

Flávia Ferreira Pinto

T636.089 69

P659p

2004



**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR "NESTED" NO
DIAGNÓSTICO DO CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO II EM TECIDOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa Dr.^a Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
UFMG-Escola de Veterinária
2004

365446

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA

22.02.09

520205-06

P659p Pinto, Flávia Ferreira, 1975-
Padronização e aplicação da técnica de PCR "nested" no diagnóstico do circovirus suíno tipo II em tecidos/ Flávia Ferreira Pinto. – 2004
60 p. :il.

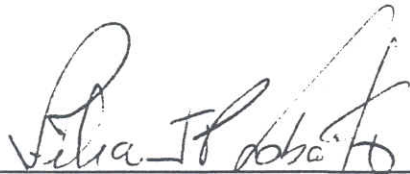
Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Viroses em animais
Teses.

I. Lobato, Zélia Inês Portela, 1963- II. Universidade federal de Minas
Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96


Dissertação defendida e aprovada em 20 de fevereiro de 2004 pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Dra. Zélia Inês Portela Lobato
Orientadora



Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli



Prof. Dr. Roberto Mauricio Carvalho Guedes

Agradecimentos

À professora Zélia Inês Portela Lobato pela confiança, atenção, apoio, amizade, ensinamentos, contribuição a minha formação profissional e competente orientação durante este período

Ao professor Maurílio Andrade Rocha pela amizade, pelos esclarecimentos essenciais para a realização deste projeto e pela co-orientação.

À professora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli pela paciência, valiosos ensinamentos, ajuda na padronização das técnicas de extração de DNA e por disponibilizar o Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares do ICB para a realização de algumas partes do experimento.

Ao professor Ernane Fagundes do Nascimento pela assistência nos estudos histopatológicos e pelo suporte técnico.

Aos professores Joaquim Segalés (Universidade Autônoma de Barcelona – Espanha) e Roberto Maurício Carvalho Guedes por terem cedido gentilmente as amostras utilizadas como controles, pelos conselhos valiosos e por propiciarem a realização de algumas técnicas importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao médico veterinário José Eustáquio Cavalcante pela amizade, pelo auxílio nas atividades exercidas nas granjas, suporte técnico e pelo fornecimento de amostras para o experimento.

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

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

Aos senhores proprietários das granjas, que gentilmente disponibilizaram suas propriedades e animais para a desenvolvimento do experimento.

Aos colegas o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente a Luciana, Aicina, Valdelaine e Daniela pela amizade, apoio, força, carinho e estímulo.

À CAPES e CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro

A minha mãe, Maria Helena Ferreira Pinto, pela paciência, dedicação contínua e amor sem limites e pelos sacrifícios que lhe foi imposto ao acreditar nos meus propósitos.

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



SUMÁRIO



ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Família <i>Circoviridae</i>	14
2.2. <i>Circovirus</i> suíno	14
2.3. Organização genômica	14
2.4. Replicação do CVS	15
2.5. Transmissão	15
2.6. Patogênese	15
2.7. Apresentações clínicas	16
2.8. Achados pós-mortem	17
2.9.. Resposta imune	17
2.9.1. Imunoestimulação	18
2.9.2. Imunossupressão	18
2.10. Controle	19
2.11. Diagnóstico	19
2.11.1. PCR no diagnóstico	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Local de Realização do Trabalho	20
3.2. Amostras	20
3.2.1. Controles	20
3.2.2. Histórico das granjas e animais coletados	21
3.2.3. Amostras clínicas	21
3.3. Processamento das amostras	22
3.3.1. Amostras clínicas parafinadas	22
3.3.2. Amostras clínicas de tecidos congelados	22
3.3.3. Amostras clínicas de tecidos conservados em formol	22
3.4. Extração do DNA	22
3.4.1. Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico	23
3.4.2. Chelex	23
3.5. PCR	23
3.5.1. Iniciadores	23
3.5.2. Amplificação	23
3.5.3. Padronização da PCR	24
3.5.4. Análise dos produtos da PCR	24
3.6. Avaliação da PCR desenvolvida	24
3.6.1. Análise do produto da PCR com enzimas de restrição	24
3.6.2. Especificidade da PCR	24
3.6.3. Sensibilidade Analítica da PCR	25
3.6.3.1. Sensibilidade em cultivo de células	25
3.6.3.2. Sensibilidade em diluições de cópias do plasmídeo	25
3.6.3.3. Comparação da sensibilidade da PCR utilizando tecidos submetidos a múltiplos processamentos	25
3.7. Comparação da PCR com os testes de Hibridização " <i>in situ</i> ", imunohistoquímica e análise histopatológica	25

3.8.	Seqüenciamento das amostras.....	25
3.8.1.	Purificação das amostras de DNA amplificado.....	25
3.8.2.	Clonagem das amostras	26
3.8.3.	Seqüenciamento e análise da seqüência	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1.	Padronização da PCR	27
4.2.	Comparação dos métodos de extração de DNA	31
4.3.	Avaliação da PCR	31
4.3.1.	Análise dos produtos da PCR por enzimas de restrição.....	31
4.3.2.	Especificidade da PCR.....	31
4.3.3.	Sensibilidade Analítica da PCR	35
4.3.3.1.	Sensibilidade em sobrenadante de cultivo celular.....	35
4.3.3.2.	Sensibilidade em diluições de cópias do plasmídio.....	37
4.3.3.3.	Sensibilidade da PCR utilizando tecidos submetidos aos três processamentos	39
4.4.	Amostras clínicas	43
4.4.1.	PCR	43
4.5.	Comparação dos resultados dos testes de hibridização "in situ", PCR e análise histopatológica	48
4.6.	Seqüenciamento, análise das seqüências e inferência filogenética.....	50
5.	CONCLUSÃO	55
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amplificação de um fragmento de 225 pares de bases do CVS-2 durante padronização da PCR.....	29
Figura 2	Produto amplificado de 225 pares de bases do CVS-2 durante a padronização da PCR	29
Figura 3	Análise do fragmento de 225 pares de bases restringido com enzimas..	33
Figura 4	Sensibilidade da reação externa da PCR em sobrenadante de cultivo celular	35
Figura 5	Sensibilidade da reação "nested" da PCR em sobrenadante de cultivo celular	35
Figura 6	Sensibilidade da reação externa da PCR em diluições de cópias de plasmídio contendo o fragmento de 481 pares de bases.....	37
Figura 7	Sensibilidade da reação "nested" da PCR em diluições de cópias de plasmídio contendo o fragmento de 225 pares de bases.....	37
Figura 8	Sensibilidade da reação "nested" da PCR em tecidos congelados	39
Figura 9	Sensibilidade da reação "nested" da PCR em tecidos parafinados.....	41
Figura 10	Sensibilidade da reação "nested" da PCR em tecidos formolizados	41
Figura 11	Amplificação de um fragmento de 225 pares de bases de amostras clínicas.....	45
Figura 12	Alinhamento da seqüência de 225 pares de bases de CVS-2 isolada de granja brasileira e amostra controle espanhola com outras seqüências de CVS-2 depositadas no Genbank	51
Figura 13	Arvore filogenética construída com base em seqüências parciais de 225 pares de base do CVS-2.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de animais coletados e localização das granjas estudadas nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná	21
Tabela 2	Seqüência dos iniciadores escolhidos para a "nested" PCR, localização e tamanho dos fragmentos que delimitam	24
Tabela 3	Seqüências de circovirus suíno utilizadas para construção da árvore filogenética e seu número de acesso no Genebank	26
Tabela 4	Deteccção do CVS-2 em amostras de tecidos submetidas a três diferentes tipos de processamento	43
Tabela 5	Deteccção do CVS-2 em amostras de tecidos congelados, parafinados e formolizados.....	43
Tabela 6	Correspondência entre a deteção do CVS-2 pelas técnicas de PCR, Hibridização " <i>in situ</i> " e Lesões Histológicas características.....	49



ABREVIATURAS

VAIG - Vírus da anemia infecciosa das galinhas

CPo - Circovirus dos pombos

CVS-1 - Circovirus suíno tipo 1

CVS-2 - Circovirus suíno tipo 2

VDBPP - Vírus da doença do bico e das penas de psitacídeos

EDTA - Ácido etilenodiaminoacético

HHPS - Hank's-Hepes-Penicilina-Estreptomicina

IPMC - Imunoperoxidase em monocamada de células

KDa - Kilodalton

ORF - Janela aberta de leitura

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PVS - Parvovirus suíno

PRRSV - Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos

RFLP - Análise do perfil do comprimento de fragmentos restringidos com enzimas

SDNS - Síndrome da dermatite e nefropatia suína

SRPD - Síndrome da refugagem pós-desmame

SPF - Livre de patógeno específico

TBE - Tris- borato- ácido etilenodiaminoacético

TE - Tris- ácido etilenodiaminoacético

RESUMO

Circovirus suíno tipo 2 (CVS-2) são agentes patogênicos recentemente associados à síndrome da refugagem pós-desmame (SRPD), uma doença emergente de distribuição mundial. Foi padronizada uma "nested" PCR para a detecção do CVS-2 em amostras de tecidos congelados, parafinados e formolizados, baseada na amplificação de segmentos contidos na ORF-2 do CVS-2. A especificidade da PCR foi avaliada pela análise do perfil do tamanho de fragmentos restringidos com a enzima EcoRI do produto de 225 pares de bases da amostra de campo 1D e da amostra controle positiva N682/99 da Espanha, e, pela análise da seqüência de nucleotídeos desses mesmos fragmentos. Utilizando diluições seriadas de cópias de plasmídeo contendo o inserto de 481 e 225 pares de bases, a sensibilidade obtida foi de 97 pg ou $29,38 \times 10^6$ e 6 pg ou $1,8 \times 10^6$ cópias de DNA viral para a reação externa e "nested" respectivamente. Em sobrenadante de cultivo celular infectado com uma amostra de CVS-2, a PCR foi capaz de detectar o DNA do CVS-2 até a diluição 10^{-4} para a reação externa e até 10^{-8} para a reação "nested" partindo de uma suspensão viral com título 10^{-3} TCID₅₀/50 µl. A sensibilidade da PCR para detecção do DNA em tecidos congelados, parafinados e formolizados foi comparada e o limite de detecção da reação "nested" em tecidos congelados foi de 500 ng, para tecidos parafinado 300 ng e para tecidos formolizados 100 ng de DNA. Amostras clínicas foram obtidas de 19 animais provenientes de oito granjas localizadas nos municípios de Patrocínio, Oliveira, Pará de Minas, Ponte Nova, Igarapé, Viçosa e Pompéu pertencentes ao estado de Minas Gerais, sete animais provenientes de duas granjas localizadas nos municípios de Entre Rios do Oeste e Medianeira, no estado do Paraná e seis animais de uma granja localizada no município de Rio Verde, no estado de Goiás. Os animais apresentam idade entre 26 e 120 dias e natimortos. Amostras de três animais, com idade aproximada de 150 dias, coletadas no momento do abate, em um frigorífico foram incluídas neste estudo. Foram avaliadas, um total de 35 amostras clínicas de tecidos congelados, 32 parafinados e 23 amostras formolizadas. A reação "nested" detectou o CVS-2 em 34 (97,1%) amostras de tecidos congelados, 28 (87,5%) amostras parafinadas e 20 (87%) amostras formolizadas, comprovando uma alta prevalência do vírus nos rebanhos analisados. Somente a amostra proveniente de uma granja localizada no município de Pompéu, foi negativa. Em 12 amostras analisadas, a "nested" PCR foi comparada às técnicas de hibridização "in situ", imunohistoquímica e análise histopatológica. Todas amostras foram positivas na PCR, duas amostras com lesões sugestivas da SRPD na análise histológica embora as 12 amostras tenham apresentado resultados negativos quando se utilizou a técnica de hibridização "in situ" e imunohistoquímica. A PCR desenvolvida apresentou-se como uma ferramenta sensível, específica e rápida para a detecção do ácido nucléico do CVS-2 em amostras clínicas.

Palavras chave: Circovirus suíno tipo 2, padronização da PCR, "nested" PCR, extração de DNA, tecidos.



ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV-2) is pathogenic agent recently associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), an emerging disease worldwide distributed. A polymerase chain reaction (PCR) for the detection of PCV-2 in frozen archival tissues, paraffin embedded tissues and formalin fixed tissues was development. The PCR was based on amplification of the 481 and 225 bp fragments in ORF-2 region. PCR specificity was determined by RFLP with EcoRI enzymes based on the 225 bp nucleotides of the clinical and control sample, and by 225 bp nucleotides sequence analyses. The sensibility of PCR was 97 pg or $29,38 \times 10^6$ and 6 pg or $1,8 \times 10^6$ viral DNA copies for the first and second reaction, respectively, when using dilutions of plasmid copies containing 225 and 481bp fragments. In supernatant of tissues culture infected with PCV-2, the PCR detected viral DNA up to a dilution of 10^{-4} for the first reaction and 10^{-8} for the second round of amplification. The sensibility of PCR for DNA detection in the tree types of tissues was 100 ng in frozen tissues, 300 ng in paraffin embedded tissues and 500 ng in formalin fixed tissues. Samples were obtained at necropsy of 19 pigs from eight herds of Patrocínio, Oliveira, Pará de Minas, Ponte Nova, Igarapé, Viçosa and Pompéu in Minas Gerais, seven pigs from two herds in Entre Rios do Oeste and Medianeira in Paraná and six pigs from Rio Verde in Goiás. The pigs were 26 a 150 day-old pigs and stillborn Samples of Three pigs with 150 day-old were obtained at slaughter. Thirty four (97,1%) of 35 frozen tissues, twenty eight (87.5%) of 32 paraffin embedded tissues and twenty (87%) of 20 formalin fixed tissues gave positive result using the nested PCR and showing a high prevalence of PCV-2 in tested herds. Only one sample from Pompéu-MG gave negative result in PCR. The "nested" PCR, in situ hybridization, immunohistochemistry methods and histopathological examination were compared for the detection of PCV-2 in archival tissues. All of 12 samples examined gave positive results in PCR and two samples were typical histopathological examination of PMWS, whereas all the 12 samples gave negative results in situ hybridization and immunohistochemistry methods. The PCR techniques developed in this study provided a sensitive, specific and fast diagnostic tool for detection of PCV-2 DNA in clinical samples.

