi descrito por Shibata et al. (2003) ao realizarem a detecção do DNA do CVS-2 em amostras de sangue, soro, suabe orofaríngeo, nasal e fezes coletadas de suínos infectados experimentalmente e em infecções naturais.

O estudo da detecção do DNA do CVS-2 em suabes indica a presença do vírus em secreções e excreções fornecendo informações sobre a circulação do vírus na granja. Não se pode descartar a possibilidade da existência de uma contaminação do ambiente e a presença do CVS-2 na região externa do focinho dos animais, podendo ser detectada ao se introduzir o suabe nasal. Na tentativa de se reduzir o efeito da contaminação ambiental, realizou-se a coleta com um suabe uretral, inserido mais profundamente no focinho e no reto dos animais. Nesse trabalho, ao avaliarmos o total de amostras de suabes das duas granjas, verificamos que G1 apresenta maior quantidade de suabe nasal positiva quando comparado ao retal e em G2 maior quantidade de suabe retal. Esse resultado sugere que as duas vias podem ser utilizadas para o estudo da eliminação do CVS-2 em conjunto. Esses dados não estão totalmente em concordância com os encontrados na literatura, onde a via nasal vem sendo

descrita como principal rota de transmissão do vírus. Calsamiglia et al. (2002), ao realizarem a quantificação do CVS-2 em diferentes vias de excreção, observaram que amostras de suabes nasais apresentavam maior número de resultados positivos e maiores quantidades de vírus.

A G1 apresentava um manejo de melhor qualidade que a G2 (Tab. 4 e Anexo 3). Entretanto, algumas falhas no manejo podem estar relacionados à disseminação do vírus: falta de acompanhamento da ingestão de colostro pelos leitões, stress térmico em animais de crescimento e no setor reprodutivo e agrupamento de algumas leitegadas na entrada da creche.

A G2 apresentava vários fatores de risco que poderiam estar relacionados à disseminação do CVS-2 e manifestação de sinais clínicos (Tab. 4 e Anexo 3) tais como stress (térmico e presença de alta quantidade de gases no ambiente), falta de acompanhamento da ingestão de colostro pelos leitões, alta densidade animal na recria/terminação, não separação de refugos na creche, separação de animais na fase mais avançada da doença possibilitando maior disseminação, baixa hospital ao lado de baias com leitões sadios (contato direto e indireto), tratamento inadequado de animais doentes, baixa qualidade da limpeza e desinfecção e baixo tempo de vazio sanitário, controle ineficiente dos agentes infecciosos causadores de diarreias e circovirose suína. Elevado número de animais refugos eram encontrados, na fase de recria, com sinais clínicos de circovirose suína, com idade entre 70 a 100 dias, contribuindo para a diminuição do peso ao abate e as altas taxas de mortalidade observadas na creche e recria/terminação. A G2, alguns meses antes do início da coleta, começou a adotar algumas medidas de manejo visando estabelecer um melhor controle da circovirose suína, nas quais podemos destacar: melhor controle de temperatura e diminuição de stress térmico, adoção de

antibióticos mais adequados para controle de doenças bacterianas concorrentes, melhora na qualidade de limpeza e desinfecção dos galpões de creche e recria/terminação e adoção de vazio sanitário na creche. Entretanto, as medidas adotadas não se mostraram muito eficientes para o controle da síndrome.

Os resultados mostram que animais sorologicamente positivos para o CVS-2 estão presentes tanto em granja com ou sem sinal clínico de SRM, assim como animais virêmicos eliminando o vírus. Fato também observado por Rodriguez-Arriola et al. (2000) e Larochelle et al. (2003), ao detectarem a presença do CVS-1 e CVS-2 em suínos com e sem sinais clínicos da síndrome. Este fato sugere que a infecção está amplamente distribuída na população de suínos, mesmo sob a forma subclínica. A detecção do DNA foi mais freqüente em amostras de suabes coletadas na G2, com sinais clínicos da circovirose suína, podendo ser indicativo de maior exposição e eliminação do vírus que na G1. Segalés et al. (2005) ao realizarem a quantificação do CVS-2 em amostras de soro e suabes tonsilar, nasal, traqueobronquial, urinário e retal, coletadas de granjas com e sem a sintomatologia da SRM, verificaram que, com exceção do suabe retal, todas as amostras provenientes da granja com manifestação da SRM possuíam maiores quantidades de vírus.

Os resultados, obtidos nesse trabalho, podem ser úteis para o entendimento da circulação do CVS-2 em granjas naturalmente infectadas com e sem a manifestação clínica da SRM. Além disso, contribuem para a adoção de medidas corretivas de manejo e estabelecimento do momento correto da vacinação (método de prevenção largamente empregado para o controle da circovirose suína). A adequada utilização da vacina contra o CVS-2 possibilita a não interferência de antígenos vacinais com anticorpos colostrais e possibilita os animais

desenvolverem no momento correto uma melhor resposta imunológica. Para a G2, a vacinação de leitões pode ser recomendada para desenvolvimento de uma imunidade ativa que protegeria os animais contra uma infecção na fase de maior circulação viral (recria).

5. CONCLUSÕES

1. O CVS-2 está amplamente distribuído em leitões de todas as idades provenientes de granjas com e sem sinais clínicos da SRM porém, este estudo confirma que o perfil sorológico em um rebanho com e sem a presença da síndrome pode ser diferente, principalmente em relação à duração da imunidade passiva.

2. A detecção do DNA foi mais frequente em amostras de suabes de suínos provenientes de granja com sinais clínicos da circovirose suína. O sangue foi a amostra que mais frequentemente apresentou resultados positivos, sendo sugestivo de uma grande circulação do CVS-2.

3. A manifestação da circovirose pode estar relacionada a queda da imunidade passiva, animais com baixos títulos de anticorpos na fase crítica do aparecimento de sinais clínicos (5 a 15 semanas), maior contaminação do ambiente com o CVS-2 associado a presença de um maior número de fatores de risco

CAPÍTULO 3

ESTUDO DO PERFIL SOROLÓGICO, VIREMIA E EXCREÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (CVS-2) EM GRANJAS COM E SEM A SÍNDROME DA

REFUGAGEM MULTISSISTÊMICA (SRM)

RESUMO

Um estudo comparativo do perfil sorológico, viremia e presença do CVS-2 em amostras de suabes nasal e retal foi realizado em um rebanho sem (G1) e com (G2) a manifestação clínica da síndrome da refugagem multissistêmica (SRM). Foram estudados 35 animais, escolhidos ao acaso, dos quais foram realizadas coletas aos 8 a 19 dias de idade na maternidade, 30 a 35 dias na creche, 56 a 70 dias na recria, 85 a 100 dias de idade na terminação. No abate, aos 150 dias de idade, amostras de tecidos foram coletadas. Suabes, sangue e tecidos foram submetidos à técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa do DNA do CVS-2 e as amostras de soro foram testadas para presença de anticorpos anti-CVS pela imunoperoxidase indireta em monocamada de células (IPMC). A análise dos resultados obtidos mostrou que na G1, a imunidade passiva decaiu entre a 1ª e a 2ª coleta, enquanto na G2, entre a 2ª e a 3ª coleta. A queda dos títulos de anticorpos nas duas granjas coincide com maior número de animais virêmicos, eliminação do vírus por secreções e excreções, e na G2 também com aparecimento de sinais clínicos. A manifestação da SRM provavelmente está relacionada a uma maior circulação do vírus e contaminação precoce dos leitões, e presença de baixos títulos de anticorpos anti-CVS-2. Entretanto, os fatores que mais contribuem para manifestação da síndrome parecem ser as falhas de manejo.

Palavras chave: Circovírus suíno 2, perfil sorológico, excreção, PCR.

ABSTRACT

Prospective seroprofile, viremia, nasal and fecal shedding of PCV-2 were tested in pigs

from herds without (G1) and with (G2) postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Nasal and faecal swabs, serum and blood samples were collected at 8 to 19, 30 to 35, 56 to 70, 85 a 100 days of age from 35 randomly selected pigs. Tissues samples were collected at 150 days at slaughter. Swabs, tissues and blood samples were evaluated for the presence of nucleic acid of PCV2 by polymerase chain reaction (PCR) as well as for the presence of antibodies to PCV2 in serum by immunoperoxidase monolayer assay (IPMA). Serologic profiles for PCV-2 were very different between the two herds. The decrease of passive immunity started at 30 to 35 days in G1. In G2, the decrease of passive immunity started before 30 to 35 days. The decrease of antibodies may be associated to the increase of viremia, PCV-2 exposure and shedding and, in G2 with PMWS. The PMWS is associated with high virus circulation, earlier PCV-2 infection and low antibodies levels. However, bad production management seems to be the mainly factor to PMWS manifestation.

Keywords: Porcine circovirus type 2, serologic profiles, shedding, PCR.

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da refugagem multissistêmica (SRM), também conhecida como circovirose suína, é uma doença emergente na suinocultura, causada pelo circovirus suíno 2 (CVS-2) (Allan e Ellis 2000). Levantamentos sorológicos mostram alto número de animais soropositivos em rebanhos com ou sem a manifestação clínica da circovirose suína (Rose et al., 2003; Lopez-Soria et al., 2005). Entretanto, o perfil sorológico e a distribuição do vírus nas fases do ciclo de produção de suínos ainda não estão completamente entendidos.

A alta prevalência da circulação viral tem sido confirmada em amostras de sangue e soro pela utilização da técnica da PCR,

sendo a maioria dos animais infectados durante algum ponto da fase de crescimento (Larochelle et al., 2003) sem a observação da ocorrência da síndrome podendo ser destacada a necessidade da existência de alguns eventos ou fatores tais como: co-infecções, vacinações e estresse. Estes fatores desencadeiam uma estimulação do sistema imune e ativação do CVS-2 em macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos que levam ao desenvolvimento experimental da SRM (Kennedy et al., 1998; Allan e Ellis, 2000; Krakowka et al., 2001). Porém, os fatores relacionados a circulação do vírus, manifestação da síndrome e prejuízos provocados em decorrência da sua interferência nos índices zootécnicos de plantéis infectados precisam ser melhor estudados.

O CVS-2 pode ser detectado em amostras de tecidos e fluídos corporais tais como secreções oculares, nasais, bronquiais e tonsilares, assim como na urina, fezes (Krakowka et al., 2000; Margar et al, 2000, Halbur,2004) e sêmen (Larochelle et al., 2000). Quando métodos quantitativos são utilizados observa-se que suínos clinicamente doentes possuem altas quantidades do vírus no soro e em tecidos quando comparado a animais sem sinais clínicos (Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004).

Estudos visando determinar as formas de transmissão, tempo de eliminação viral e de fatores de manejo e ambientais que possam favorecer o aparecimento da síndrome ainda estão em número limitado. O objetivo do presente trabalho foi (1) verificar a dinâmica de anticorpos contra o CVS-2 relacionando à circulação do vírus, e realizar a comparação do perfil em uma granja com e sem sinais clínicos da circovirose suína; (2) acompanhar 35 animais por todo o ciclo de produção quanto a eliminação do vírus, perfil sorológico e viremia; (3) verificar o abate dos animais selecionados e coletar fragmentos de tecidos para verificação da presença do CVS-2 nos mesmos; (4)

acompanhar alguns índices zootécnicos e as medidas de manejo aplicadas em cada uma das granjas tentando correlacionar com a distribuição do vírus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Granjas selecionadas

Duas granjas, com produção em ciclo completo, localizadas no estado de Minas Gerais foram selecionadas. A Granja 1 (G1 SRM-), localizada no município de Esmeraldas era formada por um plantel de 550 matrizes (mesma granja estudada no Cap. 1). A propriedade não apresentava animais com sinais clínicos ou histórico de ocorrência da SRM e, foi caracterizada como positiva para a presença de CVS-2 utilizando o teste da PCR em amostras de tecidos coletados na necropsia de dois animais com idade aproximada de 68 dias.

Esse mesmo estudo foi realizado na Granja 2 (G2 SRM+), com 600 matrizes, localizada no município de Pará de Minas, caracterizada como positiva para a presença do vírus e para presença da síndrome. O diagnóstico da síndrome nessa propriedade foi realizado pela associação de sinais clínicos (depressão, aumento de linfonodos inguinais, animais apresentando palidez, diarreia, dispnéia e quadros de emagrecimento progressivo) presente em animais com idade superior a 65 dias, presença de lesões histopatológicas compatíveis e detecção do DNA do CVS-2 pela PCR em tecidos coletados na necropsia de animais da granja.