Keywords: Porcine circovirus type 2, optimized of PCR, "nested" PCR, DNA extraction, tissues.

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura industrial moderna vem se caracterizando pelo aumento da concentração de suínos em grandes plantéis, melhoria da nutrição, aumento de investimentos em novas instalações e criação de animais com elevado padrão sanitário e genético, objetivando a obtenção de uma atividade com maior produtividade e lucratividade.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de diferentes formas de produção, baseadas na criação de suínos em diferentes sítios, de acordo com a fase e idade animal, tem ajudado a reduzir o impacto causado por algumas doenças nos rebanhos. E, na medida em que controlamos determinadas patologias, outras vão surgindo, alterando a situação sanitária dos plantéis e criando novos desafios relacionados ao diagnóstico, manejo e controle de doenças. Os exemplos mais recentes são as síndromes associadas ao Circovirus suíno tipo II (CVS-2), denominadas de circovirose, tais como a síndrome da refugagem pós-desmama (SRPD) e a síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS), que tem emergido em nosso meio, causando graves prejuízos em decorrência de um aumento da mortalidade pós-desmame, aparecimento de altas taxas de refugagem e aumento do uso de antibióticos injetáveis.

Manifestações clínicas da infecção pelo CVS-2 vem causando grandes prejuízos econômicos para a indústria suinícola mundial, particularmente na Europa. A análise do impacto econômico causado pela SRPD em rebanhos da Alemanha mostrou um aumento de até cinco vezes na taxa de mortalidade, gasto com medicamentos e assistência veterinária duas vezes maior, redução do ganho de peso diário e impacto negativo na taxa de conversão alimentar (Hardge et al., 2003). Nos Estados Unidos e Canadá, o impacto do acometimento dos rebanhos pelo CVS-2 ainda não foi determinado, mas evidências sugerem que a incidência da doença tem aumentando (Krakowka et al., 2002).

A SRPD vem atingindo as principais áreas produtoras de suínos do mundo. Ensaio sorológicos em vários países da Europa, Canadá, Nova Zelândia e Estados Unidos, indicam que o agente encontra-se amplamente espalhado em rebanhos suínos com variações de taxas de soropositividade entre 60 a 95% dos animais testados (Tischer et al., 1995).

O número de descrições da circovirose suína em rebanhos brasileiros vem crescendo nos últimos anos. A primeira identificação e tipificação molecular do CVS-2, assim como a descrição da SRPD em um rebanho nacional, 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. Posteriormente a doença foi descrita também no estado de Goiás por Sobestiansky et al. (2002) e rebanhos do Rio Grande do Sul com suspeita clínica da doença começaram a ser analisados (Barcellos e Pescador, 2003). Em 2003 a presença do CVS-2 foi detectada em Minas Gerais por Pinto et al. (2003) e em São Paulo por Castro et al. (2003).

A natureza endêmica do circovirus suíno, associada ao desconhecimento de sua prevalência em rebanhos nacionais, faz com que técnicas sorológicas tais como imunofluorescência, imunoperoxidase e neutralização viral forneçam resultados inconclusivos e pouco eficientes para a diferenciação do CVS-1 e CVS-2. Devido ao fato desses dois agentes apresentam uma alta homologia genética e antigênica, o emprego dessas técnicas resulta em reações sorológicas cruzadas. Por isso, têm-se desenvolvido métodos de diagnóstico capazes de detectar o antígeno ou ácido nucléico do agente como realizado nas técnicas de imunohistoquímica, hibridização "in situ" e PCR.

Devido aos grandes prejuízos provocados pelas síndromes causadas pelo CVS-2, crescimento da ocorrência de surtos de mortalidade não diagnosticadas corretamente no Brasil, baixa disponibilidade de técnicas laboratoriais para o seu diagnóstico a

campo e necessidade de realização de maiores estudos relacionados a patogenia e epidemiologia da doença, o objetivo desse trabalho foi a padronização de testes de PCR para a detecção do circovirus suíno tipo 2 em amostras de tecidos, detectando o agente em amostras clínicas de tecidos provenientes de animais suspeitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família *Circoviridae*

Circovirus suíno (CVS) são pertencentes à família *Circoviridae*, e caracterizam-se por serem vírus pequenos, não envelopados, de DNA fita única com aproximadamente 1,76 Kb, apresentar uma estrutura genômica circular unida covalentemente em sua extremidade e ser coberto por um capsídio icosaédrico com aproximadamente 17 nm de diâmetro (Ellis et al., 1998).

A família *Circoviridae* divide-se em dois gêneros: o *Circovirus*, que inclui o circovirus suíno tipo 1 (CVS-1), circovirus suíno tipo 2 (CVS-2), vírus da doença do bico e das penas de psitacídeos (VDBPP) e o circovirus dos pombos (CPo); e o gênero *Gyrovirus*, que inclui somente o vírus da anemia infecciosa das galinhas (VAIG) (Mankertz et al., 2000).

2.2. *Circovirus* suíno

Até o presente momento, dois tipos de *Circovirus* suíno foram identificados e caracterizados. CVS-1, identificado pela primeira vez no Canadá em 1974 como pequenos vírus presentes em linhagens contínuas celulares PK15 (ATCC CCL31) (Ellis et al., 1998; Hamel et al., 2000), e CVS-2, identificado em 1996, e associado a uma doença até então desconhecida, ao qual foi denominada síndrome da refugagem pós-desmama (SRPD). Infecções experimentais com CVS-1 isolados de células PK15 demonstraram que este agente não era causador de doença clínica em suínos além de não provocar efeito citopático detectável em culturas celulares (Tischer et al., 1982). Posteriormente, várias síndromes foram atribuídas ao CVS-2, embora a participação do agente em

algumas delas não esteja completamente elucidada: síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS), tremor congênito, abortos, mumificação fetal, falhas reprodutivas, pneumonia proliferativa e necrosante, aumento da mortalidade pré-desmama e miocardite em recém-nascidos (Harding e Halbur, 2000).

2.3. Organização genômica

O genoma completo do *Circovirus* suíno foi determinado, caracterizando o CVS-1 e CVS-2 como geneticamente e antigenicamente distintos. Comparações entre as seqüências de nucleotídeos destes dois vírus mostram uma homologia de até 75%. (Hamel et al., 1998; ManKertz et al., 2000; Bogdan et al., 2001). A análise de amostras de CVS-2 coletadas em vários países, mostrou uma homologia igual ou superior a 96% (Meehan et al., 1998), apesar de o CVS-2 poder ser dividido em 5 subgrupos (A, B, C, D, E), baseados no tamanho dos fragmentos obtidos utilizando a técnica de RFLP, e utilizando uma classificação descrita por Hamel et al. (2000).

O CVS-1 possui em seu genoma 7 janelas abertas de leitura (ORF's) que codificam proteínas que excedem 5 KDa e CVS-2 contém 11 ORF's, codificando proteínas de 2 a 36 KDa. A localização e orientação dessas regiões em ambos os tipos de CVS são similares (Hamel et al., 2000). A maior ORF, ORF1, codifica uma proteína de 36 KDa que está envolvida em mecanismos de replicação viral (Hamel et al., 1998), e a ORF2, é responsável pela codificação de uma proteína de 28 a 30 KDa, caracterizada como a principal proteína estrutural formadora do capsídio viral, podendo tomar parte também em eventos tardios da replicação viral (Nawagitgul et al., 2000). Muitas ORF's do CVS-2 são menores quando comparadas com as dos CVS-1, com exceção da ORF9. Alguns autores têm sugerido que as diferenças nestas proteínas codificadas pelo CVS-2 podem ser relevantes para a patogênese da SRPD (Fenaux et al., 2000; Hamel et al., 2000).

Análise da região ORF1 e ORF2 de diferentes isolados de CVS-1 e CVS-2

indicam uma semelhança nucleotídica e protéica da ORF1 de aproximadamente 83% e 86% respectivamente, enquanto que na ORF2 a semelhança nucleotídica é inferior a 65% e a protéica é de aproximadamente 67% (Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998). Estes dados sugerem ser a ORF2 uma região espécie específica para a determinação do CVS (Morozov et al., 1998), além da proteína expressa por esta região ser uma importante candidata para o desenvolvimento de técnicas laboratoriais para a detecção de anticorpos contra o CVS-2 e desenvolvimento de uma possível vacina (Nawagitgul et al., 2000).

2.4. Replicação do CVS

Estudos demonstram que o CVS replica somente em algumas linhagens celulares e são dependentes de proteínas expressas durante a fase S do ciclo celular para a montagem do seu material genético (Tischer et al., 1995). Ácido nucléico e o antígeno do CVS são detectados primariamente no citoplasma celular, difuso ou como inclusões, e raramente no núcleo de células fagocíticas (macrófagos/monócitos), que contém uma grande quantidade do vírus quando comparada a sua distribuição em outros tipos celulares. Isto sugere serem estes os alvos primários de multiplicação do vírus (Allan et al., 1998a; Morozov et al., 1998; Choi e Chae 1999). Sabe-se também, que o vírus não se replica em macrófagos não ativados e que subpopulações de granulócitos podem produzir fatores co-estimulatórios para macrófagos auxiliando sua replicação (Hamel et al., 2000).

O CVS-2 pode ser encontrado também em células dendríticas, células gigantes multinucleadas, células que se assemelham a linfócitos (Allan et al., 1998 a,b; Ellis et al., 1998; Rossel et al., 1999), pequenas células mononucleadas da medula óssea, células endoteliais, enterócitos, células epiteliais acinares pancreáticas, células de Kupffer e em infiltrados inflamatórios em uma variedade de órgãos. Em contraste, CVS-1 causa infecção somente em células da linhagem fagocítica mononuclear (Morozov et al., 1998).

In vitro, a replicação viral pode ser favorecida pela adição de d-glucosamina à cultura celular (Tischer et al., 1995). O vírus provoca o aparecimento de inclusões citoplasmáticas nas células, evidenciadas ultraestruturalmente por acúmulos cristalinos de pequenos vírions icosaédricos. (Kiupel et al., 1998).

2.5. Transmissão

Atualmente, poucos dados são conhecidos sobre a transmissão do CVS. O agente foi detectado por alguns pesquisadores em "swabs" nasais após infecções experimentais e a transmissão por secreções nasais ou aerossóis têm sido sugeridos como um potencial meio de transmissão horizontal, visto que esta via foi utilizada com êxito em infecções experimentais de suínos realizadas por Ellis et al. (1999), Kennedy et al. (2000) e Krakowka et al. (2000). Guiilmoto e Sabine (2000), demonstraram um modelo de transmissão da doença realizada pelo contato direto entre animais de rebanhos infectados para suínos SPF. Laroche et al. (2000), detectaram a presença do vírus em amostras de sêmen, mas a transmissão do CVS por esta via, ainda não está comprovada.

A detecção do CVS-2 em casos de miocardite em recém-nascidos e a associação do agente a abortos e falhas reprodutivas foram descritas por West et al. (1999), sugerindo a ocorrência de uma possível transmissão vertical do vírus. O'Connor et al. (2001), também detectaram o CVS-2 em leitões neonatos, mumificados e natimortos, relacionando a presença do vírus a falhas reprodutivas e ao desenvolvimento da doença multisistêmica posteriormente na vida do animal.

2.6. Patogênese

Até o presente momento, poucas informações são conhecidas sobre o mecanismo patogênico pelo qual o CVS é capaz de causar doenças. O sistema respiratório foi sugerido como rota de entrada do CVS-2 por Margar et al. (2000), que verificaram uma grande capacidade do vírus em infectar células epiteliais bronquiais

e bronquiolares. Kim et al. (2003) também observaram a entrada do vírus via nasofaringe e replicação em macrófagos tonsilares, seguida por uma viremia três dias após, com distribuição do vírus via sangue e linfa. Provavelmente o vírus replica também em monócitos circulantes que contribuem para as células associadas a viremia e para a distribuição do CVS pelos tecidos linfóides. Com o progresso da infecção, aglomerados de corpos de inclusões citoplasmáticas com tamanhos variados e intensa basofilia são freqüentemente encontrados em áreas do tecido linfóide dependentes de células B ou distribuídos por todo o linfonodo. Essas mudanças estão associadas à quantidade de antígeno de CVS intracitoplasmático na linhagem de monócitos/macrófagos, incluindo células dendríticas. Alterações similares podem ser encontradas no baço e placas de Peyer (Allan e Ellis, 2000). A interação do CVS-2 com células do sistema linfóide vem sendo associada ao aparecimento de um quadro de imunossupressão, observado numa grande parcela dos animais que desenvolvem a SRPD (Segalés e Domingo, 2002). Quando o CVS-2 se dissemina via plasma e células do sangue, principalmente monócitos, torna-se sistemicamente distribuído e duas a três semanas pós-infecção, o vírus pode ser detectado pelas técnicas de isolamento viral ou PCR em tecidos não linfóides tais como pulmão, intestino, fígado, soro e glândulas salivares (Margar et al., 2000). Alguns autores, apontam para a possibilidade de que fatores ambientais e de manejo ou uma co-infecção do CVS-2 com outros agentes infecciosos, possam servir como fatores imunoestimuladores e favorecer a replicação e disseminação do CVS-2, agravando o quadro clínico da síndrome. Nessa fase da doença uma linfadenopatia generalizada é uma das principais características da síndrome. Alguns suínos afetados apresentam quadro urêmico, além de transtornos no sistema respiratório. Uma resposta granulomatosa inflamatória seguida de danos no fígado, manifestada por icterícia e edema pode resultar em morte do animal (krakowka et al., 2002). Os eventos relacionados às alterações imunológicas (imunoestimulação e

imunossupressão) encontradas em animais com a síndrome, serão descritos com maiores detalhes posteriormente nos itens 2.9.1. e 2.9.2.

2.7. Apresentações clínicas

Os sinais clínicos estão relacionados com duas síndromes descritas como provocadas pela infecção com CVS-2: síndrome da refugagem pós-desmama e síndrome da dermatite e nefropatia suína.

- Síndrome da refugagem pós-desmama (SRPD)

A SRPD afeta suínos na fase inicial de crescimento, com idade entre cinco e doze semanas e clinicamente a doença se caracteriza por progressiva perda de peso, baixa condição corporal, depressão, linfonodos aumentados de tamanho, taquipnéia, dispnéia, palidez da pele e algumas vezes icterícia (Harding e Clark, 1997, Lukert, 1999). Podem estar presentes sinais menos comuns tais como diarreia, ulcerações gástricas, tosse, distúrbios do sistema nervoso e febre (Larochelle et al., 1999). Leitões sobreviventes apresentam um retardo no crescimento com baixo ganho de peso e desuniformidade de carcaça, o que resulta em grande perda econômica. Raramente os animais se recuperam espontaneamente (Allan e Ellis, 2000).

As taxas de morbidade e mortalidade variam amplamente entre rebanhos. Fenaux et al. (2000), observaram uma morbidade baixa e taxa de mortalidade alcançando até 50% dos animais infectados na fase de creche e recria, diminuindo em animais de terminação para 5 a 10%. Estes valores podem variar entre lotes de animais da mesma granja, porém, já foram detectados casos nos quais a mortalidade nas fases de recria e terminação duraram de 1,5 a 2 anos (Segalés e Domingo, 2002).

- Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)

A SDNS tende a afetar animais na faixa de 12 a 16 semanas de idade e em casos típicos da doença são observadas lesões de

pele multifocais com coloração vermelho escuro e centro necrótico, levemente elevadas, bem circunscritas, encontradas principalmente nos membros posteriores, região ventral do abdômen e focinho. As lesões podem confluir-se, atingindo outras áreas como flancos, orelhas, tórax e, em casos mais graves, podem tornar-se generalizadas (Ellis e Allan, 2000). Animais acometidos apresentam temperaturas superiores a 41°C, perda de apetite, emagrecimento acentuado, edema subcutâneo ventro-caudal e severas dores ao se movimentarem devido a artralgia (Rossel et al., 2000). Poucos animais sobrevivem à fase aguda da doença e aqueles que sobrevivem acabam por desenvolver lesões cutâneas cicatrizantes de caráter crônico (Segalés e Domingo, 2002). Na forma mais branda podem ser visualizadas apenas lesões de pele com recuperação dos animais sem tratamento (Brito et al., 2002).

2.8. Achados pós-mortem

- Síndrome da refugagem pós-desmama (SRPD)

Carcças de suínos com SRPD mostram diminuição da massa muscular, moderada palidez da pele e em 20% dos casos é observada icterícia. Os linfonodos apresentam-se aumentados em três ou quatro vezes o volume normal, especialmente os inguinais, mesentéricos e bronquial, mostrando-se pálidos ao corte (Allan e Ellis, 2000). Os pulmões encontram-se difusamente não colapsados, pesados e firmes com superfície pulmonar apresentando uma coloração acinzentada a marrom ou vermelho escuro. O fígado pode estar moderadamente amarelado e marcadamente atrofico. Os rins, pálidos na maioria dos casos, estão aumentados de volume devido ao edema. Ulcerações na porção esofagiana do estômago podem ser achados bastante comuns (Segalés e Domingo, 2002).

A alteração histológica mais comumente encontrada é uma infiltração granulomatosa linfo-histiocitária em órgãos linfóides e tecidos não linfóides, que incluem uma

lifadenite granulomatosa, pneumonia intersticial, níveis variados de hepatite e nefrite intersticial (Larochelle et al., 1999; Choi et al., 2000). Sincício formado por células gigantes multinucleadas é frequentemente encontrado no pulmão, fígado, rim e principalmente nos tecidos linfóides (Nawagitgul et al., 2002). Um achado relevante é a presença de corpúsculos de inclusão basofílicos, esféricos, de tamanhos e números variáveis no citoplasma de células histiocíticas e uma acentuada depleção linfóide (Allan e Ellis, 2000).

- Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)

Na necropsia, os linfonodos estão aumentados de volume e hemorrágicos, rins pálidos, aumentados de volume e com pontos esbranquiçados distribuídos difusamente em toda sua superfície. Histologicamente podem ser observados glomerulonefrite intersticial e vasculite necrótica generalizada decorrente da deposição de complexos imunomediados (Rossel et al., 2000). A maioria dos suínos com SDNS apresentam, também, uma depleção linfóide moderada a severa em linfonodos, e em alguns casos é observada pneumonia intersticial (Brito et al., 2002).

2.9. Resposta imune

Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre a interação do CVS com o sistema imune e muitas questões permanecem por serem respondidas. Estudos recentes indicam que os anticorpos de origem materna contra o CVS decaem entre três e nove semanas de idade e os leitões soroconvertem por volta das 13 a 15 semanas, mantendo os títulos em níveis elevados até a idade de abate (Quintana et al., 2001; Rodríguez-Arrijo et al., 2002). Porém, ainda que aconteça uma resposta imunológica humoral, uma percentagem de suínos de recria e terminações mantêm-se virêmicos, sugerindo que anticorpos detectados pela técnica de IPMC ou ELISA não são eficientes na eliminação da infecção (Segalés e Domingo, 2002; Rodríguez-Arrijo et al., 2002).

O sistema imune parece ter uma dupla participação na infecção provocada pelo CVS. Então, dois aparentes efeitos contraditórios, imunestimulação e imunodepressão, podem estar presentes e serem usados para descrever os eventos que ocorrem nesta síndrome.

2.9.1. Imunoestimulação

A ativação do sistema imune pode ser um componente chave para a patogênese do circovirus suíno e ser responsável pelo aparecimento e potencialização dos sinais clínicos da SRPD (Segalés e Clark, 2002).

Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002), trabalhando com reprodução da SRPD em leitões imunestimulados e não imunestimulados demonstraram que a síndrome pode ser reproduzida nos dois tipos de animais. Resultados semelhantes foram observados por Kennedy et al. (2000), Bolin et al. (2001) e Krakowka et al. (2002). Estes dados comprovam que somente a presença do agente é suficiente para desencadear a síndrome (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002). Entretanto, estudos experimentais, utilizando co-infecções com CVS e outros vírus, tais como o VSRRS e PVS, mostraram que a estimulação e ativação do sistema imune por estes vírus aumentam a replicação do CVS-2, levando ao aparecimento de um quadro clínico compatível da doença, lesões microscópicas e mortalidade de leitões (Allan et al., 2000; Krakowka et al., 2000). Allan et al. (1999); Kennedy et al. (2000) e Krakowka et al. (2000) inoculando suínos jovens susceptíveis com CVS-2, observaram que a maioria dos animais desenvolveu lesões microscópicas, mas, somente a metade desenvolveu a forma clínica da SRPD. Estes resultados sugerem que outros cofatores podem ser necessários para desenvolver sinais clínicos, sejam eles outros agentes ou imunestimulação não específicas. Foi observado que qualquer estimulação não específica do sistema imune, tais como: vacinação, superlotação, ventilação inadequada, misturas entre grupos de idades diferentes, uso de imunomodulador ou/e outros fatores estressantes podem potencializar a

replicação e aumentar a severidade dos sinais clínicos durante um surto de SRPD (Ellis e Allan, 2000; Segalés e Clark, 2002).

2.9.2. Imunossupressão

Em geral, o mecanismo viral que induz imunossupressão inclui mudanças na função do sistema imune como uma consequência direta da replicação viral em células que o compõe. Mais especificamente, o vírus provoca imunossupressão por interferir com a apresentação de antígenos, indução de apoptose principalmente de células B (Allan e Ellis, 2000), ativação das citocinas e inibição da atividade de componentes do complemento (Segalés e Clark, 2002). Lesões características de SRPD, invariavelmente, consistem de variados graus de depleção de linfócitos, maior infiltração de macrófagos em tecidos linfóides e presença de células gigantes multinucleadas contendo numerosos corpúsculos de inclusão (KraKowKa et al., 2002). Estes achados são correlacionados com diminuição de linfócitos B circulantes e células T nos órgãos linfóides. (Segalés e Clark, 2002).

Um estudo realizado por Segalés et al. (2001), avaliou alterações na população de leucócitos periféricos em suínos infectados com SRPD e demonstrou 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+ 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 imunógenos, fato esse observado por Krakowka et al. (2002), ao estudarem rebanhos infectados.

2.10. Controle

Atualmente, pouco se sabe sobre os métodos de controle das doenças provocadas pelo CVS-2. O agente é altamente resistente a inativação por detergentes e desinfetantes comuns, elevação de temperatura a 56 e 79°C, dessecação, exposição ao pH 3 (Allan et al., 1994) e nenhuma vacina foi produzida até o presente momento (Allan e Ellis, 2000). A dificuldade de eliminação do agente do ambiente levou os pesquisadores a proporem alterações em medidas de manejo para tentar diminuir a pressão de infecção das granjas pelo CVS e por outros agentes (Madec et al., 2000). A SRPD pode acometer rebanhos que usualmente possuem um alto padrão sanitário, saúde, alta biosegurança e onde medidas de segurança mais rigorosas são tomadas para prevenir a instalação de doenças (Hamel et al., 2000). Portanto, boas medidas de biosegurança são requeridas, mas não asseguram que o rebanho seja livre. Como principais medidas de controle sugere-se um rápido e acurado diagnóstico com remoção de animais infectados, combinando boas práticas de higiene, manejo e bem estar animal (Ellis e Allan, 2000). Adequar a lotação por baia, ventilação, evitar misturas de animais de diferentes idades e origens, separar animais doentes e utilizar divisórias em baias abertas também são práticas recomendadas (Madec et al., 2000).

2.11. Diagnóstico

Vários métodos sorológicos foram avaliados para a detecção do CVS ou de anticorpos contra o agente. A demonstração de anticorpos contra CVS-1 e CVS-2 em suínos pode ser realizada utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, imunoperoxidase indireta e mais recentemente pelo teste de ELISA (Allan e Ellis, 2000). Uma soroconversão ao CVS-2, identificado pela técnica de IPMC ou pela ELISA, mostrou um modelo típico de infecção viral com declínio de anticorpos colostrais na fase de lactação e uma ativa soroconversão na fase de creche, mantendo os títulos de anticorpos elevados, pelo menos até 28 semanas de vida (Rodríguez-

Arrijoa et al., 2002). Entretanto, um modelo de soroconversão similar também foi encontrado em rebanhos sem a síndrome (Segalés, 2002). Estes estudos demonstram que embora as técnicas sorológicas sejam bastante úteis para a detecção da infecção ou para o estudo da dinâmica do agente dentro de um rebanho, quando utilizados separadamente são insuficientes para o diagnóstico da síndrome, pois a presença de anticorpos pode não ser indicativa da presença da doença além da existência de reatividade cruzada entre os dois tipos de CVS.

As técnicas de isolamento viral e imunofluorescência direta foram utilizadas com êxito na detecção do vírus, porém seu uso tem sido restrito a pesquisa e não para o diagnóstico clínico da síndrome (Allan e Ellis, 2000). Allan et al. (1994), utilizaram as técnicas de isolamento viral e imunofluorescência direta para estudar os principais sítios de replicação viral em animais experimentalmente infectados, obtendo uma boa correlação dos resultados obtidos com as duas técnicas.

Em tecidos, o vírus pode ser detectado utilizando as técnicas de imunohistoquímica (Ellis et al., 1998; Rosell et al., 1999); imunofluorescência (Ellis et al., 1998; Allan et al., 2000); hibridização "in situ" (McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999) e PCR (Bogdan et al., 2001; Quintana et al., 2001; Casalmiglia et al., 2002). A PCR tornou-se a mais sensível ferramenta para a detecção do CVS-2, sendo a técnica de escolha para a diferenciação entre os dois tipos de circovirus, que possuem algumas semelhanças antigênicas (Krakowka et al., 2000). Por essa razão a PCR é considerada a melhor técnica quando o objetivo é a detecção do vírus (Segalés, 2002). Porém quando comparada a imunohistoquímica, a técnica da PCR apresenta uma baixa correlação no diagnóstico da SRPD, principalmente por existirem um grande número de animais infectados que não apresentam sintomatologia clínica.

O diagnóstico definitivo das síndromes causadas pelo CVS-2 deve ser realizado pela associação de sinais clínicos

compatíveis, lesões histopatológicas e detecção do antígeno ou de seu ácido nucléico nas lesões. Estes três critérios não podem ser utilizados separadamente, pois a presença do CVS-2 não implica necessariamente em doença, assim como alguns sinais clínicos não são específicos das síndromes causadas pelo vírus (Sorden, 2000; Quintana et al., 2001; Calsamiglia et al., 2002).

2.11.1. PCR no diagnóstico

Um grande número de estudos vem utilizando a PCR para a detecção do CVS-2 em rebanhos e diferenciação entre CVS-1 e CVS-2 (Morozov et al., 1998; Larochele et al., 1999; Choi et al., 2000; Kim e Chae, 2001; Banlunara et al., 2002; Calsamiglia et al., 2002; Celler Jr. e Carasova, 2002), estudo de vias de transmissão (Larochele et al., 2000; Bogdan et al., 2001; O'Connor et al., 2001), quantificação do DNA do CVS-2 e relação com produção de doença (Liu et al., 2000), acompanhamento de infecções experimentais e compreensão da patogenia da doença (Allan et al., 2000; Krakowka et al., 2000; Margar et al., 2000; Fenaux et al., 2002; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Kim et al., 2003) e caracterização molecular (Larochele et al., 2000), podendo estar associada a RFLP (Fenaux et al., 2000; Hamel et al., 2000)

A PCR apresenta vantagens em relação aos demais métodos de diagnóstico, em virtude de sua alta sensibilidade, detecção rápida e específica de ácidos nucléicos em espécimes clínicos reduzindo assim o tempo necessário para o diagnóstico do agente (Larochele et al., 1999). Por outro lado, os resultados fornecidos por esta técnica, devem ser analisados com muita cautela quando o objetivo é o diagnóstico da síndrome, devido à presença endêmica do CVS na população de suínos (Allan e Ellis, 2000). O vírus em animais clinicamente normais, também pode ser detectado pela PCR. Nestes casos, a quantidade de vírus é muito baixa e as lesões muito leves ou inexistentes (Quintana et al., 2001).

O CVS-2 possui afinidade por células do sistema fagocítico mononuclear, sendo seu DNA freqüentemente detectado em uma

ampla variedade de tecidos e órgãos, tais como pulmão, tonsilas, linfonodos, timo, baço, intestino, rim, fígado e glândula salivar, coletados de suínos apresentando sinais clínicos e lesões características com SRPD (Larochele et al., 1999). Observa-se uma alta correlação entre a severidade das lesões microscópicas em tecidos linfóides e a quantidade de ácido nucléico do CVS-2 encontrado nestes (Rossel et al., 1999).