2.2. Animais estudados

Considerando-se uma prevalência mínima de 10% de animais eliminando vírus, foram amostrados aleatoriamente, 40 leitões na maternidade, para se obter 95% de confiança na detecção de pelo menos um animal positivo (Martin et al., 1987). O

número final foi reduzido a 35 animais devido a perdas de amostras ocorridas ao longo do experimento. Os leitões foram identificados com brincos na primeira coleta e tiveram o mesmo tratamento de seus contemporâneos na granja. Estes animais foram acompanhados por coletas repetidas realizadas no setor de maternidade (leitões de 8 a 19 dias de idade), creche (30 a 35 dias de idade), recria (56 a 70 dias) e terminação (85 a 100 dias). O abate foi acompanhado (150 dias de idade) e amostras de tecidos foram coletadas para análises.

2.3. Amostras coletadas

A coleta das amostras de suabes nasal e retal, sangue total e soro foram descritas no item 2.3 do trabalho anterior.

2.3.1. Tecidos

O abate dos animais selecionados foi acompanhado e amostras de tecidos, incluindo linfonodos, rim, fígado e pulmão, foram coletadas para pesquisa do DNA do CVS-2. As amostras foram congeladas a -20°C em laboratório e, posteriormente, analisadas pela técnica nested-PCR (nPCR).

2.4. Análise laboratorial das amostras

O processamento das amostras, extração do DNA, teste de nPCR e de imunoperoxidase indireta em monocamada de células foram descritas nos itens 2.4, 2.5, 2.6 e 2.7 do trabalho anterior.

2.4.1. Tecidos

Dois gramas de um homogeneizado de amostras de tecidos foram homogeneizados em 10 ml de solução Hank's-Hepes-Penicilina-Estreptomicina (HHPS). O macerado foi centrifugado a 8.500 g, a uma temperatura de 4°C e o sobrenadante coletado diluído (1:5) em meio de cultura (MEM) e estocado a uma temperatura de -

20°C.

2.5. Acompanhamento dos dados zootécnicos, caracterização do manejo e levantamento de fatores de risco para a manifestação clínica da circovirose suína

Descrito no item 2.7 do capítulo anterior.

2.6. Análise estatística

Descrito no item 2.8 do capítulo anterior.

3.1. Viremia, perfil sorológico e circulação do CVS-2

Os resultados da comparação da viremia, eliminação do CVS-2 em suabes e presença do DNA viral em amostras de tecidos coletados da G1 (SRM-) e G2(SRM+) podem ser visualizados na Tabela 5.

3. RESULTADOS

Tabela 5. Comparação entre os resultados obtidos da viremia, eliminação do CVS-2 em suabes e perfil sorológico das G1(SRM-) e G2(SRM+).

Observação	G1	(%)	G2	(%)
Animais virêmicos em todas as coletas	9	(26)	21	(60)
Animais virêmicos em nenhuma das coletas	0	(0)	1	(3)
Animais virêmicos e sem eliminação do CVS-2 em suabes	1	(3)	0	(0)
Animais não virêmicos e que eliminavam o vírus	0	(0)	1	(3)
Virêmicos em todas as coletas com eliminação do CVS-2 em suabes em todas as coletas	6	(17)	8	(23)
Eliminação do CVS-2 em zaragatoas em todas as coletas	9	(26)	11	(31)
Animais virêmicos em pelo menos uma coleta e que eliminavam o vírus em duas coletas	6	(17)	8	(23)
Animais virêmicos em pelo menos uma coleta e que eliminavam o vírus em três coletas	8	(23)	12	(34)
Animais que eliminavam o vírus e eram virêmicos a partir da 1º coleta de forma intermitente	8	(23)	1	(3)
Animais que eliminavam o vírus e eram virêmicos a partir da 2º coleta de forma intermitente	12	(34)	25	(74)
Animais sorologicamente negativos que eliminavam o vírus e eram virêmicos PCR positivo na análise de tecidos ao abate	2	(6)	0	(0)
	33	(94)	35	(100)

Os resultados sorológicos revelaram que na 1ª coleta (maternidade), em leitões de 8 a 19 dias, 94,3% eram soropositivos para o CVS-2, na G1, apresentando uma distribuição heterogênea de títulos de anticorpos, com predomínio de baixo título (Tab 6 e Fig. 3). Na G2, 100% dos leitões amostrados eram soropositivos, com predomínio de alto título de anticorpos. Nessa fase, tanto a G1 como na G2, encontramos menor número de amostras de suabes positivas e de animais virêmicos.

Na G1, entre o final da fase de maternidade e início da creche ocorre o decaimento da imunidade materna e na 2ª coleta (creche), em animais com aproximadamente 30 a 55 dias, verificamos menores títulos de anticorpos (44,1% com baixo título e 11,8% com médio e um aumento significativo de leitões soronegativos, 44,1%), que coincide com o aumento da viremia e eliminação viral. Os animais permaneceram com menores taxas e títulos de anticorpos por um período mais prolongado (na creche e recria). Entre fase final de recria e início da terminação ocorre uma soroconversão e, na 4ª coleta verificamos um aumento dos títulos de anticorpos (65,7% com títulos de baixo a médio, 14,3% com título alto e decréscimo de animais soronegativos. Após creche e recria. Na 3ª coleta, verificamos uma diminuição dos títulos de anticorpos, com 80% dos leitões apresentando títulos que variavam entre baixo e médio (Fig. 3). As taxas de eliminação do CVS-2 em secreção e excreção aumentam com o decréscimo dos títulos de anticorpos, assim como observado na G1, após a queda da imunidade materna. Entre a fase de recria e terminação ocorre uma soroconversão e na 4ª coleta 82,3% dos animais apresentavam títulos que variavam de médio a alto e menores taxas de eliminação (Fig. 3 e 4).

Na G2, a queda da imunidade passiva ocorre

mais tardiamente, entre a creche e recria. Na 3ª coleta, verificamos uma diminuição dos títulos de anticorpos, com 80% dos leitões apresentando títulos que variavam entre baixo e médio (Fig. 3). As taxas de eliminação do CSV-2 em secreções e excreções aumentam com o decréscimo dos títulos de anticorpos, assim como observado na G1, após a queda de imunidade materna. Entre a fase de recria e terminação ocorre uma soroconversão e na 4ª coleta 82,3% dos animais apresentavam títulos que variavam de médio a alto e menores taxas de eliminação (Fig. 3 e 4).

3.2. Acompanhamento de índices zootécnicos, caracterização do manejo e levantamento de fatores de risco para a manifestação da circovirose suína.

Os principais índices zootécnicos avaliados estão destacados nas Tabelas 7 e 8. A coluna destacada em negrito e sublinhada marca o início do trabalho de coleta de material realizado nas G1(SRM-) e G2(SRM+). Foi realizado o levantamento dos dados zootécnicos por um período de seis meses antes e depois do início do trabalho na granja. A maioria dos dados permaneceu dentro dos valores aceitáveis em cada sistema de produção, segundo alvos de produtividade estabelecidos pela empresa fornecedora da genética. Entretanto, a partir de abril de 2005, na G1, ocorreu um aumento na taxa de mortalidade na fase de creche, recria/terminação. Na G2, a taxa de mortalidade da fase de creche, recria/terminação permaneceu com valores elevados durante todo o ano de avaliação. O peso de saída dos animais também permaneceu abaixo do alvo considerado satisfatório (acima de 100 kg aos 150 dias) (Sobestiansky et al., 1998).

Inserir Tab 6

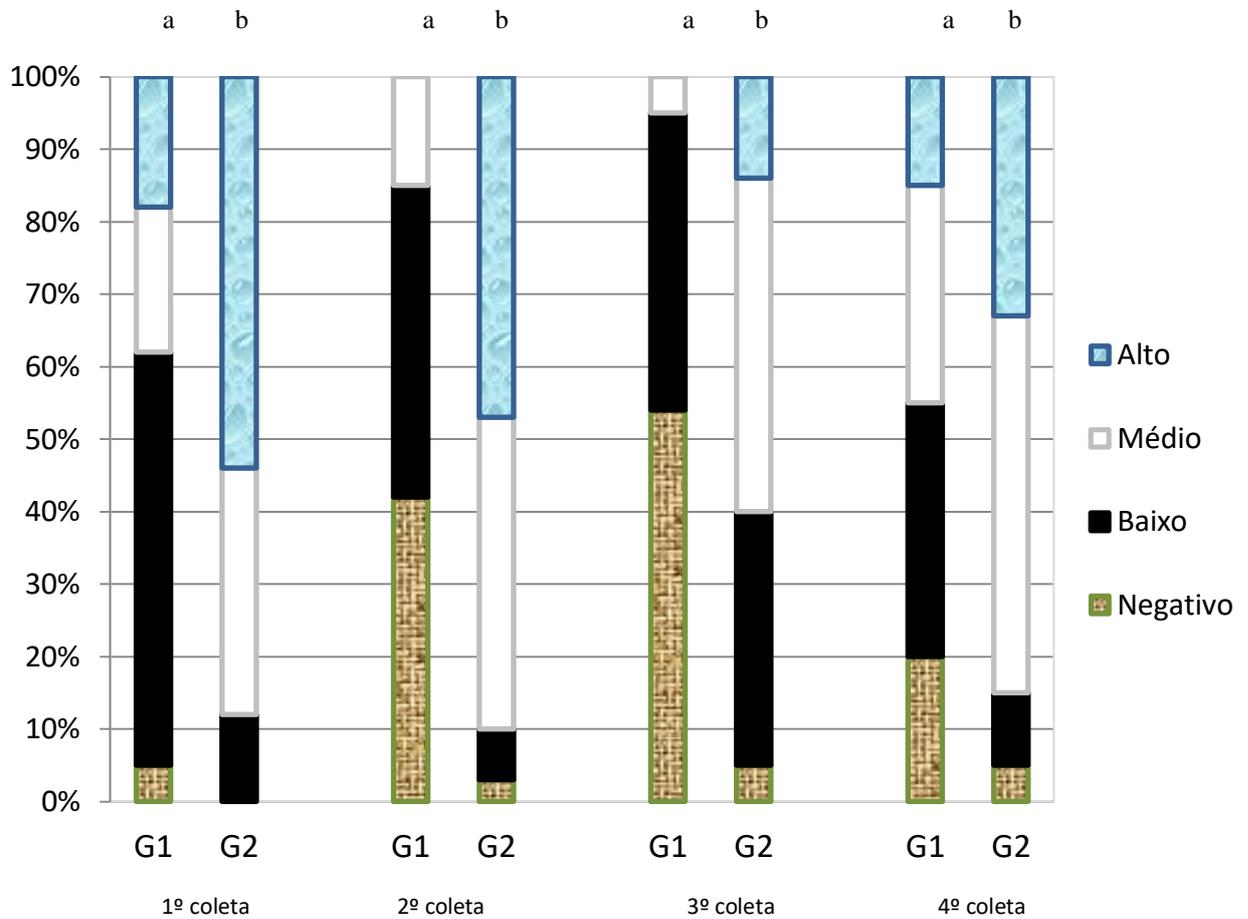


Figura 3. Distribuição dos títulos de anticorpos contra CVS-2, em amostras de soro coletadas de animais de diferentes categorias nas Granjas 1(SRM-), e 2(SRM+). Amostras negativas (título <math><20</math>), positivo com baixo título (20 e 80), positivo com título médio (320 e 1280), positivo com título alto (≥ 5120); *a e b* - Análise dos títulos de anticorpos, comparando categorias de animais das G1(SRM-) e G2(SRM+), utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Letras iguais correspondem a resultados estatisticamente iguais e letras diferentes a resultados estatisticamente diferentes. Comparação foi realizada entre colunas, na mesma categoria animal e as diferenças foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$.

Inserir Figura 4

Tabela 7. Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 1 (SRM-).