A utilização da PCR nas amostras de tecidos formolizados ou parafinados expandiu a possibilidade de detecção do CVS, em virtude de poder utilizar materiais remetidos em mau estado de conservação ou contaminado com outros microrganismos e realização de estudos retrospectivos. Devido a supostos danos que podem ocorrer durante o processo de fixação e embebição em parafina, uma padronização e pequenas modificações são requeridas nos protocolos desta técnica, visando melhorar a eficiência da extração do DNA e obtenção de material com suficiente qualidade para a análise pela PCR (Kim e Chae, 2001). Trabalhos utilizando amostras formolizadas ou parafinadas, ressaltam a importância da utilização de uma reação "nested", onde um fragmento interno é amplificado, para se conseguir uma maior sensibilidade da PCR (Bascunana e Belak, 1996; Banlunara et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Realização do Trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia, ambos pertencentes à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2. Amostras

3.2.1. Controles

Como controles positivos, foram utilizadas amostras de tecidos congelados e blocos individuais de tecidos parafinados,

provenientes de animais com diagnóstico laboratorial confirmado e quadro clínico compatível com a SRPD. A amostra parafinada 01/39616- intestino foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Diagnóstico Veterinário da Universidade de Minnesota (EUA) e a amostra PO126, composta por fragmentos de baço, pulmão e tonsila, cedida pelo professor Joaquim Segalés, do Departamento de Sanidade e Anatomia Animal da Universidade Autônoma de Barcelona. Estas amostras foram previamente diagnosticadas como positivas nas provas de hibridização *in situ* e foram utilizados como controles positivos para a PCR em tecidos parafinados e formolizados. As amostras N200/99 e N682/99, compostas por um "pool" de tecidos congelados, dentre eles: pulmão, intestino, fígado, baço e linfonodo, também provenientes de animais positivos e previamente diagnosticados pela técnica de hibridização *in situ* foram enviadas pelo professor Joaquim Segalés e utilizadas como controles positivos para a PCR em tecidos congelados.

Como controle negativo foi utilizado DNA isolado de um sobrenadante de cultivo de linhagens contínuas de células de rim suíno (PK15), previamente testadas para a presença de CVS pela técnica de imunofluorescência direta e IPMC. DNA extraído de um "pool" de tecidos coletados de um animal criado em "fundo de quintal" previamente testado pela PCR e negativo para CVS-2 também foi utilizado como controle negativo.

3.2.2. Histórico das granjas e animais coletados

Neste estudo, foram analisados animais provenientes de oito granjas localizadas em sete municípios do estado de Minas Gerais, de duas granjas localizadas em dois municípios do estado do Paraná e uma granja localizada no estado de Goiás. Algumas das granjas estudadas, apresentavam um histórico de animais com emagrecimento progressivo e, três destas, diagnóstico histopatológico compatível com as lesões provocadas pelo CVS-2. A localização e o número de animais

coletados em cada granja pode ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1. Número de animais coletados e localização das granjas estudadas nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Paraná.

Localização das Granjas	Número de animais estudados
Minas Gerais	
Patrocínio (Granja 1)	5 animais
Patrocínio (Granja 2)	5 animais
Oliveira	2 animais
Pará de Minas	2 animais
Ponte Nova	2 animais
Igarapé	1 animal
Viçosa	1 animal
Pompéu	1 animal
Goiás	
Rio Verde	6 animais
Paraná	
Entre Rios do Oeste	3 animais
Medianeira	4 animais
Total	32 animais

Trinta e um animais foram selecionados de granjas tecnificadas que adotavam um sistema de criação intensiva localizadas nos municípios de Patrocínio, Oliveira, Pará de Minas, Ponte Nova, Igarapé, Viçosa em Minas Gerais; Entre Rios do Oeste e Medianeira no Paraná e Rio Verde em Goiás. Um animal foi retirado de uma pequena granja que adotava uma criação em "fundo de quintal", onde não havia ocorrido a entrada de novos animais por um período superior a 10 anos, localizada no município de Pompéu em Minas Gerais. Todos os animais incluídos neste estudo, apresentavam baixa condição corporal, que em alguns casos se associava a outros sinais clínicos tais como icterícia ou palidez da pele, aumento de linfonodos inguinais e dificuldade respiratória.

3.2.3. Amostras clínicas

Dos 32 animais analisados, foram coletadas, em necropsias, amostras de pulmão, linfonodos, baço e intestino (íleo). Os animais apresentam idade entre 26 e 120 dias e natimortos. Também foram coletadas amostras de três animais, com idade aproximada de 150 dias, provenientes de uma granja localizada no município de Patrocínio-MG, no momento do abate, em



um frigorífico localizado na região metropolitana de Belo Horizonte. Uma parte dos tecidos coletados permaneceu congelada a -76°C até o momento da sua utilização, a outra parte foi fixada em formalina tamponada 10% e, em um período máximo de 15 dias, submetida ao processo de parafinação e encaminhada para estudos histopatológicos. Utilizou-se também, amostras de tecidos parafinados, coletados de uma granja suspeita, localizada no município de Juiz de Fora, cedidas pelo professor Ernane Fagundes do Nascimento, do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária-UFMG. Foram analisadas um total de 35 amostras congeladas, 32 amostras parafinadas e 23 amostras formolizadas.

3.3. Processamento das amostras

3.3.1. Amostras clínicas parafinadas

Seções do bloco de parafina de $10\ \mu\text{m}$ cada foram cortadas em um micrótomo, e colocadas dentro de um microtubo estéril de 1,5 ml. As amostras foram processadas com base em metodologia descrita por Kim e Chae (2001), onde foram feitas algumas modificações: a parafina foi removida dos tecidos adicionando-se $900\ \mu\text{l}$ de tolueno sob agitação constante, por 10 minutos. O material foi centrifugado a $4.000\ \text{g}$ por 15 minutos para formação de um sedimento. O sobrenadante foi desprezado com o auxílio de uma micropipeta, o sedimento lavado por duas vezes com $900\ \mu\text{l}$ de etanol 100% e centrifugado a $13.000\ \text{g}$ por 10 a 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o restante do solvente deixado evaporar a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensionado em $500\ \mu\text{l}$ do tampão de digestão contendo $10\ \text{mM}$ Tris pH 8,5; $1\ \text{mM}$ de EDTA; $0,5\%$ Tween 20 e $200\ \mu\text{g/ml}$ de proteinase K, adicionada à solução somente na hora do uso. As amostras foram incubadas "overnight" a 56°C , sendo posteriormente aquecidas a 95°C por 8 minutos para inativação da proteinase K.

3.3.2. Amostras clínicas de tecidos congelados

O processamento das amostras congeladas foi baseado em um protocolo descrito por Larochelle et al. (1999), destacando-se algumas modificações: dois gramas de um "pool" de tecidos congelados foram homogenizados em 10 ml da solução Hank's- HEPES- Penicilina- Estreptomicina (HHPES). O macerado foi centrifugado a $8.500\ \text{g}$, a uma temperatura de 4°C e o sobrenadante coletado, tratado com freon. A mistura foi novamente centrifugada, o sobrenadante coletado diluído (1:5) em meio de cultura (MEM) e estocado a uma temperatura de -20°C até o uso.

3.3.3. Amostras clínicas de tecidos conservados em formol

As amostras formolizadas foram trabalhadas, utilizando o protocolo descrito por Banlunara et al. (2002), com algumas modificações: um grama de um "pool" de tecidos foi cortado em pequenos pedaços e lavados três vezes com tampão PBS por um período de 24 horas, sob constante agitação. Um homogeneizado com concentração de 10% em tampão PBS foi preparado, centrifugado a $10.000\ \text{g}$, e ao sobrenadante adicionado $500\ \mu\text{l}$ do tampão de digestão constituído de $10\ \text{mM}$ Tris pH 8,5; $1\ \text{mM}$ de EDTA; $0,5\%$ Tween 20 e $200\ \mu\text{g/ml}$ de proteinase K, adicionada à solução, somente na hora do uso.

3.4. Extração do DNA

A partir do processamento descrito no item 3.3., duas diferentes metodologias foram testadas para a extração do DNA de treze amostras de tecidos congelados. No primeiro método foi realizada a extração do DNA com o fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico, ao passo que no segundo as amostras foram filtradas em uma coluna de Sephacryl S-400 (C-25) e o DNA extraído com a resina Chelex 100. Amostras parafinadas e formolizadas foram somente extraídas utilizando o fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico.

3.4.1. Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico

O DNA foi extraído utilizando o fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (pH 7,8 - 8,0), de acordo com a metodologia descrita previamente por Sambrook et al. (2001) onde, a 500 µl da amostra foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A amostra foi agitada em agitador tipo Vortex até obtenção de uma emulsão e o conteúdo deixado em banho-maria a 37°C por 5 minutos. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 segundos até a observação da formação de duas fases (fase orgânica e fase aquosa bem separadas). Com o auxílio de uma micropipeta, a fase aquosa foi transferida para um outro tubo e para melhor aproveitamento, a fase orgânica e a interface foram re-extraídas com igual volume de TE (pH 7,8). Uma nova centrifugação a 12.000 g por 15 minutos foi realizada e a segunda fase aquosa obtida misturada com a primeira. A interface e fase orgânica foram descartadas e realizou-se nova extração da fase aquosa com igual volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos. Então, uma última extração foi realizada utilizando-se clorofórmio, seguida de nova centrifugação. À nova fase aquosa recuperada, foi adicionado 1/4 de volume do tampão acetato de sódio 3 M juntamente com 2,5 volumes de etanol 100%. A mistura permaneceu resfriada a -20°C "overnight", sendo o DNA precipitado posteriormente por adição de 500 µl de álcool 70% e centrifugação a 17.000 g por 5 minutos sob refrigeração. O DNA foi ressuspenso em 100 µl de água ultrapura e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.4.2. Chelex

As amostras de tecidos processadas foram filtradas em uma coluna contendo resina Sephacryl S-400 (C-25) embebida em tampão acetato de sódio 0,3 M (pH 6,0), segundo protocolo descrito por Walsh et al. (1991). Cem microlitros das amostras digeridas foram extraídas adicionando 200 µl de uma solução contendo Chelex a 5% em água ultrapura, 7 µl de DTT 1M e 2 µl de

proteínase K na concentração de 10 mg/ml. A mistura foi mantida sob aquecimento a 95°C por oito minutos, agitada por 10 segundos, centrifugada por três minutos a 15.000 g e o DNA obtido, estocado a -20°C até o momento do uso.

3.5. PCR

3.5.1. Iniciadores

A escolha dos pares de iniciadores para detecção do circovirus tipo 2, foi baseada em uma região espécie-específica do CVS (fragmento ORF 2) devido ser esta, a que melhor diferencia o CVS-1 do CVS-2. A reação externa da PCR foi realizada utilizando os iniciadores descritos previamente por Ellis et al. (1999), os quais amplificam um fragmento de 481 pares de bases comum aos vírus CVS-1 e CVS-2. Os iniciadores utilizados na reação "nested" da PCR foram descritos por Kim e Chae (2001), e amplificam um fragmento de 225 pares de bases, específico para o CVS-2, contido no segmento amplificado pela reação externa. A seqüência dos iniciadores e sua localização podem ser visualizadas na Tabela 2.

3.5.2. Amplificação

A PCR foi realizada a partir do DNA extraído dos tecidos congelados, formolizados, parafinados e cultivo de células PK15. A amplificação foi realizada em um volume final de 20 µl de uma mistura contendo inicialmente 1,25 mM MgCl₂, 1X tampão PCR, 200 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Na reação da PCR externa foram utilizados 2 µl do DNA extraído dos tecidos, e 2 µl do produto da primeira reação foram adicionados a reação "nested". Ambas as reações foram realizadas em um aparelho termociclador utilizando as mesmas condições: temperatura de desnaturação de 95°C por 1 min; anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A reação finalizou-se com uma etapa de aquecimento a 72°C por 10 min para extensão final dos produtos.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

Tabela 2. Seqüência dos iniciadores escolhidos para a PCR, localização e tamanho do fragmento que delimitam.

PCR	Seqüência do iniciador senso	Seqüência do iniciador antisenso
Externa	5'-CGGATGTTGTAGTCCTGGTCG-3' (posição do nucleotídeo 1101-1121 *)	5'-ACTGTCAAGGCTACACAGTCA-3' (posição do nucleotídeo 1577-1556*)
"Nested"	5'-GATTGTATGGCGGGAGGAGT-3' (posição do nucleotídeo 1293-1311)	5'-ATTGACGACTTTGTTCCCCC-3' (posição do nucleotídeo 1517-1498)

*A seqüência e posição dos iniciadores foram baseados no fragmento ORF-2 contido na seqüência AF027217, depositada no GeneBank.

3.5.3. Padronização da PCR

A padronização da PCR (reação externa e "nested"), foi realizada, utilizando-se uma amostra controle positiva (N200/99-Espanha) e uma amostra controle negativa (sobrenadante do cultivo de células PK 15 não infectado). Durante a padronização do teste, alterações foram realizadas nas concentrações dos iniciadores (20 e 2 pmoles), quantidade de amostra (40; 80 e 120 ng), concentração de Taq DNA polimerase (2,5 e 1,0 unidade) e número de ciclos (20, 25, 30, 35 e 40), visando fornecer a PCR uma maior sensibilidade e especificidade.

3.5.4. Análise dos produtos da PCR

Dez microlitros dos produtos amplificados pela PCR foram aplicados em géis de agarose 2% adicionados de 2 µl de brometo de etídeo e submetidos à eletroforese (100 v por 40 minutos), corridos 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 analisado por comparação a um marcador de tamanho molecular (pGEM ou 100 bp ladder), que apresentam fragmentos variando entre 51 a 2.645 pares de bases.

3.6. Avaliação da PCR

3.6.1. Análise do produto da PCR com enzimas de restrição

A especificidade do produto de 225 pares de bases do CVS-2, obtido após realização da reação externa e "nested" da PCR, foi

avaliada, utilizando-se a análise por enzima de restrição. Para a escolha da enzima de ser utilizada, submeteu-se um fragmento de 225 pares de bases de uma amostra de referência de CVS-2, número de acesso no Genebank AF027217, à análise pelo programa BCM Search Launcher Query Sequence, disponível no endereço eletrônico "<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>". Com base nos resultados obtidos, os produtos amplificados de 225 pares de bases, obtidos na reação "nested" da PCR das amostras clínicas 1D (Granja de Oliveira-MG) e da amostra controle positiva N682/99-Espanha, foram digeridos utilizando a enzima de restrição: EcoRI (Pharmacia). A reação ocorreu por um período de 4 horas a uma temperatura de 37°C, conforme recomendação dos fabricantes. As amostras digeridas foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 2% para separação dos fragmentos digeridos e estes foram comparados aos tamanhos de fragmentos fornecidos pelo programa BCM Search Launcher Query Sequence ao analisar a amostra referência de CVS-2.

3.6.2. Especificidade da PCR

Para a avaliação da especificidade do teste desenvolvido foi utilizado um fragmento de 225 pares de bases obtido na reação "nested" da PCR das amostras clínicas 1D (Granja de Oliveira-MG) e amostra controle N682/99-Espanha, submetidas ao processo de clonagem e seqüenciamento descritos posteriormente no item 3.7. Os fragmento seqüenciados foram comparado a outras seqüências de CVS-2 depositadas no Genebank.

3.6.3. Sensibilidade Analítica da PCR

3.6.3.1. Sensibilidade em cultivo de células

Um cultivo de células de rim suíno (PK15) foi inoculado com uma amostra de campo de Circovirus suíno tipo 2, gentilmente cedida pelo professor Han So Joo da Universidade de Minnesota (EUA), apresentando uma diluição inicial de 10^{-1} e título 10^{-3} TCID₅₀/50 µl, titulado pelo método de Reed e Muench (1938). O DNA do sobrenadante do cultivo celular infectado foi extraído com fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e diluído de forma a obter diluições seriadas decimais do DNA, partindo da diluição inicial de 10^{-1} até a diluição final de 10^{-13} , utilizadas para determinar a sensibilidade analítica da reação externa e "nested" da PCR.

3.6.3.2. Sensibilidade em diluições de cópias do plasmídeo

Cópias do DNA plasmidial contendo fragmentos de 481 (amostra controle N682/99) e 225 pares de bases (amostra de campo 1D- Granja de Oliveira-MG) de CVS-2 foram extraídas da bactéria *Escherichia coli* JM 109 e diluídos de forma seriada partindo de uma concentração inicial de 50 ng até uma concentração final de 94 fg. As amostras diluídas foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 2% e utilizadas para determinar a sensibilidade analítica da PCR externa e "nested".

3.6.3.3. Comparação da sensibilidade da PCR utilizando tecidos submetidos a múltiplos processamentos

Diluições seriadas do DNA extraído da amostra clínica 5A (Granja de Patrocínio-MG) de tecido congelado, parafinado e formolizado foram preparadas partindo da concentração inicial de 1000 ng, até uma concentração final de 25 ng. Cada diluição foi submetida a PCR externa e "nested" e produto comparado através de uma eletroforese em gel de agarose 2% para determinar a sensibilidade analítica da PCR externa e "nested".

3.7. Comparação da PCR com o teste de hibridização "in situ", imunohistoquímica e análise histopatológica

Vinte e oito amostras clínicas armazenadas em blocos de parafina foram cortadas em um micrótomo, com espessura de 5 µm cada, montadas em lâmina de microscopia, coradas pela técnica do HE (hematoxilina-eosina) e submetidas à análise histopatológica. Doze destas amostras foram enviadas ao professor Joaquim Segalés, para a realização do teste de Hibridização "in situ" na Universidade Autônoma de Barcelona-Espanha e também coradas pela técnica de imunohistoquímica (realizada pela aluna Clara Nilce Barbosa.-tese de doutorado em andamento na Escola de Veterinária da UFMG), empregando o complexo imunoenzimático streptavidina-biotina marcada (LSAB) para detecção específica do CVS. Os resultados obtidos utilizando as três técnicas acima foram comparados ao teste da PCR.

3.8. Seqüenciamento das amostras

3.8.1. Purificação das amostras de DNA amplificado

O produto da amplificação da amostra clínica 1D (Granja de Oliveira-MG) e da uma amostra controle N200/99 - Espanha, apresentando um tamanho do fragmento de 225 pares de bases respectivamente, foram novamente amplificados em uma reação "nested", com volume final de 20 µl, e submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. O fragmento correspondente ao tamanho desejado foi removido do gel com auxílio de um bisturi e transportado para um microtubo de 1,5 ml. O gel foi cortado em pedaços muito pequenos e congelado a -76°C "overnight". Posteriormente foi centrifugado em microcentrífuga a velocidade máxima, por aproximadamente 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo e o DNA purificado submetido ao processo de clonagem.

3.8.2. Clonagem das amostras

Segmentos de DNA de 225 e 481 pares de bases, amplificados nas reações externa e "nested" da PCR e ligados em um segmento do vetor plasmidial pGEM T easy vector (Promega), de acordo com recomendações do fabricante. Em um microtubo de 1,5 ml, foram colocados 5 µl do produto da ligação (vetor + inserto) e 100 µl da bactéria competente *Escherichia coli* JM 109 alternando temperaturas de 0°C e 42°C. O conteúdo do microtubo foi transferido para 15 ml de um caldo LB (Luria Bertani) suplementado com 100 µg/ml de ampicilina, levado ao Shacker por 1 hora, a 37°C, em 490 g. Após, o "pellet" de bactérias foi esgotado assepticamente para a superfície de uma placa contendo ágar LB. As placas foram armazenadas em estufa a 37°C "overnight" e, posteriormente, os clones da bactéria com o inserto desejado foram selecionados. Em seguida, a extração do DNA plasmidial utilizando o kit Wizard plus SV mini preps (Promega). Para verificar se os clones selecionados continham o inserto de CVS-2 desejados, realizou-se uma reação externa ou "nested" da PCR e digestão do produto amplificado utilizando a enzima de restrição Eco RI.

3.8.3. Sequenciamento e análise da seqüência

As reações de sequenciamento foram realizadas no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO)-Viçosa. As seqüências obtidas foram analisadas para a resolução de prováveis ambigüidades e comparadas as seqüências de CSV depositadas no Genbank, utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponível no endereço eletrônico do "National Institute of Health- NCBI" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A percentagem de identidade entre as seqüências isoladas foi determinada utilizando o programa de alinhamento de múltiplas seqüências MultiAlin (<http://www.prodes.toulouse.inra.fr/mutalin>). A análise filogenética foi conduzida com o auxílio do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis-MEGA versão 2.1 para windows, com correção por Kimura, e a análise estatística foi assegurada com um valor de "Bootstrap" 100. O número de acesso no GeneBank das seqüências de CVS-2 utilizadas para a comparação filogenética pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3. Seqüências de circovirus suíno utilizadas para construção da árvore filogenética e seu número de acesso no Genbank.

Nº de acesso do Genbank	Vírus/Origem	Referência
AF027217	CVS-2 (2A)/Canadá	Hamel, A. L. et al., 1998
AF112862	CVS-2 (2B)/Canadá	Hamel, A. L. et al., 2000
AF109398	CVS-2 (2C)/Canadá	Hamel, A. L. et al., 2000
AF117753	CVS-2 (2D)/Canadá	Hamel, A. L. et al., 2000
AJ293869	CVS-2/Reino Unido	Meehan, B. M. et al., 2001
AF201897	CVS-2/ Holanda	Wellenberg, G. J. et al.-artigo não publicado
AF201308	CVS-2/ Espanha	Mankertz, A. et al., 2000
AJ223185	CVS-2//Estados Unidos	Morozov, I. et al., 1998
AF264042	CVS-2/Estados Unidos	Fenaux, M. et al., 2000
AF166528	CVS-2/Taiwan	Yang, K. H. et al.-artigo não publicado
AF381175	CVS-2/China	Lu, Y. e Yang, H.-artigo não publicado

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Padronização da PCR

Após o processo de padronização da PCR, o produto que forneceu melhor resultado foi 1,25 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 2 pmoles dos iniciadores e 1 U de Taq DNA polimerase. Esse produto foi submetido a 35 ciclos na reação externa da PCR e 30 ciclos na reação "nested". As temperaturas utilizadas foram de desnaturação a 95°C por 1 min; anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A reação finalizou com uma etapa de aquecimento a 72°C por 10 min para extensão final. A quantidade de DNA utilizada na reação externa foi de 2 μl contendo 80 ng de DNA e 2 μl do produto amplificado na primeira reação foi utilizado na reação "nested". Após as alterações realizadas nas condições da reação, o teste foi capaz de amplificar o DNA do CVS utilizando duas etapas (reação externa e "nested"), para a obtenção de resultados positivos.

As Figuras 1 e 2 apresentam o resultado da amplificação de fragmentos de 225 pares de bases obtidos após realização das reações externa e "nested" da PCR durante duas etapas distintas do processo de padronização da técnica. Nas duas reações utilizou-se as mesmas concentrações de MgCl₂ (1,25 mM), dNTP (200 μM), quantidade de Taq DNA polimerase (1 unidade) e três diferentes quantidades de DNA utilizadas. Inicialmente na reação externa da PCR foram testadas (120, 80, 40 ng). Também foram testadas diferentes concentrações de iniciadores nas duas etapas da padronização. Na Figura 1 todas as reações foram realizadas utilizando-se 20 pmoles de iniciadores e na Figura 2, em todas as reações utilizou-se 2 pmoles de iniciadores.

Na Figura 1, observamos um número maior de bandas inespecíficas que na Figura 2, e isso se deve provavelmente pela utilização de uma maior concentração de iniciadores (20 pmol) em combinação com elevada quantidade de seqüências alvo de DNA



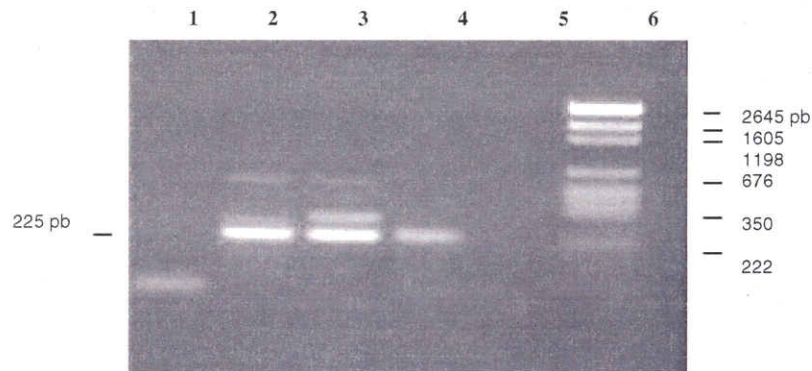


Figura 1 Gel de agarose 2% apresentando a amplificação de um produto de 225 pares de bases do CVS-2 obtido após a realização das reações externa e "nested" da PCR, durante o processo de padronização da técnica. Canaleta 1- Controle do mix da reação (água). Canaleta 2- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha na concentração de 120 ng de DNA. Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha na concentração de 80 ng de DNA. Canaleta 4- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha na concentração de 40 ng de DNA. Em todas reações utilizou-se 20 pmoles de iniciadores. Canaleta 5- Controle negativo (sobrenadante de cultivo de células PK15 não infectado). Canaleta 6- Padrão de tamanho molecular pGEM.

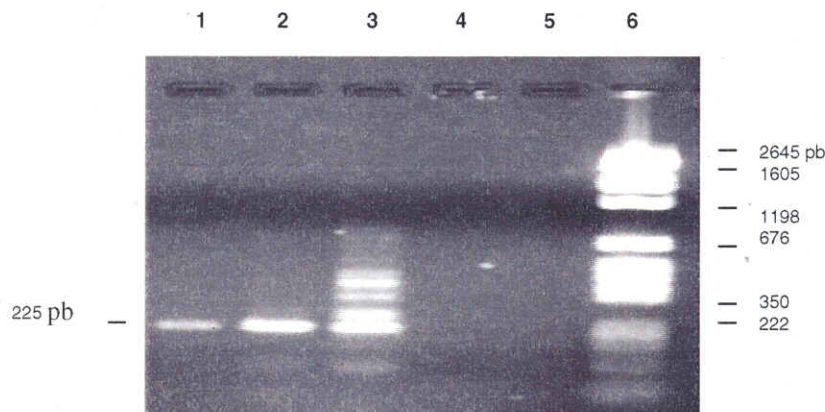


Figura 2 Gel de agarose 2% apresentando a amplificação de um produto de 225 pares de bases do CVS-2 obtido após a realização das reações externa e "nested" da PCR, durante o processo de padronização da técnica. Canaleta 1- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha na concentração de 40 ng de DNA. Canaleta 2- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha na concentração de 80 ng de DNA. Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha na concentração de 120 ng de DNA. Em todas reações utilizou-se 2 pmoles de iniciadores. Canaleta 4- Controle do mix da reação (água). Canaleta 5- Controle negativo (sobrenadante de cultivo de células PK15 não infectado). Canaleta 6- Padrão de tamanho molecular pGEM.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

4.2. Comparação dos métodos de extração de DNA

Treze amostras foram submetidas aos dois protocolos de extração de DNA. A extração do DNA de três amostras com a resina Chelex forneceu quantidades de DNA inferiores a 15 ng/ μ l e não foram encaminhadas para a PCR. Portanto, dez amostras de DNA obtidas utilizando-se os dois protocolos foram testadas na reação externa e "nested" da PCR. No método 1, onde o DNA foi extraído com o fenol/clorofórmio/alcóol isoamílico (25:24:1), cinco amostras foram positivas na reação externa e todas as amostras foram positivas na reação "nested". No método 2, o DNA foi extraído com Chelex, e quatro amostras foram positivas na reação externa e todas as 10 amostras foram positivas na reação "nested". Um maior número de amostras amplificadas utilizando a resina Chelex foi encontrada por Coombs et al. (1999), ao trabalhar com diferentes protocolos para extração do DNA de 34 amostras de tecido parafinado. Dezoito amostras (54%) foram amplificadas utilizando a extração com a resina Chelex e nove amostras (22,7%), foram amplificadas quando o DNA foi extraído com o fenol/clorofórmio/alcóol isoamílico. Entretanto, o método utilizado neste trabalho foi com o fenol/clorofórmio/alcóol isoamílico pois todas as amostras extraídas apresentaram quantidades de DNA superiores as utilizadas após padronização da PCR (≥ 40 ng/ μ l), o que não aconteceu quando o DNA foi extraído com a resina Chelex. Menores quantidades de DNA foram também obtidas por Botelho et al. (2000), utilizando a resina Chelex, que atribuiu a baixa quantidade de DNA obtido devido a perdas ocorridas após o processo de fervura, requerido para a realização da técnica.