	Índices alvo	Jul. 2004	Ago. 2004	Set. 2004	Out. 2004	Nov. 2004	Dez. 2004	Jan. 2005	Fev. 2005	Mar. 2005	Abr. 2005	Mai. 2005	Jun. 2005	Jul. 2005
% mortes creche	1 a 1,5 ¹	1,3	1,1	0,8	0,9	0,6	0,4	0,7	1,4	1,7	3,8	2,1	3,2	2,5
% mortes recria/term.	1 ¹	0,2	0,5	1,5	0,8	1,1	1,3	0,7	0,7	1,0	2,5	2,7	2,6	2,8
Peso aos 21 dias	> 6 kg ²	5,9	6,1	5,7	5,5	5,6	5,8	5,9	5,8	6,1	5,9	6,4	6,4	6,4
Peso aos 63 dias	24 a 26 kg ²²	25,1	24,8	24,6	25,0	23,0	24,6	23,0	21,6	21,9	22,3	23,7	23,0	26,7
Peso aos 150 dias	100 kg ²	107,9	103,1	105,3	104,0	102,3	102,2	98,6	99,2	100,4	100,4	97,9	98,9	98,2
Nasc. totais/parto	12,5 a 14,4 ²	11,9	12,2	12,8	12,9	13,5	12,6	12,8	13,4	12,7	12,8	12,0	12,3	11,4
Nasc. vivos/parto	11,8 a 13,2 ²	11,0	11,2	11,6	11,7	12,2	11,3	11,7	11,6	11,6	11,5	10,9	11,1	10,4
Leitões desmamados	11,4 a 12,5 ²	10,6	9,7	11,2	11,2	11,3	11,0	10,8	11,0	10,6	10,9	10,2	10,3	10,0

Células destacadas em azul - Índices zootécnicos acima dos valores considerados aceitáveis para um sistema de produção. *Peso aos 21, 63 e 150 dias - são ajustados para esta idade pelo programa de gerenciamento SuinSoft; ¹ Sugestão de alvo de parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos modernos e com alta tecnologia descritos Sesti e Sobestiansky, 1998; ² Parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos com alta tecnologia para granjas com genética DB, 2005. (www.dbdanbred.com.br/resultados DB).

Tabela 8. Levantamento de dados zootécnicos, por um período de um ano (seis meses anterior e posterior ao início de trabalho de coleta de amostras) na Granja 2(SRM+).

	Índices alvo	Jun. 2005	Jul. 2005	Agor. 2005	Set. 2005	Out. 2005	Nov. 2005	Dez. 2005	Jan. 2006	Fev. 2006	Mar. 2006	Abr. 2005	Mai. 2006	Jun. 2006
% mortes creche	1 a 1,5 ¹	3,4	3,5	4,1	2,6	2,9	2,3	2,8	2,0	3,4	3,4	3,8	3,6	2,2
% mortes recria/term.	1 ¹	6,6	3,8	4,2	4,3	8,5	4,3	4,7	8,6	1,9	1,8	4,5	2,1	2,3
Peso aos 21 dias	> 6 kg ²	6,3	6,4	6,5	6,3	6,1	5,9	6,1	6,3	6,1	5,9	5,7	6,1	6,5
Peso aos 63 dias	24 a 27 kg ²	19,3	21,3	21,2	22,6	21,9	24,9	17,9	19,3	24,1	24,1	23,9	22,4	20,5
Peso aos 150 dias	100 kg ²	90,8	92,8	92,9	93,1	92,1	94,7	96,8	91,4	87,7	92,4	95,5	97,1	95,8
Nasc. totais/parto	13 a 14,5 ²	12,4	11,6	12,7	11,5	12,3	12,5	12,1	11,9	11,7	12,2	11,6	11,7	11,8
Nasc. vivos/parto	12 a 13,4 ²	10,8	10,5	11,2	10,4	11,0	11,5	11,2	10,8	10,3	10,8	10,7	10,7	10,7
Leitões desmamados	11,5 a 13 ²	10,1	10,1	9,1	10,3	9,6	10,3	10,9	10,6	9,3	9,96	10,2	9,9	9,8

Células destacadas em azul - Índices zootécnicos acima dos valores considerados aceitáveis para um sistema de produção. *Peso aos 21, 63 e 150 dias - são ajustados para esta idade pelo programa de gerenciamento SuinSoft; ¹ sugestão de alvo de parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos modernos e com alta tecnologia descritos por Sesti e Sobestiansky, 1998; ² Parâmetros de produtividade para sistemas de produção de suínos com alta tecnologia para granjas com genética Pen Ar Lan, 2005. (www.penarlan.com.br/mídia).

Os fatores predisponentes a manifestação da circovirose suína podem ser visualizados na Tabela 9. A tabela com maiores detalhes pode ser visualizada no Anexo 3.

Tabela 9. Fatores de risco para a manifestação da circovirose suína em granjas sem (G1) e scom (G2) sinais clínicos da síndrome da refugagem multisistêmica

Fatores predisponentes	G1	G2
Limpeza e desinfecção adequada	Sim	Não
Antibióticos a ração para controle de doenças	Sim	Sim
Fornecimento de água e ração à vontade	Sim	Sim
Vacinação	Rinite atrófica (em porcas)	<i>Escherichia coli</i> (em porcas) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> e <i>Streptococcus suis</i> (em leitões)
Sinais clínicos de circovirose suína	Não	Acima de 65 dias
Maternidade		
Idade de desmame	21 dias	15 a 19 dias
Manejo “todos dentro, todos fora”	Sim	Não
Creche		
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Separação e tratamento de refugos e doentes	Sim	Não
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Não
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Não
Manejo “todos dentro, todos fora”	Sim	Sim
Recria e Terminação		
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Sim
Manejo “todos dentro, todos fora”	Não	Não
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Não

4. DISCUSSÃO

O DNA do CVS-2 foi detectado no suabes nasal e retal, em animais de leitões de 8 a 100 dias de idade. Na G1 não houve diferença entre o número de amostras positivas de suabes nasal e retal e na G2 maior quantidade de suabes nasal foi positiva ($P < 0,05$). Maior número de suabes positivos foi encontrado na G2 quando comparada a G1 ($P < 0,05$). Esse resultado sugere que a via nasal pode ser utilizada como via para estudos de circulação do

vírus, principalmente em granjas com sinais clínicos da SRM. Esses dados estão em concordância com os encontrados na literatura, onde a via nasal vem sendo descrita como principal via de infecção do vírus. Segalés et al. (2005) ao realizarem a quantificação do DNA do CVS-2 em amostras de soro, suabes tonsilar, nasal, retal urinário e traqueo-bronquial observaram que suabes traqueo-bronquial, soro, suabes tonsilar, nasal, retal e urinário apresentavam maior número de resultados positivos e maiores quantidades de vírus,

respectivamente. Os mesmos autores concluíram que maior número de amostras positivas são encontrados em granjas cujos animais apresentam sinais clínicos da SRM. Entretanto, resultados encontrados por Caprioli et al. (2006), utilizando uma PCR, mostraram que havia um número similar de resultados positivos em suabes retal e tonsilar ao analisarem 12 suínos infectados experimentalmente.

Nas duas granjas estudadas, a viremia não está diretamente relacionada a presença do vírus em suabes, e animais virêmicos podem ou não eliminar o vírus em secreções e excreções. O número de animais virêmicos com suabess positivos é semelhante nas G1 e G2. O maior número de animais virêmicos está diretamente relacionado com o declínio dos níveis de anticorpos maternos (Fig. 4) e maior susceptibilidade dos leitões a uma infecção pelo vírus. Em todas as coletas realizadas observamos que os títulos de anticorpos encontravam-se bastante heterogêneos, agrupando na mesma fase animais com diferentes níveis de proteção e animais soronegativos. Fort et al. (2007) ao analisarem a presença de anticorpos neutralizantes em 72 leitões com e sem sinais clínicos da SRM observaram que um aumento de anticorpos neutralizantes coincide com menores picos de viremia e que animais com sinais clínicos apresentam uma ineficiente resposta de anticorpos neutralizantes contra o CVS-2.

A presença de anticorpos em elevado número de leitões na maternidade, com idade entre 5 e 19 dias é indicativa da transferência de anticorpos maternos. Entretanto, os títulos heterogêneos são sugestivos de que nem todos os leitões ingeriram quantidades adequadas de colostro ou que suas mães foram submetidas a uma baixa infecção pelo CVS-2 com desenvolvimento de menores títulos de anticorpos. A G2, quando comparada a G1, apresentou maiores títulos de anticorpos na fase de maternidade. Entretanto, nem

mesmo maiores títulos foram suficientes para proteger os leitões contra uma infecção, visto que as duas granjas apresentam um número similar de leitões virêmicos e que eliminam o vírus. Esse fato pode estar associado à ausência ou presença de baixa quantidade de anticorpos neutralizantes.

A detecção da viremia desde a fase de maternidade sugere uma exposição precoce dos leitões ao vírus. O fato da eliminação do vírus em leitões jovens é sugestivo de uma possível transmissão do CVS-2 das porcas para os leitões lactentes. A replicação do vírus foi demonstrada em fetos inoculados no útero, em diferentes estágios de gestação por Sanchez et al. (2001). O CVS-2 foi isolado em fetos abortados e recém nascidos por West et al. (1999) e O'Connor et al. (2001). Bogdan et al. (2001) detectaram o vírus em leitões neonatais. A transmissão do vírus via sêmen foi sugerida por Laroche et al. (1999 e 2000).

Na G1, mesmo os animais se tornando mais susceptíveis a infecção no início da creche, o aumento da circulação viral e viremia não foi suficiente para a manifestação clínica da SRM. Possivelmente, melhores condições de manejo podem estar contribuindo para diminuir o stress dos animais e não desenvolvimento de sinais clínicos. Entretanto as altas taxas de mortalidade observadas na creche, recria/terminação, a partir de abril de 2005, podem estar associadas a uma infecção subclínica com o CVS-2 e/ou *Mycoplasma hyopneumoniae*, visto que 8 meses após o término do trabalho registrou-se um surto de circovirose associado a manifestação clínica da pneumonia enzoótica (em comunicação com o veterinário que acompanhava a granja). A queda dos títulos de anticorpos acontece mais tardiamente na G2 (entre a creche e a recria) e coincide com maiores taxas de viremia, eliminação do vírus por secreções e excreções, aparecimento de sinais clínicos a partir dos 65 dias e nova mistura de animais de diferentes lotes com títulos de anticorpos heterogêneos e também presença de

soronegativos. Estudos realizados demonstram que anticorpos colostrais declinam de três a sete semanas de idade e começam a subir novamente em consequência de infecção ativa em torno de 12 semanas (Rodríguez-Arriola et al, 2002), permanecendo os animais soropositivos até o abate (Larochelle et al., 2003). A manifestação da SRM, provavelmente está mais relacionada ao decréscimo da imunidade materna, presença de baixos títulos de anticorpos, mas as falhas de manejo parecem ser os fatores determinantes.

No presente estudo, verificamos viremia em animais de 8 aos 120 dias de idade, sugerindo que o CVS-2 pode estar presente (Tab. 5). em animais infectados por um longo período de tempo. Além do mais o CVS-2 pode ser encontrado em 97,1% dos tecidos animais até os 150 dias de idade. Shibata et al. (2003) detectaram o DNA do CVS-2 em amostras de sangue, soro e suaves até 70 dias pós-infecção experimental, onde foi encerrado o acompanhamento dos animais. Krakowka et al. (2000) detectaram o DNA do CVS-2 em fezes e secreções nasais até 35 dias pós-infecção, no qual ocorreu o término do experimento. Larochelle et al. (2000) detectaram o DNA do CVS-2 até 55 dias pós infecção (final do experimento), utilizando uma nested-PCR. Bolin et al. (2001) acompanharam e detectaram o DNA do CVS-2 em amostras de tecidos até 125 dias pós-infecção experimental. No nosso estudo, a demonstração do DNA viral no sangue, simultaneamente com anticorpos circulantes, sugerem que a infecção possa ser persistente. A viremia persistente após aparecimento de anticorpos específicos indica que o desenvolvimento de uma resposta humoral não é suficiente para a eliminação do vírus do organismo provavelmente devido à ausência ou baixa quantidade de anticorpos neutralizantes. Resultado semelhante foi observado por Fort et al. (2007) ao avaliarem 72 suínos com

idade entre 2 e 4 meses.

A G1 apresentava um manejo de melhor qualidade que o realizado na G2. Entretanto apresentava alguns fatores que poderiam estar relacionados à disseminação do vírus. Falta de quarentenário e introdução de leitões diretamente no galpão de gestação, falta de acompanhamento da ingestão de colostro pelos leitões, stress térmico em animais de crescimento, falta de vazio sanitário na creche e recria e agrupamento de leitegadas na entrada da creche (Tab. 7). Na G2, podemos destacar como pontos negativos a não realização de uma limpeza e desinfecção adequada das instalações, controle ineficiente de agentes infecciosos presentes na granja, stress (térmico e presença de alta quantidade de gases no ambiente), fornecimento de colostro aos leitões não acompanhado, alta densidade animal na creche, recria e terminação, não separação de refugos, falta de tratamento de animais doentes, separação de animais em fases mais avançada das doenças, baia hospital ao lado de baias com leitões sadios e vazio sanitário insuficiente na creche, recria e terminação. Na G2 não foi adotado nenhuma medida específica para controle da circovirose suína, mesmo antes do início do trabalho de coleta das amostras.