4.3. Avaliação da PCR

4.3.1. Análise dos produtos da PCR por enzimas de restrição

Os produtos de 225 pares de bases amplificados após a realização da reação externa e "nested" da PCR das amostras clínicas 1D (Granja de Oliveira-MG) e do controle positivo N682/99-Espanha foram submetidos à digestão pela enzima de restrição Eco RI, para determinação da especificidade do fragmento obtido. A digestão forneceu fragmentos de 161 e 64 pela EcoRI. A Figura 3 mostra o resultado da digestão do produto de 225 pares de bases amplificado da amostra 5A. Os fragmentos obtidos foram identificados em gel de agarose 2% e quando comparados aos tamanhos de fragmentos fornecidos pelo programa BCM Search Launcher Query Sequence, ao analisar a amostra referência AF027217 de CVS-2, indicaram que os produtos amplificados foram específicos para o CVS-2. Com a análise dos fragmentos amplificados, pela RFLP, foi possível realizar uma caracterização primária das amostras estudadas

4.3.2. Especificidade

O resultado do sequenciamento do fragmento de 225 pares de bases da amostra clínica 1D (Granja de Oliveira-MG) forneceu uma seqüência de nucleotídeos que ao ser comparada a outras seqüências de CVS depositadas no GeneBank e com a seqüência controle N682/99-Espanha pôde ser caracterizada como circovirus suíno tipo 2. Quando a amostra clínica 1D foi comparada a amostra controle da Espanha mostrou haver uma homologia entre as seqüências de nucleotídeos de 96%. Maiores percentagens de homologia entre a seqüência de nucleotídeos foram encontradas entre a amostra clínica 1D com as amostras isoladas do Continente Americano (Canadá e Estados Unidos), apresentando 99,1% entre elas. A análise mais detalhada da identidade entre as seqüências de nucleotídeos das amostras estudadas será posteriormente descrita no item 4.6 e visualizadas na Tabela 12.



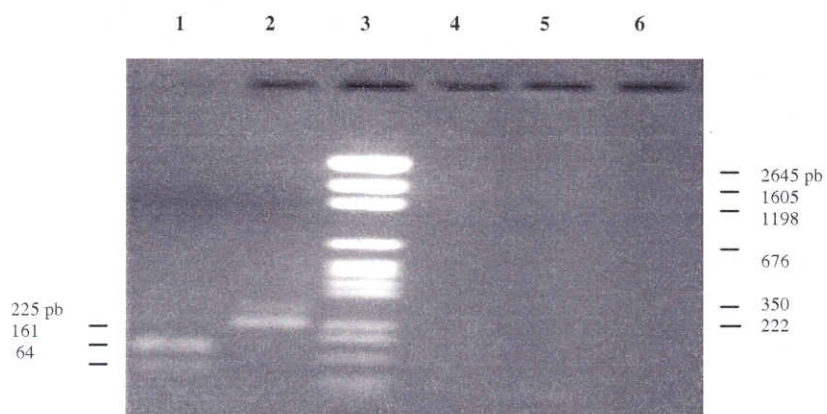


Figura 3. Gel de agarose 2% apresentando a análise de um produto de 225 pares de bases obtido na nested PCR por enzimas de restrição. Canaleta 1- Amplificação de fragmentos de 161 e 64 pares de bases obtidos após digestão da amostra clínica 1D (Granja de Oliveira-MG) pela enzima de restrição EcoRI. Canaleta 2- Amplificação de um produto de 225 pares de bases da clínica 1D (Granja de Oliveira-MG) não submetida a digestão enzimática. Canaleta 3- Padrão de tamanho molecular pGEM. Canaleta 4- Controle do mix da reação (água). Canaleta 5- Controle negativo (sobrenadante de cultivo de células PK15 não infectado).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

4.3.3. Sensibilidade Analítica da PCR

4.3.3.1. Sensibilidade em sobrenadante de cultivo celular

As Figuras 4 e 5 apresentam, respectivamente, a sensibilidade da PCR externa e "nested" em sobrenadante de cultivo celular infectada com uma amostra de circovirus suíno tipo 2 (EUA). Sobrenadante de cultivo de células PK 15 foi diluído de forma seriada e o DNA

extraído com o fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico e submetidos à reação da PCR. A diluição inicial da amostra foi de 10^{-1} , com título de 10^{-3} TCID₅₀/50 µl. A reação externa foi capaz de detectar o DNA do CVS até a diluição de 10^{-4} . Por outro lado a reação "nested" detectou o DNA do CVS-2 até a concentração de 10^{-8} . A reação "nested" levou a um aumento de sensibilidade de 10.000 vezes ao obtido utilizando somente a reação externa.

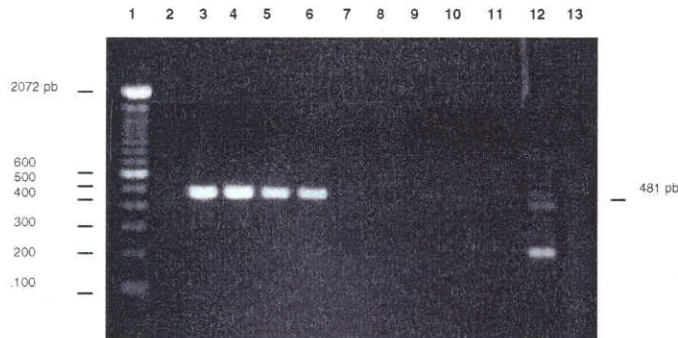


Figura 4 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 pela reação externa da PCR em diluições do sobrenadante de cultivo celular. Foi obtido um produto de 481 pares de bases do CVS-2. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaletas 3, 4, 5 e 6- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando um sobrenadante de cultivo celular infectado com CVS-2 nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Canaletas 7, 8, 9, 10 e 11- Resultados negativos na PCR utilizando um sobrenadante de cultivo celular infectado com CVS-2 nas diluições de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} . Canaleta 12- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha. Canaleta 13- Controle negativo (sobrenadante de cultivo de células PK15 não infectado).

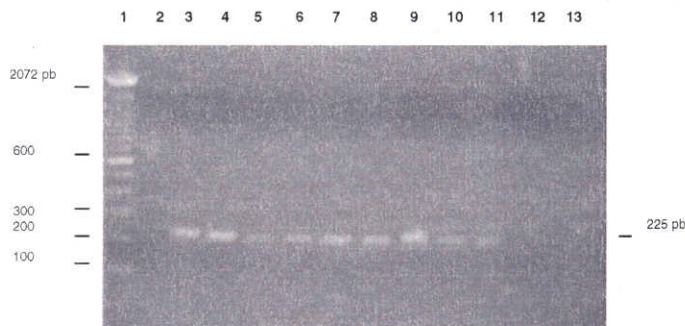


Figura 5 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 após a realização das reações externa e "nested" da PCR em diluições seriadas do sobrenadante de cultivo celular. Foi obtido um produto de 225 pares de bases do CVS-2. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N200/99-Espanha. Canaletas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando um sobrenadante de cultivo celular infectado com CVS-2 nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Canaletas 12 e 13- Resultados negativos na PCR utilizando um sobrenadante de cultivo celular infectado com CVS-2 nas diluições de 10^{-9} e 10^{-10} .

4.3.3.2. Sensibilidade utilizando diluições de cópias do plasmídeo

As Figuras 6 e 7 mostram a sensibilidade da PCR, também analisada pela amplificação de diluições seriadas das cópias do plasmídeo contendo um inserto de 481 (amostra controle N682/99) e 225 pares de bases (amostra de campo 1D-Granja de Oliveira), de amostras de CVS-2. Partiu-se de uma diluição inicial de 25 ng para o

plasmídeo contendo o fragmento de 481 pares de bases e de 50 ng para o plasmídeo contendo o fragmento de 225 pares de bases. A reação externa detectou DNA do CVS-2 até a concentração de 97 pg, o que corresponde a $29,38 \times 10^6$ cópias de DNA viral. A concentração detectada pela reação "nested" foi de 6 pg, correspondendo a $1,8 \times 10^6$ cópias de DNA viral, levando a um aumento de sensibilidade de aproximadamente 16 vezes.

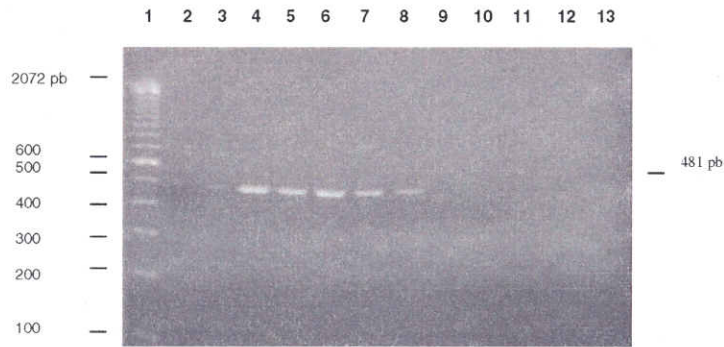


Figura 6 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 após a realização da reação externa da PCR em diluições de cópias de plasmídeo contendo o fragmento de 481 pares de bases do CVS-2. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controladora N682/99-Espanha. Canaletas 4, 5, 6, 7, 8- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando DNA plasmidial contendo a fragmento de 481 pares de bases do CVS-2 extraído de uma amostra de CVS-2 nas concentrações de 25 ng, 6,25 ng, 1,56 ng, 390 pg e 97 pg. Canaletas 9, 10, 11, 12 e 13- Resultados negativos na PCR utilizando DNA plasmidial contendo a fragmento de 481 pares de bases do CVS-2 extraído de uma amostra de CVS-2 nas concentrações de 24 pg, 6 pg, 1,5 pg, 370 fg e 94 fg de DNA.



Figura 7 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 após a realização da reação "nested" da PCR em cópias de plasmídeo contendo o fragmento de 225 pares de bases do CVS-2. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controladora N682/99-Espanha. Canaletas 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando DNA plasmidial contendo o fragmento de 225 pares de bases do CVS-2 extraído de uma amostra de CVS-2 nas concentrações de 50 ng, 25 ng, 6,25 ng, 1,56 ng, 390 pg, 97 pg, 24 pg, e 6 pg. Canaletas 11, 12 e 13- Resultados negativos na PCR utilizando DNA plasmidial contendo o fragmento de 225 pares de bases do CVS-2 extraído de uma amostra de CVS-2 nas concentrações de 1,5 pg e 370 fg de DNA.

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMG

4.3.3.3. Sensibilidade da PCR utilizando tecidos submetidos aos três processamentos

As Figuras 8, 9 e 10 apresentam a sensibilidade da PCR, detectada por diluições seriadas da amostra clínica 5A (Granja de Patrocínio-MG) estocada sob forma congelada, parafinada e formolizada contendo DNA do CVS-2. Partiu-se de uma concentração inicial de DNA total de 1000 ng até a concentração final de 25 ng. A reação externa da PCR não foi capaz de detectar o CVS-2 em nenhuma diluição quando se utilizou a metodologia descrita anteriormente e revelação em gel de agarose 2%. Porém a reação "nested" detectou o CVS-2 em tecidos congelados, da concentração inicial de DNA utilizado na reação externa de 1000 ng a 100 ng, para tecidos parafinados, da concentração inicial de DNA de 1000 ng até 300 ng e para tecidos formolizados, da concentração inicial de 1000 ng até 500 ng de DNA.

Devido à boa sensibilidade alcançada pela técnica padronizada e ao elevado número de resultados positivos obtidos com as amostras testadas, optou-se pela revelação dos produtos amplificados em géis de agarose, corados por brometo de etídeo que apresentam uma maior facilidade de preparação e agregam menor custo à técnica. Embora Rolfs et al. (1992) tenham descrito que o uso de géis de poliacrilamida possam aumentar a sensibilidade da técnica. Quando a PCR é utilizada para o diagnóstico de um agente, torna-se importante evitar a ocorrência de resultados falso-positivos causados pela contaminação cruzada de produtos da reação. Para minimizar o risco de resultados falso-positivos por contaminação, adotou-se uma separação de áreas para realização das etapas da reação e uma série de cuidados durante a extração e manipulação. Neste trabalho, os consistentes resultados negativos obtidos com os controles negativos indicaram não haver contaminação das reações.

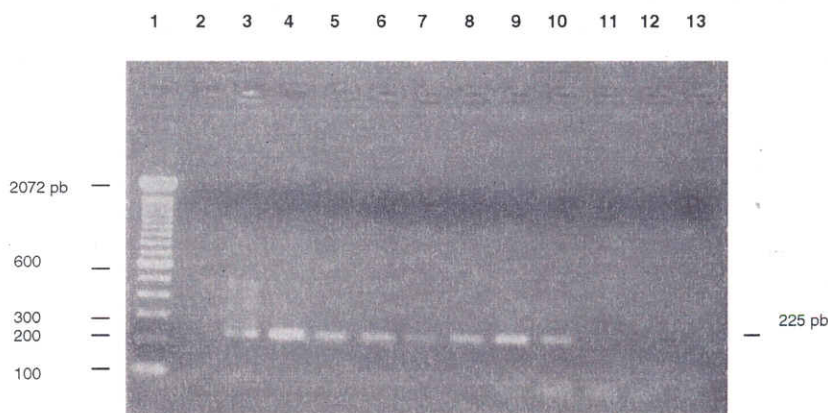


Figura 8 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 após a realização da reação externa e "nested" da PCR em tecidos congelados. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva N-682/99-Espanha. Canaletas 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando diluições seriadas do DNA extraído da amostra de campo 5A (Granja de Patrocínio) de tecido congelado positivo para a presença do CVS-2 nas concentrações iniciais de DNA de 1000 ng, 800 ng, 600 ng, 500 ng, 300 ng, 200 ng e 100 ng. Canaletas 11 e 12- Resultados negativos na PCR utilizando diluições seriadas do DNA extraído da amostra de campo 5A (Granja de Patrocínio) de tecido congelado positivo para a presença do CVS-2 nas concentrações iniciais de DNA de 50 ng e 25 ng.

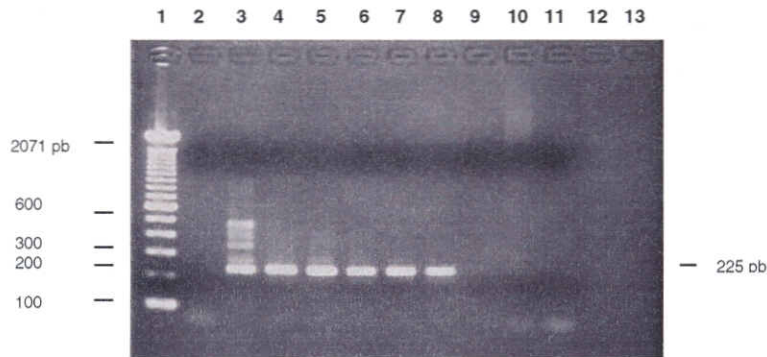


Figura 9 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 após a realização da reação externa e "nested" da PCR em tecidos parafinados. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 b ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva 0139616-EUA. Canaleta 4 a 11- Canaletas 4, 5, 6, 7 e 8- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando diluições seriadas do DNA extraído da amostra de campo 5A (Granja de Patrocínio) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2 nas concentrações iniciais de DNA de 1000 ng, 800 ng, 600 ng, 500 ng e 300 ng. Canaletas 9, 10, 11 e 12- Resultados negativos na PCR utilizando diluições seriadas do DNA extraído da amostra de campo 5A (Granja de Patrocínio) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2 nas concentrações iniciais de DNA de 200 ng, 100 ng, 50 ng e 25 ng.

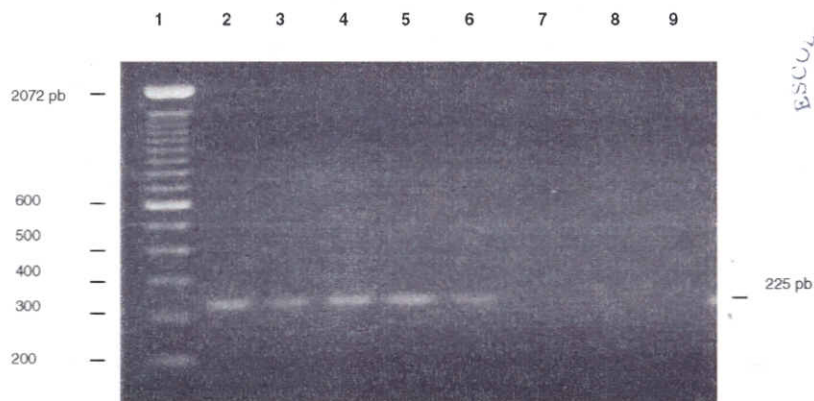


Figura 10 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da detecção do DNA do CVS-2 após a realização das reações externa e "nested" da PCR em tecidos formolizados. Canaleta 1- Padrão de tamanho molecular 100 bp ladder. Canaleta 2- Controle do mix da reação (água). Canaletas 3, 4 5 e 6- Amplificação de produtos positivos na PCR utilizando diluições seriadas do DNA extraído da amostra de campo 5A (Granja de Patrocínio) de tecido formolizado positivo para a presença do CVS-2 nas concentrações iniciais de DNA de 1000 ng, 800 ng, 600 ng, 500 ng. Canaletas 7 e 8- Resultados negativos na PCR utilizando diluições seriadas do DNA extraído da amostra de campo 5A (Granja de Patrocínio) de tecido formolizado positivo para a presença do CVS-2 nas concentrações iniciais de DNA de 300 ng e 100 ng. Canaleta 9- Controle negativo (água).

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA
DA UFMS

4.4. Amostras clínicas

4.4.1. PCR

Após a padronização da técnica foi iniciado o trabalho com as amostras coletadas em granjas brasileiras. Para a detecção do CVS-2 em tecidos, optou-se pela utilização de um "pool" de tecidos composto por pulmão e órgãos linfóides (linfonodos, íleo contendo placas de Peyer e baço), por serem estes, os órgãos primários de multiplicação viral (Margar et al., 2000). Kim et al. (2003), trabalhando com animais infectados experimentalmente observaram a ocorrência de lesões microscópicas e detecção do DNA do CVS-2 primeiramente

nos tecidos linfóides e pulmões. Outros tecidos como fígado e rim, também foram incluídos no "pool" de tecidos, pois com um progresso da infecção o vírus pode se tornar sistemicamente distribuído em tecidos não linfóides. Margar et al. (2000) detectaram o DNA do CVS-2 em vários tecidos e órgãos com duas a três semanas pós-infecção.

Os resultados da PCR em algumas amostras clínicas podem ser observados na Tabela 4. Das 35 amostras de tecidos congelados testadas, 34 (97,1%) foram positivas. Das 32 amostras parafinadas, 28 (87,5%) e das 23 amostras formolizadas, 20 (87%) foram positivas.

Tabela 4 Detecção do CVS-2 em amostras de tecidos submetidas a três diferentes tipos de processamento.

Reação	Tecido congelado		Tecido parafinado		Tecido formolizado	
	Externa	"Nested"	Externa	"Nested"	Externa	"Nested"
Negativo	21	1	27	4	23	3
Positivo	14	34	5	28	0	20
Total	35	35	32	32	23	23

Embora Ouardani et al. (1999) tenham demonstrado que uma única etapa de reação seja suficiente para a identificação de amostras CVS-2 positivas, neste estudo, para todos os tipos de processamento a reação externa não foi suficiente na produção de produtos amplificados, já que 21 (58,3%) das amostras congeladas, 27 (84,8%) das parafinadas e 23 (100%) amostras formolizadas não foram detectadas utilizando somente uma única reação. O aumento da sensibilidade pelo uso da reação "nested" teve grande influência no número de resultados positivos. Resultado semelhante a este, foi encontrado por e Larochelle et al. (2000); Banlunara et al. (2002) e por Celer Jr e Carasova (2002); que obtiveram um aumento da sensibilidade do teste ao utilizar uma reação "nested". A maior sensibilidade da PCR, alcançada pelo uso da reação "nested" está relacionada ao aumento das seqüências alvo nas amostras investigadas,

que poderiam estar em quantidades inadequadas para serem detectados utilizando somente uma única etapa de amplificação.

Dezoito amostras, concomitantemente armazenadas congeladas, parafinadas e formolizadas, tiveram o DNA extraído dos três tipos de tecido e foram testadas nas reações externa e "nested" da PCR. Os resultados podem ser observados na Tabela 5. Três amostras formolizadas e uma amostra parafinada apresentaram resultado negativo na PCR. Porém, as mesmas foram positivas quando testadas nos mesmos tecidos congelados. Um maior número de resultados positivos foram obtidos ao se analisar o DNA extraído de tecidos congelados. O resultado da amplificação do fragmento de 225 pares de bases do CVS-2 extraído de algumas amostras clínicas de tecidos parafinados pode ser observado na Figura 11.

Tabela 5 Detecção do CVS-2 em amostras de tecidos congelados, parafinados e formolizados

Reação	Tecido congelado		Tecido parafinado		Tecido formolizado	
	Externa	"Nested"	Externa	"Nested"	Externa	"Nested"
Negativo	6	0	5	1	18	3
Positivo	12	18	13	17	0	15
Total	18	18	18	18	18	18

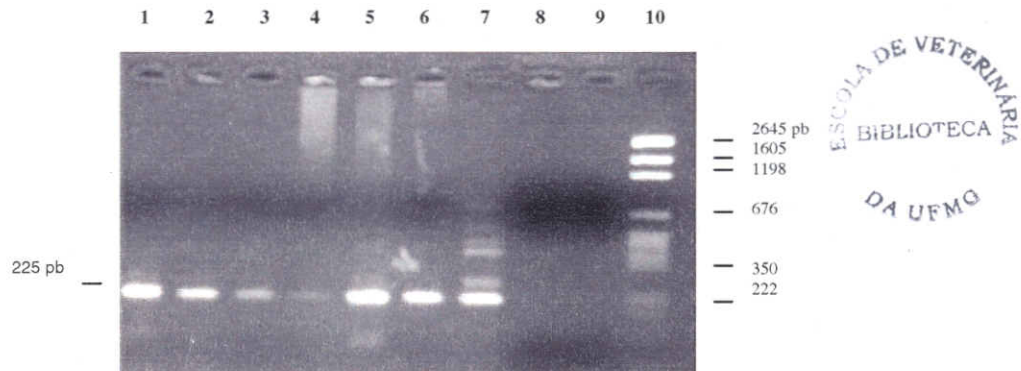


Figura 11 Gel de agarose 2% apresentando o resultado da amplificação de um fragmento de 225 pares de bases de amostras clínicas coletadas em granjas do Brasil. Canaleta 1- Amplificação de um produto positivo de CVS-2 na PCR utilizando a amostra de campo 1B (Granja de Patrocínio) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2. Canaleta 2- Amplificação de um produto positivo de CVS-2 na PCR utilizando a amostra de campo 1A (Granja de Patrocínio) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2. Canaleta 3- Amplificação de um produto positivo de CVS-2 na PCR utilizando a amostra de campo 1F (Granja de Ponte Nova) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2. Canaleta 4- Amplificação de um produto positivo de CVS-2 na PCR utilizando a amostra de campo 2F (Granja de Ponte Nova) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2. Canaleta 5- Amplificação de um produto positivo de CVS-2 na PCR utilizando a amostra de campo 1G (Granja de Entre Rios do Oeste) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2. Canaleta 6- Amplificação de um produto positivo de CVS-2 na PCR utilizando a amostra de campo 1C (Granja de Medianeira) de tecido parafinado positivo para a presença do CVS-2. Canaleta 7- Amplificação de um produto positivo na PCR utilizando a amostra controle positiva 0139616-EUA. Canaleta 8- Controle do mix da reação (água). Canaleta 9- Controle negativo (animal negativo). Canaleta 10- Padrão de tamanho molecular pGEM.

O processamento utilizado para tecidos congelados pareceu manter melhor a integridade de seqüências maiores de DNA, visto que um maior número de amostras foram detectadas na reação externa e "nested". Isso sugere que o aumento da sensibilidade conferido pela utilização da reação "nested" neste estudo pode também estar relacionada à forma de conservação das amostras de tecidos testadas.

Os tecidos parafinados exibem uma série de limitações que variam desde a retirada da parafina até a fixação. Sabe-se que o produto extraído dessas amostras pode reduzir a eficiência da amplificação. Este trabalho demonstrou que o tolueno e tampão de digestão com detergente produziram bons resultados na purificação das amostras. O uso de determinados detergentes tal como Tween 20, em conjunto com a proteinase K e outros solventes podem também estar interferindo na qualidade do DNA obtido levando a diminuição de amostras detectadas na reação externa, assim como um resultado falso-negativo, apesar do uso de um complexo protocolo de purificação. Estes fatos parecem explicar porque uma amostra parafinada e duas formolizadas apresentaram resultados negativos na reação "nested" da PCR e positivos quando analisadas de tecidos congelados. A PCR teve resultado negativo em somente uma amostra clínica, coletada de um animal submetido a uma criação "em fundo de quintal". Este achado pode ser justificado por este animal pertencer a uma pequena criação fechada, cujos animais não tinham contato com outros suínos por pelo menos 10 anos.

Quando se trata de materiais parafinados ou formolizados podemos destacar a facilidade de amplificação de seqüências alvo menores, quando se usa uma reação "nested", pois o DNA presente em tecidos parafinados ou formolizados pode estar degradado devido ao processo de fixação e inclusão em parafina (Bascunana e Belak, 1996; Greer et al., 1991). Para minimizar essa degradação as amostras foram incluídas em parafina em um prazo máximo de 15 dias após sua coleta e para tecidos

formolizados a PCR foi realizada em até 30 dias pós sua fixação. A presença de certos inibidores contra a Taq polimerase em tecidos parafinados é um problema bem conhecido que geralmente leva a resultados falso-negativos (Bascunana e Belak, 1996). Com o objetivo de remover os inibidores foi adotado um complexo protocolo de lavagem e purificação do DNA.

Todas as amostras que tiveram resultados positivos na reação externa, também apresentaram resultados positivos na reação "nested", podendo ser caracterizadas como CVS-2, já que a reação "nested" é específica para a detecção do CVS-2. Porém, como a reação externa pode detectar a presença dos dois tipos de CVS a presença do CVS-1, nas mesmas amostras onde o CVS-2 estava presente, não pode ser descartada.

Somente uma amostra, coletada de um animal submetido a uma criação "em fundo de quintal", proveniente de uma granja localizada no município de Pompéu, apresentou resultado negativo na PCR. Tecidos de animais recém nascidos assim como os coletados de animais em abatedouro (aproximadamente 150 dias) foram positivos para o CVS-2, indicando a presença de infecção pelo CVS-2 em diferentes faixas etárias, o que pode ser sugestível de uma infecção persistente. Esses dados estão em concordância com o observado por outros autores e sugerem a ocorrência de uma infecção persistente, assim como a possibilidade de animais adultos funcionarem como carreadores do CVS-2, assumindo um papel importante na disseminação do agente dentro de um rebanho. Margar et al. (2000), identificaram o CVS-2 em tecidos, utilizando a técnica de PCR, imunohistoquímica e isolamento viral até 34 dias pós-infecção. Kim et al. (2003), detectaram o CVS-2 utilizando a hibridização "in situ" em suínos com até 35 dias pós-infecção. Estudo realizado por Bolin et al. (2001) também detectaram DNA do CVS-2 pela PCR em tecidos de animais com 52 a 125 dias pós-infecção. Nesse experimento, foi possível realizar o isolamento viral em algumas amostras. A detecção do agente em animais natimortos

sugere a existência de transmissão vertical do vírus. Embora, esse mesmo achado tenha sido descrito por O'Connor et al. (2001), ao analisarem leitões natimortos, mumificados e recém-nascidos. Neste trabalho, estes autores detectaram a presença do CVS-2 em animais natimortos, sugerindo uma possível ocorrência de transmissão vertical, que ainda tem sido pouco descrita na literatura mundial.