5. CONCLUSÕES

1. CVS-2 está amplamente distribuído em leitões de todas as idades provenientes de granjas com e sem sinais clínicos da SRM, porém este estudo confirma que o perfil sorológico em um rebanho com e sem a presença de SRM pode ser diferente.
2. O sangue foi a amostra que mais frequentemente apresentou resultados positivos, sendo sugestivo de uma grande circulação do CVS-2.
3. A queda da imunidade passiva ocorre em fases diferentes em cada granja analisada e sua duração parece estar relacionada a

quantidade e o título de anticorpos transferidos da porca para os leitões.

4. A presença de anticorpos passivos não é suficiente para prevenir a infecção e viremia. Entretanto, maiores título de anticorpos parecem estar relacionados a uma menor quantidade de leitões virêmicos.

5. A detecção da viremia desde a fase de maternidade sugere uma exposição precoce dos leitões ao vírus, sendo sugestivo de uma transmissão vertical do CVS-2. A viremia não está diretamente relacionada à eliminação viral. Animais virêmicos podem ou não eliminar o vírus.

CAPITULO 4

ELIMINAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (CVS-2) NO SÊMEN DE SUÍNOS NATURALMENTE INFECTADOS

RESUMO

Foi pesquisado o DNA do CVS-2 no sêmen de machos pertencentes a dois plantéis. Coletas de sêmen intervaladas de 15 a 20 dias foram realizadas por um período de 2 meses em 5 machos no plantel 1 (P1) e em de 11 machos no plantel 2 (P2). Todos os machos testados nas duas unidades foram positivos para a presença do DNA viral no sêmen em pelo menos duas coletas, sendo que a maioria deles eliminou o CVS-2 em todas as coletas. Dois animais do P1 e três animais do P2 apresentaram de uma a duas coletas negativas intervaladas de coletas positivas. Estes resultados demonstram que o vírus pode ser intermitentemente eliminado no sêmen nos 11 machos por até 62 dias, podendo ser apontado como uma potencial via de transmissão do CVS-2 para fêmeas.

Palavras chave: Circovírus suíno 2, sêmen, reação em cadeia da polimerase (PCR)

ABSTRACT

The presence and duration of PCV-2 shedding in the semen was studied in naturally infected boars. Semen was collected serially for two months (each 15 or 20 days) from 5 boars from herd 1 (P1) and 11 boars from herd 2 (P2). All boars from both herds were positive for PCV-2 DNA by nPCR in at least two sampling dates, and most of them had detectable shedding in all sampling dates. Two boars of P1 and three of P2 had one or two negative results between positive sampling dates. These results indicate that PCV-2 virus may be shed intermittently in semen of 11 naturally infected boars for 62 days. It suggests that semen from infected boars can be a potential source of PCV2 to sows.

Keywords: Porcine circovirus 2, semen, Polymerase chain reaction (PCR)

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) encontra-se amplamente distribuída no mundo (Rodriguez-Arriola et al., 2000; Laroche et al., 2003; Rose et al., 2003) causando graves prejuízos econômicos. A rápida disseminação do vírus pelo mundo, desde sua primeira descrição em 1991, tem levantado importantes questionamentos sobre as formas de transmissão do CVS-2.

Estudos até agora realizados indicam a possibilidade de uma transmissão pelo contato direto entre animais via oronasal (Guilmoto e Sabine 2000), fecal e urinária (Margar et al., 2000; Bolin et al., 2001). Recentemente, a transmissão vertical do CVS-2 também tem sido apontada como importante maneira de passagem do vírus. A presença do CVS-2 foi detectada em leitões

neonatos (Bogdan et al., 2001). O vírus também foi isolado de fetos abortados e recém nascidos (West et al., 1999), amostras de colostro (Shibata et al., 2006), e sêmen, mas a transmissão do vírus por essas vias ainda não está comprovada (Larochelle et al., 1999, 2000).

O CVS-2 tem sido detectado em amostras de sêmen utilizando a técnica da PCR (Larochelle et al., 2000; McIntosh et al., 2006) e isolamento viral (Kim et al., 2001). Larochelle et al. (2000) observaram que a quantidade de DNA do CVS-2 no sêmen geralmente é pequena. Resultados preliminares de um experimento conduzido por Madson et al. (2007) mostraram que o CVS-2 não foi transmitido para marras não infectadas ao se utilizar o processo de inseminação artificial.

Os objetivos desse trabalho foi pesquisar a presença de CVS-2 em amostras de sêmen coletadas de machos criados em uma granja naturalmente infectada e em machos pertencentes a uma central de inseminação e acompanhar o tempo de eliminação do vírus no sêmen.

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais estudados

Foram estudados cinco machos, com idade de 1 a 3,0 anos, pertencentes a uma granja comercial (P1) e 11 machos, com idade entre 1,5 e 2 anos, alojados em uma central de inseminação (P2).

A P1 apresentava um plantel constituído de 550 matrizes e, foi caracterizada como positiva para a presença de CVS-2, baseado em quatro critérios: (1) técnica de nested-PCR em amostras de tecidos coletados de animais de 80 dias de idade; (2) visualização de sinais clínicos da síndrome no momento em que se iniciou o experimento (presença de elevado número de leitões refugos na

fase de recria, aumento de linfonodo inguinal, palidez de pele, tosse e dificuldade respiratória); (3) lesões encontradas na necropsia (rins pálidos e com petéquias, hiperplasia de polpa branca no baço, linfonodos aumentados de volume e hemorrágicos) e, (4) lesões histopatológicas tais como: nefrite intersticial linfocitocitária multifocal e presença de células gigantes multinucleadas, depleção linfóide moderada e discreta proliferação de macrófagos no baço e linfonodos, broncopneumonia intersticial aguda com infiltrado de macrófagos, hiperplasia de placas de Peyer com intensa proliferação de macrófagos. Durante o estudo, a propriedade não apresentou animais com sinais clínicos ou histórico de ocorrência da síndrome. Os machos eram alojados em baias distintas, em um galpão dentro da própria granja.

A P2 apresentava um plantel constituído por 72 animais que não apresentavam histórico de ocorrência da síndrome e eram alojados em baias individuais em um galpão.

2.2. Material coletado

Alíquotas de 2 ml do sêmen não diluído foram separadas e, posteriormente, conservadas sob congelamento a -20°C, em laboratório, até serem analisados pela técnica da nested-PCR. Foram realizadas coletas em intervalos de aproximadamente 15 a 20 dias por um período de 62 dias.

2.3. Análise laboratorial

2.3.1. Obtenção do plasma seminal

A separação do plasma seminal foi realizada utilizando o protocolo descrito por Rocha et al. (1998), com algumas modificações. Para isso, foram separados 500 µl da amostra de sêmen total, previamente homogeneizada. O sêmen foi centrifugado a 12.000g por 30

segundos em microcentrifuga, para separação da fase celular e plasma seminal. O plasma seminal obtido foi passado através de uma coluna de Sephacryl 400 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) e o filtrado estocado a -20°C até o momento do uso.

2.3.2. Nested PCR (nPCR)

A extração do DNA e o teste de nPCR foram descritos anteriormente nos ítems 2.5.1 e 2.6 do trabalho descrito no capítulo 2.

2. RESULTADO E DISCUSSÃO

A utilização da fração do plasma seminal deu-se pelo fato que os trabalhos de Larochelle et al. (2000) e Kim et al. (2001) demonstraram que nesta fração há maior recuperação do CVS-2 em relação a

amostras de sêmen total, plasma seminal e a fração celular.

Os dados obtidos na coleta e análise do sêmen dos machos pertencentes à P1 e P2 podem ser visualizados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente. Todos os reprodutores testados nas duas unidades foram positivos para a presença do DNA viral no plasma seminal em pelo menos duas coletas, por um período de até 62 dias. Larochelle et al. (2000) ao avaliarem o tempo de eliminação do CVS-2 em machos inoculados experimentalmente observaram que os mesmos eliminaram o vírus no sêmen de forma intermitente até o dia 47 pós inoculação, data no qual ocorreu a finalização do acompanhamento.

Tabela 10. Resultado da PCR em amostras de sêmen, coletadas de machos reprodutores da Granja (P1).

Dia da coleta	Machos				
	0974 3,6 anos	9091 2,9 anos	7754 1 ano	8723 1,8 anos	8930 2,7 anos
1	P	-	P	P	-
5	-	P	-	-	P
15	P	-	-	N	-
18	-	P	-	-	-
19	-	-	P	-	-
29	-	-	-	-	P
30	-	-	-	P	-
33	P	-	P	-	-
47	P	-	-	-	P
48	-	N	-	-	-
58	-	-	-	P	-
61	P	-	-	-	P
62	-	P	P	-	-

(P) coleta com resultado positivo; (N) coleta com resultado negativo; (-) amostra não coletada

Tabela 11. Resultado da PCR em amostras de sêmen, coletadas de machos reprodutores alojados em central de inseminação (P2).

Dia da coleta	Machos										
	131 1,8 anos	661 1,6anos	2084 1,9 anos	2183 1,5 anos	2579 2,0 anos	5559 1,9 anos	6137 1,5 anos	2895 2,0 anos	8063 2,0 anos	7114 1,5 anos	8489 1,8 anos
1	P	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-
9	-	P	P	P	P	N	P	-	N	-	P
14	-	P	-	P	-	P	-	-	P	P	P
23	P	-	P	-	P	-	-	P	-	-	-
30	-	P	-	-	-	P	P	-	N	P	P
32	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-
36	-	P	P	P	-	-	P	P	-	P	P
45	P	-	-	-	P	-	-	P	P	-	-

(P) coleta com resultado positivo; (N) coleta com resultado negativo; (-) amostra não coletada

Na P1, tanto o macho mais novo, animal 7754, com 1 ano de idade, quanto o mais velho, animal 0974, com 3,5 anos, apresentaram o mesmo padrão de eliminação viral (excreção do CVS-2 em todas as coletas por um período de até 60 dias). Na P2, o padrão de eliminação viral também não pode ser relacionado à idade dos animais. Este resultado não concorda com os descritos por McIntosh et al. (2006), ao testarem amostras de sêmen coletadas de 43 reprodutores. Os autores demonstraram que animais mais novos, com aproximadamente 1 ano de idade têm maior probabilidade de eliminarem o CVS-2 no sêmen quando comparado a machos mais velhos. Resultado semelhante ao descrito por McIntosh foi observado por Reicks et al. (2007) ao realizarem um estudo longitudinal da infecção pelo CVS-2 (coletas a cada quatro semanas por um período de 30 meses), em 240 machos infectados naturalmente. Os autores verificaram que o número de machos PCR positivos para sangue, soro e sêmen decrescem 7% a cada mês, a partir de nove meses de idade.

Dos 16 animais 11 (68,7%) testados foram positivos em todas as coletas e apenas 5 (31,3%) apresentaram uma ou mais coletas negativas, intervaladas de coletas positivas. A observação de coletas positivas seguidas de coletas negativas também foi descrita por Laroche et al. (2000) ao detectarem o CVS-2 em amostras de sêmen coletadas de seis machos infectados experimentalmente e acompanhados até 47 dias pós-infecção, onde ocorreu o término do trabalho.

Nas duas unidades de produção, os animais foram introduzidos com aproximadamente 130 a 150 dias de idade, sendo então, criados em baias individuais. O contato entre estes animais se dava de focinho com focinho, por intermédio de baias vazadas ou quando os mesmos eram conduzidos à sala de coleta. A liberação do vírus no sêmen pode ser devido a uma contaminação das instalações e do ambiente pelo CVS-2 no

qual os machos estavam expostos. Também não se pode descartar a possibilidade dos machos estarem infectados antes de serem introduzidos nos dois plantéis.

O elevado número de animais infectados, liberando o vírus de forma constante no sêmen, assume maior importância na central de inseminação devido à grande distribuição do sêmen coletado, para um grande número de granjas que utilizam o processo de inseminação artificial. Entretanto, estudos são necessários para determinar se o sêmen pode ou não infectar com o CVS-2 as porcas inseminadas naturalmente ou artificialmente, e para se estabelecer a necessidade de utilização de animais não infectados, adoção de programas de vacinação e outras medidas preventivas para se assegurar uma melhor qualidade do sêmen.

4. CONCLUSÕES

1. A eliminação do CVS-2 no sêmen pode ocorrer de forma intermitente, sendo esta via uma possível via de transmissão.
2. Maiores estudos são necessários para se determinar a infectividade do CVS-2 no sêmen.

5. CONCLUSÕES GERAIS

1. CVS-2 está amplamente distribuído em leitões de todas as idades provenientes de granjas com e sem sinais clínicos da SRM
2. A queda da imunidade passiva ocorre em fases diferentes em cada granja analisada e sua duração parece estar relacionada a quantidade e o título de anticorpos transferidos da porca para os leitões.
3. A presença de anticorpos passivos não é suficiente para prevenir uma infecção e viremia. Entretanto, maiores título de anticorpos parecem estar relacionados a uma menor quantidade de leitões virêmicos.

4. A detecção da viremia desde a fase de maternidade sugere uma exposição precoce dos leitões ao vírus, sendo sugestivo de uma transmissão vertical do CVS-2.

5. A viremia não está diretamente relacionada à eliminação viral. Animais virêmicos podem ou não eliminar o vírus.

6. O sangue foi a amostra que mais frequentemente apresentou resultados positivos, sendo sugestivo de uma grande circulação do CVS-2.

7. A manifestação da SRM pode estar relacionada a vários fatores: maior circulação do vírus, contaminação mais precoce dos leitões, associada à presença de baixos títulos de anticorpos anti CVS-2 e falhas no manejo.

Na granja G2 do 1º trabalho os principais fator de risco relacionado a manifestação da síndrome pareciam estar associados a queda de anticorpos passivos, baixos títulos de anticorpo e aumento da circulação do vírus. Enquanto na G2, do 2º trabalho, o principal fator parecia estar associado á falha de manejo.

A eliminação do CVS-2 no sêmen pode ocorrer de forma intermitente, sendo esta via uma possível fonte de transmissão. Entretanto, maiores estudos são necessários para se determinar a infectividade do CVS-2 no sêmen.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORALI, G. L.; SALOGNI, C.; ZANINI, M. G.; PACCIARINI, M. L.; CORDIOLI, P.; MARTELLI, P. Comparative study and virological investigation on PMWS suspected and non suspected herds in Italy. In: PROCEEDING OF THE 4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 2003, Rome, *Anais ...* Rome: International Pig Veterinary Society, 2003, p. 216-217.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; CASSIDY, J. P.; REILLY, G. A. C.; ADAIR, B.; ELLIS, J. A.; McNULTY, M.S.; Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Veterinary Microbiology*, v. 44, p. 49-64, 1995.
- ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B. M.; KENNEDY, S.; MACKIE, D. P.; ELLIS, J. A.; CLARK, E. G.; ESPUÑA, E.; SAUBI, N.; RIERA, P.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C. E. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, v. 66, p. 115-123, 1999.
- ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, p. 3-14, 2000.
- ALLAN, G.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S. Immunoestimulation, PCV-2 and PMWS. *Veterinary Record*, v. 147, p. 170-171, 2000a.
- ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MEEHAN, B. M.; McNAIR, I.; WALKER, I.; KENNEDY, S. Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiate PCV2 replication. *Archives of Virology*, v.145, p. 2421-2429, 2000b.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; MEEHAN, B.; MARSHALL, M.; ELLIS, J.; LASAGNA, C.; BORIOSI, G.; KRAKOWKA, S.; REYNAUD, S.; BOEUF-TEDESCHI, L.; BUBLOT, M.; CHARREYRE, C. Passive transfer of maternal antibodies to PCV2 protects against development of PMWS: experimental infection and a field study. *The Pig Journal*, v. 50, p. 59-67, 2002.
- BABINSZKY, L.; LANGHOUT, D. J.; VERSTEGEN, M. W. A.; DenHARTOG, L. A.; JOLING, P.; NIEUWLAND, M. Effect of vitamin E and fat source in sows' diets on immune response of suckling and weaned piglets. *Journal of Animal Science*, v.69, p.1833-1842, 1991.
- BAEKBO, P.; HASSING, A. G. How to control PMWS in affected herds. In: 18th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS PROCEEDINGS, 2003, Hamburg, *Anais ...* Hamburg: International Pig Veterinary Society, 2003, v. 2, p. 806
- BARBOSA, C. N. *Circovírus suíno-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunistoquímica e estudos sorológicos*, Minas Gerais. 2005. 96f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BARCELLOS, D. A; PESCADOR, C. E. Circovirose suína. *Sanidade em Foco*, v. 6, p. 3, 2003.
- BOGDAN, J.; WEST, K.; CLARK, E.; KONOBY, C.; HAINES, D.; ALLAN, G.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995 – 1998. *Canadian Veterinary Journal*, v. 42, p. 548-550, 2001.
- BOLIN, S.R.; STOFFREGEN, W. C.; NAYAR, G. P. S.; HAMEL, A. L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrums-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, p. 185-194, 2001.

- BOREL, N.; BURGI, E.; KIUPEL, M.; STEVERSON, G. W.; MITTAL, S. K.; POSPISCHIL, A.; SYDLER, T.; Three cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) due to porcine circovirus type 2 (PCV2) in Switzerland. *Schweiz Archives. Tierheilkd.* v. 143, p. 249-255, 2001.
- BRITO, L. A. B.; SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M. P. C.; SEGALÉS, J. Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína. In: circovirose suína e circovírus suíno. 2002.
- BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C. M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a taqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methodos*, v. 122, p. 171-178, 2004.
- BURCH, D. Circovirus sheds through the nose. *The Pig International*, setembro, p. 16-19, 2007.
- CADAR, D.; CSÁGOLA, A.; DAN, A.; DEIM, Z.; SPINU, M.; MICLÁUS, V.; KOBOLKUTI, L.; CZIRJAK, G.; TUBOLI, T. Porcine circovirus type 2 and associated disease in Romania. *Acta Veterinaria Hungary*, v. 55, n. 1, p. 151-156, 2007.
- CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; QUINTANA, J.; ROSSEL, C.; DOMINGO, M. Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1848-1850, 2002.
- CALSAMIGLIA, M.; FRAILE, L.; ESPINAL, A.; CUXART, A.; SEMINATI, C.; MARTÍN, M.; MATEU, E.; DOMINGO, M. SEGALÉS, J. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Research in Veterinary Science*. v.81, p. 287-292, 2006.
- CAPRIOLI, A.; OSTANELLO, F.; DI FRANCESCO, A.; BATTILANI, M.; SALA, G.; SARLI, G.; MANDRIOLI, L.; PROSPERI, S. Influence of specific material antibodies on the development of experimental infection with porcine circovirus type 2 (PCV2). In: 18th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS PROCEEDINGS, 2003, Hamburg, *Anais ... Hamburg: International Pig Veterinary Society*, 2003, v. 1, p. 52.
- CAPRIOLI, A.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; LAGAN-TREGASKIS, P.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; McKILLEN, J.; OSTANELLO, F.; ALLAN, G. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal zaragoatoas from experimentally infected pigs. *Research in Veterinary Science*, v.81, p.287-292, 2006.
- CARRASCO, L.; SEGALÉS, J.; BAUTISTA, M. J.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; ROSSEL, C.; RUIZ-VILLAMOR, E.; SIERRA, M. A. Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Veterinary Record*, v. 146, p. 21-23, 2000.
- CASAROVA, P.; CELER, V.; TAKACOVA, M.; TTRUNDOVA, D.; MOLINKOVA, D.; LOBOVA, D.; SMOLA, J. the level of PCV-2 specific antibodies and viremia in pigs. *Research in Veterinary Science*, 2007.
- CASTRO, A. M. M. G.; RUIZ, V. L. A.; CASTRO Jr, F. G.; BERSANO, J. G.; MORENO, A. M.; CORTEZ, A.; VILLALOBOS, E. M. C.; LEOMIL, H.; RICHTZENHAIN, L. J. Detecção e diferenciação do circovírus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos abatidos no estado de São Paulo. IN: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2003, Goiás, *Anais...Goiás: ABRARES*, 2003, p. 107-108.
- CASTRO, A. M. M. G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed analysis of the of cap gene (ORF-2). *Archive of Virology*, 2007.

- CAVALCANTE, J. E. Síndrome da Refugagem Pós-Desmama dos leitões- Abordagem de campo. Palestra apresentada no VII Encontro Técnico da Associação Brasileira dos Criadores de Suínos de Minas Gerais (ABRAVES-MG), 4 de outubro de 2002. Escola de Veterinária: UFMG. Belo Horizonte-MG.
- CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of a etiology, diagnosis and pathology. *The Veterinary Journal*, v. 168, p. 41-49, 2004.
- CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and disease. *The Veterinary Journal*, v. 169, n. 3, p. 326-336, 2005.
- CHARREYRE, C.; BÉSÉME, S.; BRUN, A.; BUBLOT, M.; JOISEL, F.; LAPOSTOLLE, B.; SIERRA, P.; VAGANAY, A. Vaccination strategies for the control of circoviral disease in pigs. In:INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL CIRCOVÍRUSES AND ASSOCIATED DISEASE, 2005, Belfast, *Anais ... Belfast: Queen's University*, 2005, v. 9, p. 26-30.
- CHIANINI, F.; MAJO, N.; SEGALES, J.; DOMINGUEZ, M. Immunohistochemical characterization of PCV2 associate lesions lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural posweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v. 94, p. 63-75, 2003.
- CHOI, C.; CHAE, C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephropathy syndrome by double-labeling technique. *Veterinary Pathology*, v. 38, p. 436-441, 2001.
- CHOI, C.; CHAE, C.; CLARK, E. G. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pigs: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.12, p. 151-153, 2000.
- CHOI, C.; KIM, J.; KANG, I. J.; CHAE, C. Concurrent outbreak of PMWS and PDNS in a herd of pigs in Korea. *Veterinary Record*, v. 151, p. 484-485, 2002.
- CLARK, E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: PROCEEDING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1997, *Anais ... 1997*, v. 28, p. 499-501.
- COSTA, A.T.R.; LOBATO, Z.I.P.; REIS, R.; FERREIRA, H.B.C.; CAMPOS, F.; OLIVEIRA, T.M.L., SILVA, X.M. Avaliação da viremia e perfil sorológico em leitões vacinados e não vacinados com vacina autógena experimental contra PCV2. IN: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2007, Florianópolis, *Anais ... Florianópolis: ABRAVES*, 2007, p.269-70.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v.9, n. 2, p. 236-242, 2002.
- DARWICH, L.; PIE, S.; ROVIRA, A.; SEGALES, J.; DOMINGO, M.; OSWALD, L. P.; MATEU, E. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of General Virology*, v. 84, p.2117-2125, 2003.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by *Porcine circovirus 2*: an immune riddle. *Archives of Virology*, v. 149, n. 5, p. 857-874, 2004.
- DBDANBRED. Resultados DB. Disponibilidade <[www.dbdanbred.com.br/resultados DB](http://www.dbdanbred.com.br/resultados_DB)>. Acesso em 21/01/2008.
- DROLET, R.; THIBAUT, S.; D'AILLAIRE, S.; THOMSON, J.; DONE, S.; Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Swine Health and Production*, v.7, p. 283-285, 1999.

- DURAN, C. O.; RAMOS-VARA, J.; RENDER, J. A. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a new condition to include in the differential diagnosis list for skin discoloration in swine. *Swine Health Production*, v.5, n.6, p. 241-244, 1997.
- ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HADING, J.; ALLAN, A.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, v.39, p. 44-51, 1998.
- ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIMORE, M.; HAINES, D.; BRANTANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, G.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1999a.
- ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.; CLARK, E. G.; KENNEDY, S. The clinical scope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus has expanded since 1987; an alternative perspective. *Veterinary Pathology*, v. 36, p. 262-265, 1999b.
- ELLIS, J. A.; BRATANICH, A.; CLARK, E. G.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; HAINES, D. M.; HARDING, J.; WEST, K. H.; KRAKOWKA, S.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MARTIN, K.; McNEILLY, F. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, p. 21-27, 2000.
- FENAUX, M.; HALBUR, P. G.; GILL, M.; TOTH, T. E.; MATH NG, X. J. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR restriction fragment length polymorphism assay to detect and Differentiate between infection with PCV1 and PCV2. *Journal Clinical Microbiology*, v. 38, p. 2494-2503, 2000.
- FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, G.; MENG, X. J. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infections DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV-2) and nonpathogenic PCV1 in weaning pigs. *Journal of Virology*. v. 72, p. 11232-11243, 2003.
- FENAUX, M. T.; OPRIESSING, P.; HALBUR, G.; ELVINGER, F.; MENG, X. J. Two amino acid mutation in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *Journal of Virology*, v. 78, p. 13440-13446, 2004.
- FARNHAM, Mc D. W.; CHOI, Y. K.; GOYAL, S. M.; JOO, H. S. Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from será of stillborn fetuses. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 67, p. 108-113, 2003.
- FORT, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary Microbiology*, p. 1-12, 2007.
- GARKAYENKO, O.; ELLIOTT, R. B.; CROXSON, M. C. Identification of pigs circovirus type 2 in New Zealand pigs. *Transplant Procedure*, v.37, n.1, p.506-509, 2005.
- GAUVREAU, H.; O'CONNOR, B. Porcine circovirus type 2 associated with reproductive failure in gilts: a case report. In: PROCEEDING OF THE EASTERN CANADIAN ASSOCIATION ON SWINE PRACTITIONERS, 1999, *Anais ... 1999*, p.74-75.
- GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LÓPES-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, 2007.

- GUILMOTO, H.; SABINE, W. B. Control of PMWS in Brittany- a mainly zootechnical approach. IN: POST-WEANING MULTISYSTEMIC WASTING SYNDROME (PMWS) – A NEW EMERGING DISEASE OF SWINE, 2000, Melburn, *Anais ... Melburn: Merial*, 2000, p.45-55.
- HALBUR, P. G. Porcine respiratory disease. In: PROCEEDING OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 1998, *Anais ... 1998*, v. 15, p. 1-10.
- HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Immunology, pathogenesis and control of PCV2-associated disease. In: PROCEEDING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 2004, Iowa, *Anais... Iowa: American Association of Swine Veterinarians*, 2004, p.27-38.
- HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. S. Nucleotide sequence of porcine circoviruses associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pig. *Journal Virology*, v. 72, p. 5262-5267, 1998.
- HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G.P.S. PCR detection and characterization of type 2 porcine circovirus. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 5, p.201-203, 2000.
- HARDING, J. C. S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Veterinary Microbiology*, v. 98, p. 131-135, 2004.
- HARDING, J. C. S.; AUCLAND, C.; TUMBER, A.; McINTOSH, K. A.; PARKER, S.; HUANG, Y.; MIDDLETON, D.; HILL, J.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S. Assessment of viral load in clinical and subclinical pigs naturally infected with the novel PCV2b: Implication for the control and prevention of PMWS/PCVD. In: ALLEN D. SWINE CONFERENCE, 2007, *Anais ... American Association of Swine Veterinarians*, p. 112-113.
- HASSING, A. G.; WACHMANN, H.; BOTNER, A.; NIELSEN, J.; VIGRE, H.; FEENSTRA, A. Effect of PMWS pig serum and PCV-2 specific serum on mortality and weight gain in PMWS affected herds. In: 19th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS PROCEEDINGS, 2006, Copenhagen, *Anais ... Copenhagen: International Pig Veterinary Society*, 2006, v. 1, p.157.
- HINES, R. K.; LUKERT, P. D. Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. In: PROCEEDING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 1994, *Anais ... 1994*, p. 344-345.
- JANKE, B. Case report: porcine circovirus as a cause of reproductive problems. In: PROCEEDING OF THE IOWA VETERINARY MEDICINE ASSOCIATION, 2000, Iowa, *Anais ... Iowa: Veterinary Medicine Association*, 2000, p. 101.
- JOISEL, F.; RANDOUX, S.; LONGO, S.; CHARREYRE, C.; SCHADE, A. Field evaluation of the effects of a PCV2 vaccine (CIRCOVAC) in Germany during the exceptional license process. In: 19th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS PROCEEDINGS, 2006, Copenhagen, *Anais ... Copenhagen: International Pig Veterinary Society*, 2006, p.1036.
- JONHSON, C.S.; JOO, H.S.; DIREKSIN, K.; YOON, K.J.; CHOI, Y.K. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *Journal of Veterinary Investigation*. V. 14, p. 507-512, 2002.
- JORSAL, S. E. PMWS- laboratory diagnosis on herd and pig level in a Danish case-control study. In: 19th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS PROCEEDINGS, 2006, Copenhagen, *Anais ... Copenhagen: International Pig Veterinary Society*, 2006, p.270.
- KENNEDY, S.; ALLAN, G.; McNEILLY, F.; ADAIR, B. M.; HUGHES, A.; SPILLANE, P. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Veterinary Record*, v. 142, p. 495-496, 1998.
- KENNEDY, S.; SEGALÉS, J.; ROVIRA, A.; SCHOLLES, S.; DOMINGO, M.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.; O'NEILL, R.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 15, p.151-156, 2003.

- KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *Journal of Virological Methods*, v. 92, p. 105-111, 2001a.
- KIM, J.; CHAE, C. Differentiation of porcine 1 and 2 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by in-situ hybridisation. *Research in Veterinary Science*, v. 70, p. 265-269, 2001b.
- KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with hybridization. *Journal of Virological Methods*, v.92, p.105-111, 2001c.
- KIM, J.; CHAE, C. Double in situ hybridization for simultaneous detection and differentiation of porcine circovirus 1 and 2 in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Veterinary Journal*, v. 164, p. 247-253, 2002a.
- KIM, J.; CHAE, C. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, p.236-240, 2002b.
- KIM, J.; HAN, DU; 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 Virologic Methods*, v. 98, p.25-31, 2001.
- KIM, L.; CHUNG, H. K.; JUNK, T.; CHO, W. S.; CHOI, C.; CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, p.57-62, 2002.
- KIM, L.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal*, v.166, p. 251-256, 2003.
- KIM, J.; JUNK, K.; CHAE, C. Prevalence and detection of porcine circovirus 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Records*, 2004.
- KISS, I.; KECSKEMETI, S.; TUBOLY, T.; BAJMOCY, E.; TANYI, J. New pig disease in Hungary: postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 48, p. 469-475, 2000.
- KIUPPEL, M.; STEVERSON, G. M.; MITTAL, S. K.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M. Circovirus-like viral associated tissues in weaned pigs in Indiana. *Veterinary Pathology*, v. 35, p. 303-307, 1998.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Pathology*, v. 37, p. 254-263, 2000.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; McNEILLY, F.; RINGLER, S.; RINGS, D. M.; ALLAN, G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting syndrome disease in pigs infected with porcine circovirus -2 (PCV-2). *Veterinary Pathology*, v. 38, p. 31-42, 2001.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; McNEILLY, F.; GILPIN, D.; MEEHAN, B.; McCULLOUGH, K.; ALLAN, G. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. *Viral immunology*, v. 15, n. 4, 2002.
- KRISTENSEN, C. S.; BILLE-HANSEN, V.; VIGRE, H.; BOTNER, A.; BAEKBO, P.; ENOE, C.; LARSEN, L. E. Transmission of PMWS between pen mates. In: 19th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS PROCEEDINGS, 2006, Copenhagen, *Annals ... Copenhagen: International Pig Veterinary Society*, 2006, p.162.

- LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M.; MAGAR, R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 80, p. 69-75, 1999.
- LAROCHELE, 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, p. 4629-4632, 2000.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 67, p. 114-120, 2003.
- LOBATO, Z. I. P.; BORGES, I.; GERBER, P.; CAMPOS, F.; GALINARI, G.; XAVIER, M.; COSTA, A. PCV2 serological profile of Brazilian farrow-to-finish barns. In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 2007, Krakow, Anais ... Krakow, 2007.
- LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; ROSE, N.; VINAS, M. J.; BLANCHARD, P.; MADEC, F.; JESTIN, A.; CASAL, J.; DOMINGO, M. Na exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 97-107, 2005.
- LUKERT, P. D. Porcine circovirus. In: STRAW, B. et al. (Ed.). *Disease of swine*. 8^o ed. Iowa: Academic Press, 1999. p. 119-124.
- MADEC, 2001. Control of PMWS and PDNS. Acessível no endereço "www. Thepigsite.com". Acesso em 27/10/2007.
- MADSON, DM; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P. G. Characterization of semen shedding of different genotypes of PCV-2, association with viremia, and determination of infectivity of PCV-2 positive semen. In: PROCEEDING OF THE NCCVDL, 2007, Anais ... 2007, p. 46-47.
- MALDONATO, J.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; LLOPART, D.; SIBILA, M.; LAPUZ, Z.; RIERA, P.; ARTIGAS, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the Philippines: porcine circovirus type 2 (PCV2) detection and characterization. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 66, n. 5, p.533-537, 2004.
- MARGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in waned pigs: a sequential study. *Journal of Comparative Pathology*, v.123, p.258-269, 2000.
- MARTELLI, P.; TERRENI, M.; AMENA, N.; MORVAN, H.; CAVIRANI, S. Involvement of PCV2 in an outbreak of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Italy. In: PROCEEDING OF THE 16th International pig veterinary society congress, 2000, Melburn, Anais ... Melburn, 2000, p. 634.
- MARTIN, S. W.; DEEK, A. H.; WILLENBERG, P. *Veterinary Epidemiology: principal and methods*. Iowa: University Press, 1987, p. 256.
- Mc CULLOUGH, K.; VINCENT, I. E.; SUMMERFIELD, A.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; SEGALÉS, J.; ALLAN, G. M. The Immunology of PCV2 infections. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 2007, Anais ... American Association of Swine Veterinarians, 2007.
- McINTOSH, K. A.; HARDING, J. C. S.; 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. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.70, p.58-61, 2006.
- McKEWON, N. E.; OPRIESSNIG, T.; THOMAS P.; GUENETTE, D. K.; ELVINGER, F.; FENAUX, M.; HALBUR, P. G.; MENG, X. J. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.12, p.1347-1351, 2005.

- McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B. M.; FOSTER, J. C., CLARKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; ADAIR, B. M. ALLAN, G. M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virological Methods*, 80, 123-128, 1999.
- MEEHAN, B. M.; McNEILLY, F.; TOOD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V. A.; ELLIS, J. A.; RD, L. E.; CLARK, E. G.; HINES, D. M.; ALLAN, G. M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal Genetic Virology*, v. 79, p. 2171-2179, 1998.
- MEEHAN, B. M.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; WALKER, I.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. M. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sows abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology*, v.146, p.835-842, 2001.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; LEFEBVRE, D.; NIELSEN, J.; BOTNER, A.; KRISTENSEN, C. S.; NAUYNCK, H.J.; Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV-2-associated disease. *BMC Veterinary Research*, V.2, p. 1-11, 2006.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; MORGAN, M. K.; YOON, K. J.; PAUL, P. S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.2535-2541, 1998.
- MOTOVISKI, A.; SEGALÉS, J. First report of PCV-2 associated diseases in Bulgaria. *Veterinary Record*, v. 6, p. n.154, p.311-312, 2004.
- NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.R.; HARMS, A.; SORDEN, S.D.; PAUL, P.S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 2281-2287, 2000.
- NAUWYNCK, H.; LEFEBURE, D.; MISINZO, G.; MEERTS, P.; MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.; DELPUTTE, P. Pathogenesis of porcine circovirus 2 infections. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS, 2007, *Anais ... American Association of Swine Veterinarians*, 2007.
- NIELSEN, J.; VINCENT, I. E.; BOTNER, A.; LADEKJAER-MIKKELSEN, S. A.; ALLAN, G.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. C. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. V. 92, p. 97-111, 2003.
- NUÑEZ, A.; McNEILLY, F.; PAREA, A.; SANCHEZ-CORDON, P. J.; HUERTA, B.; ALLAN, G.; CARRASCO, L. Coinfection by cryptosporidium parvum and porcine circovirus type 2 in weaning pigs. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 50, p. 255-258, 2003.
- O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E.G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal*, v. 42, n.7, p. 551-553, 2001.
- OHLINGER, V. F.; SCHMIDT, U.; PESCH, S. Studies on pathogenetic aspects of the post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: PROCEEDING OF THE 16th INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 2000, Melburn, *Anais ... Melburn*, 2000, p. 577.
- OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome natural affected pigs. *Journal of Virological Methods*, v.117, p.75-80, 2004.

- ONUKE, A.; ABE, K.; TOGASHI, K.; KAWASHIMA, K.; TANEICHI, A.; TSUNEMITSY, H. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Scienci*, v. 61, p. 1119-1123, 1999.
- OPRIESSNIG, T.; YU, S.; THACKER, E. L.; HALBUR, P. G. Derivation of porcine circovirus type 2 negative pigs from positive sow herd. *Journal of Swine Health Production*, v.12, p.186-191, 2004.
- OSTANELLO, F.; CAPRIOLI, A.; Di FRANCESCO, A.; BATTILANI, M.; SALA, G.; SARLI, G.; MANDRIOLI, L.; Mc NEILLY, F.; ALLAN, G. M. ; PROSPERI, S. Experimental infection of 3 week old conventional colostrums fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, v.108, p. 179-186, 2005.
- PALLARES, F. J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S. D.; VILLAR, D.; JANKE, B. H.; YAEGER, M. J.; LARSON, D. J.; SCHWARTZ, K. J.; YOON, K. J.; HOFFMAN, L. J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, p. 515-519, 2002.
- PARK, J. S.; KIM, J.H.A Y.; JUNK, K.; CHOI, C.; LIM, J. K.; KIM, S.H.; CHAE, C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *Journal of Comparative Pathology*, v.132, p. 139-144, 2005.
- PENSAERT, M. B.; SANCHEZ Jr., R. E.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; ALLAN, G.M.; NAUWYNCK, H. J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.175-183,2004.
- PENARLAN DO BRASIL. Disponibilidade < www.penarlan.com.br/mídia>. Acesso em 21/01/2008.
- PINTO, F. F.; LOBATO, Z. I. P.; NASCIMENTO, E. F.; ROCHA, M.A.; BARBOSA, C.N. Detecção do circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) em tecidos coletados de suínos do estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2003, 11, Goiás. *Anais...Goiás: ABRAVES*, 2003, p. 109-110.
- QUINTANA, J. SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CLSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJO, G.; CHIANINI, F.; FOLCH, J. M.; MOLDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Diagnostic profile of a conventional pig farm with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Record*, v. 149, p. 357-361, 2001.
- RAMOS-VARA, J. A.; DURAN, O.; RENDER, J. A.; CRAFT, D. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in the USA. *Veterinary Record*, v. 141, p.479-480, 1997.
- REICKS, D. L.; DAVIES, P. R.; ROSSOW, K. Cross-section and longitudinal studies of PCV-2 infection in 4 boar studs. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 2007, American Association of Swine Veterinarians, 2007, p. 104-109.
- ROCHA, M.A.; BARBOSA, E. F.; GUIMARÃES, S. E. F.; NETO, E.; GOUVEA, A. M. G. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in sêmen of naturally infected bulls. *Veterinary Microbiology*, v. 63, p. 1-11, 1998.
- RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALES, J.; BALASCH, M.; ROSSEL, C.; QUINTQNJ, J.; FOLCH, J. M.; PLANA-DURAN, J.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Veterinary Record*, v. 146, p. 762-764, 2000.
- RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALES, J.; CALSAMIGLIA, M.; RESENDES, A. R.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; CASAL, J.; DOMINGO, M. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herdo f pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, v.63, p.354-357, 2002.

- ROSE, N.; LAROUB, G.; Le DIGUERGER, G.; EVENO, E.; JOLLY, J. P.; BLANCHARD, P.; OGER, A.; Le DIMNA, M.; JASTIN, A.; MADEC, F. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 french farrow-to-finish hards. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 61, p. 209-225, 2003.
- ROSE, N.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; GRASLAND, B.; AMENNA, N.; OGER, A.; DURAND, B.; BALASH, M.; JESTIN, A.; MADEC, F. vaccination of porcine circovirus type 2 infected sows against porcine parvovirus (PPV) and erysipelas: effect on post-weaning multissistêmica wasting síndrome (PMWS) and on PCV2 genome load in the offspring. *Journal of Comparative Pathology*, v.136, p.133-144, 2007.
- ROSSEL, C, SEGALÉS, J.; PLANA-DURAN, J.; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; LATIMER, K. S.; DOMINGO, M.; Pathological immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of Postweaning multisystemic wasting Syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, v.120, p.59-78, 1999.
- ROSSEL, C, SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J. A.; FOLCH, J. M.; RODRÍGUEZ-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. *Veterinary Records*, v. 146, p.40-43, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2201, v. 3. p. A8.9-A8.21.
- SANCHEZ Jr, R. E.; NAUWYNCK, J. H.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. M.; PENSAERT, M. B. Porcine circovirus 2 infection in swine fetus inoculated at different atages of gestation. *Veterinary Microbiology*, v. 83, p. 169-176, 2001.
- SÁNCHEZ Jr., R. E.; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H. J.; PENSAERT, M. B. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Veterinary Microbiology*, 95, 15-25, 2003.
- SARLI, G.; MANDRIOLI, L.; LAURENTI, M.; SIDOLI, L.; CERATI, C.; ROLLA, G.; MARCATO, P. S. Immunohistochemical characterization of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 83, 53-67, 2001.
- SEGALÉS, J.; SITJAR, M.; DOMINGO, M.; DEE, S.; DEL POZO, M.; NOVAL, R.; SACRISTÁN, C.; DE LAS HERAS, A.; FERRO, A.; LATIMER, K. S.; First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Veterinary Record*, v.141, p.600-601, 1997.
- SEGALÉS, J.; ALONSO, F.; ROSSEL, C.; PASTOR, J.; CHIANINI, F.; CAMPOS, E.; LÓPES-FUERTES, L.; QUINTANA, J.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; CALSAMIGLIA, M.; PUJOLS, M.; DOMINGUÉZ, J.; DOMINGO, M. Changes in peripheral blood leukocyte population in pigs with natural postweaning multisystemic wasting síndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopatologic*, v. 81, n. 1-2, p. 37-44, 2001
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*, v. 24, p. 109-124, 2002.
- SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; DOMINGO, M. How we diagnose PMWS. In 4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 2003, Rome, *Anais ... Rome*, 2003.
- SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, M.; DOMINGO, M. quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, trachea-bronquial, urinary and faecal zaragatoas of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, v. 111, p. 223-229, 2005.

- SEGALÉS, J.; MATEU, E. Immunosuppression as a feature of postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Veterinary Journal*, v. 17, p. 396-397, 2006.
- SEGALÉS, J.; LARSEN, L.; WALLGREN, P.; ROSE, N.; GRAU-ROMA, L.; SIBILA, M.; FRAILEL, L.; CASALL, J.; BAEKBO, P. What do we know on epidemiology, control and prevention of porcine circovirus disease? In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 2007, Krakow, Anais ... Krakow, 2007.
- SESTI, L. A.; SOBESTIANSKY, J. Suinocultura intensiva. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTS, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. Aspectos da produtividade. 1^o Ed., Brasília. Embrapa SPI, 1998, cap 2, p. 27-43.
- SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal and nasal swabs from experimentally infected pigs and field cases. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 65, p. 405-408, 2003.
- SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; KITAJIMA, K.; ASAI, T. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 53, p. 278-280, 2006.
- SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; BLANCHARD, P.; BADIELLA, L.; LE DIMNA, M.; JASTIN, A.; DOMINGO, M. Use of polymerase chain reaction assay and ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, v. 65, p. 88-92, 2004.
- SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO JR. P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M.; Circovirose suína e circovirus suíno. *Sanidade em Foco*, v.4, p.52, 2002.
- SORDEN, S.D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Swine Health and Production*, v.8, p.133-136, 2000.
- SPILLANE, P.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; ALLAN, G. Porcine circovirus infection in the Republic of Ireland. *Veterinary Record*, v. 143, p. 511-512, 1998.
- STEVENSON, G. W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S. K.; CHOI, J.; LATIMER, K. S.; KANITS, C. L. Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, p.57-62, 2001.
- THACKER, E. L.; Porcine respiratory disease complex-what is it and why does it remain a problem? *The Pig Journal*, v.48, p.66-70, 2001.
- TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralb. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hungaria*, v. 225, p. 153-167, 1974.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archive of Virology*, v. 91, p. 271-276, 1986.
- TOOD, D. Circovirose: immunosuppressive to avian species: a review. *Avian Pathology*, v. 29, p. 373-394, 2000.
- TRUJANO, M.; IGLESIAS, G.; SEGALÉS, J.; PALACIOS, J. M. PCV2 emaciated pigs in Mexico. *Veterinary Record*, v. 148, p. 792, 2001.
- VANDEPUTTE, J.; TOO, H. L.; NG F.K.; CHEN, C.; CHAI, K.K.; LIAO, G. A.; Adsorption of colostrum antibodies against classical swine fever, persistence of maternal antibodies, and effect on response to vaccination in baby pigs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 1805-1811, 2001.
- VIGRE, H.; ERSBOLL, A. K.; SORENSEN, V. Decay of acquired colostrum antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs. *Journal of Veterinary Medicine B Infection Disease Veterinary Public Health*, v. 50, p. 430-435, 2003.

VINCENT, I. E.; CARRASCO, C. P.; HERRMENN, B.; MEEHAN, B. M.; ALLAN, G. M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. C. Dendritic cell harbor infection PCV-2 in the absence of apparent modulation of the cells or replication of the virus. *Journal of Virology*. V. 77, p. 13288-13300, 2003.

VINCENT, I. E.; CARRASCO, C. P.; GUZYLARK-PIRIOU, L.; HERRMENN, B.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. M.; SUMMERFIELD, A.; McCULLOUGH, K. C. Sus-set-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology*, v. 115, p. 388-398, 2005.

WELLENBERG, G. J.; WELLENBERG, G. J.; PE WELLENBERG, G. J.; SCH, S.; BERNDSEN, F. W.; STEVERINK, P. J.; HUNNEMAN, W.; VAN DER VORST, T. J.; PEPERKAMP, N. H.; OHLINGER, V. F.; SCHIPPERS, R.; VAN OIRSCHOT, J. T.; DE JONG, M. F. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting

syndrome in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, v. 22, p. 167-172, 2000.

WEST, K. H.; BYSTROM, J. M.; WOJNAROWICH, C.; SHANTZ, N.; LACOBSON, M.; ALLAN, G. M.; HAINES, D. M.; CLARK, 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, v. 6, p. 530-532, 1999.

WHITE, M.; HIGGINS, R. J. Dermatitis nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, v. 132, p. 199, 1993.

ZANELLA, C. J. R.; MORÉS, N.; SCHIOCHET, M. F.; TROMBETTA, C. Diagnóstico molecular e caracterização do circovirus suíno tipo 2 isolados no Brasil. IN: X CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2001, Porto Alegre, *Anais ...* Porto Alegre: ABRAVES, 2001, p. 97-98.

ANEXO 1

(Técnicas utilizadas para análise das amostras coletadas nas granjas)

1. Extração do DNA

1.1. Amostras de suabes, tecidos e sêmen

O DNA foi extraído utilizando a técnica com fenol-clorofórmio-alcool isoamílico (25:24:1) (pH 7,8 - 8,0), de acordo com Sambrook et al. (1989) onde, aos 500 µl da amostra processada foi adicionado o mesmo volume de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico, seguida por agitação em agitador tipo Vortex até obtenção de uma emulsão. O material foi deixado em banho-maria a 37°C por cinco minutos e centrifugado a 12.000 g por 15 segundos até a observação da formação de duas fases (orgânica e aquosa bem separadas). Com o auxílio de uma micropipeta, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e, para melhor aproveitamento, a fase orgânica e a interface foram re-extraídas com um volume igual de TE, pH 7,8. A interface e fase orgânica foram descartadas e, nova extração da fase aquosa com igual volume de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico foi realizada. À nova fase aquosa recuperada, foi adicionado ¼ de volume do tampão acetato de sódio 3M, juntamente com 2,5 volumes de etanol 100%. A mistura permaneceu resfriada a -20°C por 24 horas, sendo o DNA precipitado posteriormente por adição de 500 µl de álcool 70% e centrifugação a 17.000 g por cinco minutos sob refrigeração. O DNA foi ressuspensionado em 100 µl de água ultrapura e estocado a -20°C até o momento do uso.

1.2. Amostras de sangue total

Para extração do DNA das amostras de sangue, utilizou-se o Kit comercial (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras de sangue homogeneizadas (300 µl) foram transferidas para um microtubo contendo 900 µl da “Solução de Lise Celular”. Após um período de incubação de dez minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 13000-16000g por 20 segundos e o sobrenadante removido. A mistura foi agitada vigorosamente em Vortex (10 a 15 segundos), até a resuspensão das células brancas, sendo então, adicionado 300 µl da “Solução de Lise Nuclear”. Após a formação de grumos a mistura foi incubada a 37°C até que os grumos se desfizessem e foi adicionado uma “Solução de Precipitação de Proteína” (100 µl para 300 µl de volume da amostra) para a lise nuclear. A solução foi centrifugada a 13000-16000g por três minutos e o sobrenadante transferido a outro microtubo contendo 300 µl de isoproterenol. A mistura foi centrifugada a 13000-16000g por um minuto e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao volume de amostra restante, 300 µl de álcool 70%, sob leve agitação. Cuidadosamente, o etanol foi aspirado e o DNA precipitado deixado secar por 10-15 minutos. Foi adicionada uma “Solução de Rehidratação do DNA” (100 µl para 300 µl de amostra) e o DNA foi incubado a 65°C por uma hora e, posteriormente, estocado a -20°C.

2. Teste de nested-PCR (nPCR)

Amostras de suabes e sangue, foram analisadas pela nPCR, utilizando pares de iniciadores espécie-específica para a detecção do CVS-2. Para a reação externa foram utilizados os iniciadores descritos previamente por Ellis et al. (1999a), os quais amplificam um fragmento de

481 pares de bases: 5'-CGGATGTTGTAGTCCTGGT CG-3' (posição do nucleotídeo 1095-1115) e 5'-ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA-3' (posição do nucleotídeo 1570-1549). Os iniciadores utilizados na reação interna foram descritos por Kim e Chae (2001a), e amplificam um segmento de 225 pares de bases: 5'-G ATTGTATGGCGGGAGGAT-3' (posição do nucleotídeo 1286-1305), e o antisenso 5'-AT TGACGATTTGTTCCCCC-3' (posição do nucleotídeo 1510-1491). A amplificação foi realizada em um volume final de 20 μ l de uma mistura contendo 1,25 mM MgCl₂, 1X tampão PCR, 200 μ M de cada dNTP, 10,00 μ M de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Ambas as reações foram realizadas em um aparelho termociclador utilizando as mesmas condições, trinta e cinco ciclos, com temperatura de desnaturação de 95° C por um min.; anelamento dos iniciadores a 65° C por um min. e extensão a 72° C por um min. A reação finalizou-se com uma etapa de aquecimento a 72° C por dez min. para extensão final. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 2%, preparado em tampão tris-EDTA e adicionado de dois μ l de brometo de etídeo. O gel foi submetido à eletroforese (100 v), corrido em um tampão TBE (89 mM de Tris-borato, 2mM de EDTA pH 8,2). O fragmento de DNA amplificado foi localizado por luz ultravioleta e seu tamanho verificado por comparação com um marcador de tamanho molecular, com fragmentos variando de 36 a 2645 pares de bases, corrido simultaneamente com as amostras.

3. Teste de Imunoperoxidase indireta em monocamada de células (IPMC)

As amostras de soro foram analisadas pelo teste de IPMC, seguindo a metodologia descrita por Ellis et al. (1998) e Fort et al. (2007), com modificações. Para isso, uma suspensão de células PK15 com 5% de soro fetal bovino foram transferidas para uma placa de 96 pocinhos e incubada em estufa de CO₂ à 37C° por 24 horas. Em seguida, uma suspensão de CVS-2, obtido a partir de tecidos de animais com sinais clínicos de SRM, previamente identificada, titulada com soro padrão (VMRD) foi acrescentada sob as monocamadas. A placa foi incubada por 72 horas em estufa de CO₂ a 37C°. A placa foi fixada utilizando uma solução de acetona-metanol. Soros dos suínos foram diluídos em solução de albumina bovina 2% nas diluições 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 e 1:5120 e a placa incubada por uma hora em estufa de CO₂ a 37C°. A placa foi lavada duas vezes com uma solução de lavagem, composta por Tween 20 0.05% e NaCl 0.85%, e foi adicionado proteína G previamente titulada 1:3000. Após incubação por uma hora em estufa à 37C°, uma solução de revelação de AEC foi acrescentada, deixando agir por 15 minutos. A placa foi lavada com uma solução de PBS por duas vezes. A leitura foi realizada em microscópio de luz invertida, sendo considerado positivo o soro com título \geq 20. Para realizar a análise sorológica os resultados foram agrupados como: negativo (título <20), positivo com baixo título (20 e 80), positivo com título médio (320 e 1280), positivo com título alto (\geq 5120), segundo classificação descrita por Rodríguez-Arriola et al. (2000) e Calsamiglia et al. (2006).

ANEXO 2 (Questionário)

1. Identificação

Granja:
Proprietário:
Localização:
Data:
Número de matrizes:
Linhagem:
Amostras coletadas:

2. Sistema de criação dos animais

Extensiva Ao ar livre Semiconfinado
Confinado

3. Tipo de produção

Ciclo completo Produção de leitões Terminados
Reprodução
 Leitões desmamados
 Leitões para terminação
 Produção em sítio único Produção em sítios múltiplos

4. Tipo de instalações utilizadas na granja

➤ Creche
 Permite contato dos animais entre baias Não permite contato de animais entre baias
➤ Recria
 Permite contato dos animais entre baias Não permite contato de animais entre baias
➤ Terminação
 Permite contato dos animais entre baias Não permite contato de animais entre baias

5. Condições ambientais

➤ Temperatura

Temperatura ambiente registrada nos galpões:
_____ Creche _____ Recria _____ Terminação

➤ VENTILAÇÃO

Tipo de ventilação utilizada nos galpões

Ventilação natural
 Ventilação artificial Especificar (tipo, como e quando é utilizada):

6. Medidas de Manejo

Maternidade

➤ Tipo de desmama
 Convencional - 21 dias Precoce segregada Precoce segregada medicada
Idade de desmama:
➤ Transferencia cruzada de leitões
 Baixo número de transferências Elevado número de transferências

- Transferencias realizadas nas primeiras 48 horas de vida do leitão
 Transferencias realizadas após as primeiras 48 horas de vida do leitão

Creche

Formação de lotes na creche:

- Agrupamento de animais de diferentes idades Sim Não
Introdução de animais provenientes de outras granjas Sim Não

Como é o manejo de refugos ?

➤ Densidade populacional

Tamanho das baias:

Número de leitões por baia:

Recria

Formação de lotes na recria:

- Agrupamento de animais de diferentes idades Sim Não
Introdução de animais provenientes de outras granjas Sim Não

Como é o manejo de refugos ?

➤ Densidade populacional

Tamanho das baias:

Número de leitões por baia:

Terminação

Formação de lotes na terminação:

- Agrupamento de animais de diferentes idades Sim Não
Introdução de animais provenientes de outras granjas Sim Não

Como é o manejo de refugos ?

➤ Densidade populacional

Tamanho das baias:

Número de leitões por baia:

7. Nutrição

Fabricação de ração na própria granja Sim Não

Utilização de antibióticos na ração granja Sim Não

Quais ?

Em qual fase é adicionado?

Premix, Núcleo, Microminerais e Vitaminas

Montada na própria granja

Compra de empresas de nutrição

Manejo da alimentação:

Fornecimento de água:

Tipo de bebedouro utilizado:

Número de bebedouros por animais:

8. Programa sanitário

Vacinas utilizadas:

Categoria de animais vacinados:

Agentes infecciosos presentes na granja:

Medidas de controle utilizadas para os agentes presentes:

Adoção de antibioticoterapia Preventiva Terapêutica

Qual antibiótico:

Idade dos animais tratados:

Período de tratamento:

Dosagem:

9. Programa de Biossegurança

➤ Sistema de manejo das instalações

- Sistema de manejo Contínuo Sistema de manejo todos dentro-todos fora:
- | | |
|--------------------------------------|-----------------|
| <input type="checkbox"/> Maternidade | Tempo de vazio: |
| <input type="checkbox"/> Creche | Tempo de vazio: |
| <input type="checkbox"/> Recria | Tempo de vazio: |
| <input type="checkbox"/> Terminação | Tempo de vazio: |

➤ Programa de limpeza

- Limpeza diária de instalações ocupadas Limpeza após a saída dos animais

Outros

Detergentes:

Mecanismos de limpeza:

➤ Programa de desinfecção

Limpeza prévia Sim Não

Desinfetante utilizado:

Concentração da solução:

Tempo de ação:

➤ Outras medidas de limpeza e desinfecção adotados:

➤ Destino de animais mortos

- Enterramento Colocação das carcaças em poços cobertos
 Incineração Compostagem

9.1 Acesso de pessoas e veículos na granja:

- Veículos

Presença de rodolúvio Sim Não

Limpeza e desinfecção frequente Sim Não

- Entrada de Pessoas

Entrada pós banho Sim Não

Entrada com roupa da granja Entrada com a própria roupa

Medidas de manejo de animais doentes:

Reposição de animais do plantel:

Animais da própria granja animais provenientes de outras granjas

9.2 Frequência de introdução de animais na granja

Possui quarentenário Sim Não

Condições de adaptação dos animais no quarentenário:

Tempo de isolamento dos animais:

10. Inseminação artificial

Todas as matrizes são inseminadas artificialmente

Inseminação parcial de parte das matrizes

Presença de laboratório para processamento do sêmen na própria granja

Sim Não

ANEXO 3

(Avaliação de manejo e fatores predisponentes)

Capítulo 2

Tabela 1. Fatores predisponentes a manifestação da circovirose suína em granjas com e sem sinais clínicos.

Fatores predisponentes	G1	G2
Presença de quarentenário	Não	Não
Introdução de leitões de granjas multiplicadoras	Sim	Sim
Controle de visitas e fornecimento de uniformes	Sim	Sim
Temperatura interna favoreciam o conforto animal.	Não	Não
Controle de temperatura do ambiente e ventilação	Não	Não
Vazio sanitário suficiente	Não	Não
Fluxo adequado de animais entre as fases	Sim	Sim
Limpeza e desinfecção adequada	Sim	Não
Destino correto de carcaça de animais mortos	Sim	Sim
Presença de fábrica de ração na granja	Sim	Sim
Antibióticos a ração para controle de doenças.	Sim	Sim
Vacinação	Rinite atrófica (porcas) Doença de Glasser (leitões)	Rinite atrófica (porcas)
Animais com sinais clínicos de circovirose suína	Não	Sim (a partir de 70 dias)
Maternidade		
Homogeneização de leitões até 48 h pós-nascimento	Sim	Sim
Colostragem adequada	Não acompanha	Não acompanha
Idade de desmame	21 dias	16 a 21 dias
Manejo “todos dentro todos fora”	Sim	Sim
Vazio sanitário suficiente	Sim	Não
Limpeza e desinfecção adequada	Sim	Sim
Creche		
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Separação e tratamento de refugos	Sim	Não
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Sim
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Sim
Manejo “todos dentro todos fora”	Sim	Sim
Vazio sanitário suficiente	Não	Sim
Limpeza e desinfecção adequada	Não	Sim
Recria e Terminação		
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Não
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Sim
Manejo “todos dentro todos fora”	Não	Não
Vazio sanitário suficiente	Não	Não
Limpeza e desinfecção adequada	Não	Não

Capítulo 3

Tabela 2. Fatores predisponentes a manifestação da circovirose suína em granjas com e sem sinais clínicos.

Fatores predisponentes	G1	G2
Presença de quarentenário	Não	Não
Introdução de leitoas de granjas multiplicadoras	Sim	Sim
Controle de visitas e fornecimento de uniformes	Sim	Sim
Temperatura interna favorecia o conforto animal	Não	Não
Controle de temperatura e ventilação	Não	Não
Vazio sanitário suficiente em todos os setores	Não	Não
Limpeza e desinfecção adequada	Sim	Não
Destino correto de carcaça de animais mortos	Sim	Não
Presença de fábrica de ração na granja	Sim	Sim
Antibióticos a ração para controle de doenças	Sim	Sim
Vacinação	Rinite atrófica (porcas) Doença de Glasser (leitões)	<i>Escherichia coli</i> (porcas) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Streptococcus suis</i> (leitões)
Animais com sinais clínicos de circovirose suína	Não	Acima de 65 dias
Maternidade		
Homogeneização de leitões até as 48 h de vida	Sim	Sim
Alimentação e água fornecidos à vontade	Sim	Sim
Fornecimento de colostro adequado	Não acompanhado	Não acompanhado
Idade de desmame	21 dias	15 a 19 dias
Manejo “todos dentro todos fora”	Sim	Não
Creche		
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Separação e tratamento de refugos e doentes	Sim	Não
Densidade adequada de animais por m ²	Sim	Não
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Não
Manejo “todos dentro todos fora”	Sim	Sim
Recria e Terminação		
Formação de lotes com idades aproximadas	Sim	Sim
Ambiente com altas concentrações de gases	Não	Sim
Manejo “todos dentro todos fora”	Não	Não