Nesse trabalho, encontrou-se um grande número de resultados positivos. Dos trinta e cinco animais analisados, trinta e quatro (97,1%) foram positivos na PCR, obtendo-se uma alta prevalência do DNA do CVS-2 nos rebanhos analisados. O CVS-2 foi detectado em todos os dezoito animais provenientes de oito granjas do Estado de Minas Gerais (municípios de Patrocínio, Oliveira, Pará de Minas, Ponte Nova, Igarapé e Viçosa), em sete animais provenientes de duas granjas localizadas no Estado do Paraná (municípios de Entre Rios do Oeste e Medianeira) e em seis animais provenientes de uma granja do Estado de Goiás (município de Rio Verde) e em três animais provenientes de uma granja localizada no município de Patrocínio, animais estes que tiveram os tecidos coletados em um frigorífico.

4.5. Comparação da PCR aos testes de hibridização "in situ", imunohistoquímica e análise histopatológica

Vinte e oito amostras clínicas foram submetidas à análise histopatológica e cinco amostras apresentaram lesões sugestivas

da SRPD que incluíam uma pneumonia intersticial e depleção linfóide. No pulmão, foi encontrada uma pneumonia broncointersticial; com presença de um infiltrado inflamatório constituído predominantemente por macrófagos, distribuídos de forma multifocal nos brônquios, região peribronquiolar, peribronquial e nos septos alveolares. Nos tecidos linfóides foi observada uma inflamação granulomatosa caracterizada pela presença de um infiltrado predominantemente constituído de macrófagos, células gigantes multinucleadas e moderada a acentuada rarefação de linfócitos. Aglomerados de corpúsculos de inclusão foram visualizados no citoplasma de macrófagos em três animais analisados.

Doze amostras foram submetidas aos 4 testes e os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 6. O resultado negativo de 12 amostras submetidas às técnicas de hibridização "in situ" e imunohistoquímica, embora todas elas tenham sido positivas na PCR, comprovam a maior sensibilidade da PCR, fato este também observado por Calsamiglia et al. (2002), embora uma alta concordância entre os resultados obtidos com hibridização e "nested" PCR possam ocorrer (Kim e Chae, 2001). Duas amostras apresentaram lesões sugestivas da SRPD na análise histológica, resultado positivo na PCR e negativo nas duas outras técnicas. Essas amostras podem ser interpretadas como falso-negativas para a presença do CVS-2 a hibridização "in situ" e imunohistoquímica.

Tabela 6 Correspondência entre a detecção do CVS-2 pelas técnicas de PCR, hibridização "in situ", imunohistoquímica e lesões histológicas características.

Amostras	PCR	Histopatologia	Imunohistoquímica	Hibridização "in situ"
1A (Patrocínio)	+	-	-	-
2A (Patrocínio)	+	+	-	-
3A (Patrocínio)	+	-	-	-
5A (Patrocínio)	+	-	-	-
1B (Patrocínio)	+	-	-	-
2B (Patrocínio)	+	+	-	-
1C (Medianeira)	+	-	-	-
2C (Medianeira)	+	-	-	-
3C (Medianeira)	+	-	-	-
4C (Medianeira)	+	-	-	-
1G (Entre Rios do Oeste)	+	-	-	-
2G (Entre Rios do Oeste)	+	-	-	-



Estudos realizados por Liu et al. (2000), Quintana et al. (2001) e Rossel et al. (1999), demonstraram a existência de uma correlação entre a quantidade de ácido nucléico do CVS-2 encontrada nos tecidos e severidade das lesões microscópicas. As lesões sugestivas da SRPD encontradas neste estudo podem ser caracterizadas como leves e em dez casos analisados, inexistentes. Devido ser a PCR mais sensível que a hibridização, "in situ", os casos com lesões microscópicas leves a moderadas ou mesmo inexistentes e pequena quantidade de DNA viral, somente foram detectados pela PCR. Este fato pode ocorrer em casos onde os animais estão infectados subclínicamente, em fases iniciais da doença ou em fase coalescente da doença. (Calsamiglia et al., 2002; Segalés, 2002). Por isso, a PCR pode ser considerada uma melhor técnica que a hibridização se o objetivo for detectar animais que contenham vírus ou não. Segalés et al. (2003), relatam a possibilidade de ocorrência de casos com lesões histológicas características e presença de baixa quantidade de DNA. Nessa situação o agente pode ser detectado pela técnica da PCR, mas não pela imunohistoquímica e hibridização "in situ", devendo ser feita a interpretação dos resultados laboratoriais em concordância com a evolução do curso clínico da doença.

Os resultados obtidos com a utilização da PCR mostram claramente que muitos suínos possuem o DNA do CVS-2 nos tecidos, embora a sintomatologia clínica e

os achados histopatológicos não indiquem a presença da síndrome da refugagem. Resultado semelhante a esse foi encontrado por Larochelle et al. (1999), que detectaram a presença do CVS-2 em tecidos, utilizando uma PCR, mesmo em casos onde não se observava nenhum sinal clínico e lesões histológicas. Esses resultados indicam a presença de uma infecção subclínica ou uma variação de virulência do CVS-2. Por esta razão, o diagnóstico das infecções causadas pelo CVS-2, utilizando a técnica da PCR deve ser realizado com bastante critério, onde a interpretação dos resultados da PCR deve ser avaliada em conjunto com a presença de sinais clínicos e evolução da doença no rebanho. Isso porque existem evidências que a infecção por CVS-2 possa ocorrer sem manifestação de doença, assim como alguns sinais clínicos não são específicos das síndromes provocadas pelo CVS-2.

A PCR desenvolvida neste estudo foi sensível e específica para a detecção do CVS-2 em tecidos, fornecendo um método alternativo para a detecção do CVS, mesmo em casos onde a quantidade do agente presente em tecidos, não seja suficiente para manifestações de sinais clínicos da doença. A presença endêmica do CVS-2 na população de suínos, faz com que a PCR seja um método alternativo para o estudo de possíveis rotas de excreção viral e identificação de animais ou rebanhos negativos. CVS-2 já foi detectado em secreção nasais, oculares e bronquiais, urina, fezes e sêmen (Hamel et al., 2000;

Krakowka et al., 2000; Calsamiglia et al., 2002). A necessidade de desenvolvimento de testes de PCR para o diagnóstico do CVS-2 é reforçada ainda, pela possibilidade de diferenciação do CVS-2, patogênico para suínos, do CVS-1, descrito até o presente momento como não causador de doença clínica.

4.6. Sequenciamento, análise das seqüências e inferência filogenética

As amostras 1D (UFMG) e N682/99 (Controle- Espanha) foram amplificadas pela PCR e os fragmentos de 225 pares de bases obtidos na reação "nested" foram seqüenciados e comparados a 11 amostras de CVS-2 depositadas no Genbank. A Figura 12 mostra o alinhamento das seqüências de nucleotídeos das amostras de CVS-2. A amostra 1D (UFMG), isolada no Brasil, mostrou uma maior identidade da seqüência de nucleotídeos com as amostras AF027217 (2A) do Canadá, AF381175 da China, AJ223185 e AF264042 dos Estados Unidos, apresentando somente uma troca de bases quando comparadas. O alinhamento destas amostras revelou uma homologia entre a seqüência de nucleotídeos de 99,1%. Quando o isolado do Brasil foi comparado às outras amostras, encontrou-se duas trocas de bases com a amostra AF112862 (2B) do Canadá, seis com a amostra AF109398 (2C), sete trocas com a amostra AF166528 de Taiwan, oito trocas com a amostra controle N682/99, dez trocas com AF201308 da Espanha, 14 trocas com AF117753 (2D) do Canadá, 17 com AJ293869 do Reino Unido e 20 trocas com a amostra AF201897 da Holanda. A homologia entre a seqüência de nucleotídeos encontrada quando estas

amostras foram analisadas variou entre 90,7 a 98,6%. Houve a ocorrência de uma inserção de base nas amostras 1D e N682/99. A determinação da relação genética entre as seqüências foi realizada pela construção da árvore filogenética e análise de "bootstrap". A Figura 13 mostra a árvore filogenética resultante da análise do fragmento de 225 pares de bases de 13 amostras de CVS-2. De acordo com a figura, pode ser observada a formação de 2 agrupamentos distintos relacionados geneticamente. Na parte superior da árvore filogenética, observa-se a formação de um grande "cluster" formado pelo isolado do Brasil, amostra da China, Canadá, amostras dos Estados Unidos, Espanha e Taiwan. Dentro deste "cluster", vários agrupamentos foram formados e a amostra 1D foi alocada em um braço juntamente com as amostras AF027217 (2A) do Canadá, AJ223185 e AF264042 dos Estados Unidos e AF381175 da China (bootstrap 67). As amostras AJ293869 do Reino Unido e AF201897 da Holanda foram agrupadas em um outro "cluster" com um bootstrap 100. Embora o genoma do CVS-2 seja descrito como relativamente estável (Celer Jr et al, 2002), neste estudo, algumas diferenças genéticas foram encontradas entre amostras de diferentes países. Pequenas diferenças entre a seqüência de nucleotídeos de isolados de várias regiões do mundo, também foram encontrados por Fenaux et al. (2000). O significado desta diversidade genética entre isolados de CVS-2 ainda não está muito bem esclarecida na literatura mundial, mas pode ter uma importante implicação no diagnóstico e no estudo do mecanismo patogênico do CVS-2.



Figura 12- Alinhamento da sequência de CVS-2 isolada de uma granja brasileira e amostras controle da Espanha com outras seqüências de CVS-2 depositadas no Genebank, realizadas pelo programa de alinhamento de múltiplas seqüências MultiAlin. A localização geográfica dos isolados estão indicadas por abreviaturas do país ou sigla de identificação: UFMG- amostra de CVS-2 isolada do Brasil; 2A, 2B, 2Ce 2D- amostras de CVS-2 identificando os subtipos A, B, C e D, isolados do Canadá; CH-amostra de CVS-2 isolada da China; USA- amostras de CVS-2 isoladas dos Estados Unidos; TAI- amostra de CVS-2 isolada de Taiwan; N682/99- amostra de CVS-2 utilizada como controle positivo, isolada da Espanha; ESP- amostra de CVS-2 isolada da Espanha; UK- amostra de CVS-2 isolada do Reino Unido; HOL- amostra de CVS-2 isolada da Holanda. As letras coloridas de vermelho significam homologia entre as bases de todas as amostras alinhadas. O traço de coloração preta significa inserção de bases. Letras coloridas de azul significam que não ocorreu homologia entre as bases de todas as seqüências alinhadas.

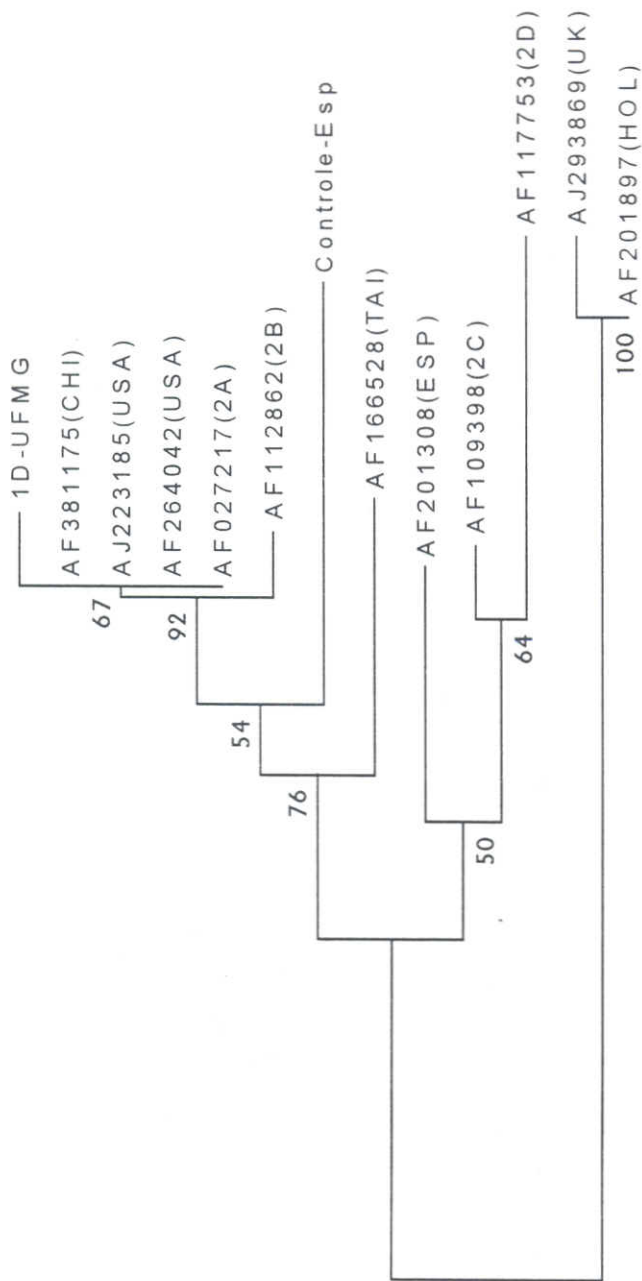


Figura 13 - Árvore filogenética construída com base em seqüências parciais de 225 pares de bases do CVS-2, utilizando o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis-MEGA versão 2.1 para Windows e correção por Kimura. A análise estatística foi assegurada com um valor de "Bootstrap" 100 e as seqüências de nucleotídeos dos isolados comparadas umas com as outras. O número de acesso no GeneBank e a identificação das amostras estão descritos na figura. Na parte superior da Figura formou-se um agrupamento formado pela amostras do Brasil (ID-UFMG); CHI-amostra de CVS-2 isolada da China; USA- amostras de CVS-2 isoladas dos Estados, 2A, 2B e 2C e 2D- amostras de CVS-2 identificando os subtipos A, B, C e D, isolados do Canadá; TAI- amostra de CVS-2 isolada de Taiwan; N682/99- amostra de CVS-2 utilizada como controle positivo, isolada da Espanha; ESP- amostra de CVS-2 isolada da Espanha. Na parte inferior da figura um outro agrupamento foi formado pelas amostras UK- amostra de CVS-2 isolada do Reino Unido; HOL- amostra de CVS-2 isolada da Holanda com um "bootstrap" de 100. ESCOLA DE VETERINÁRIA

BIBLIOTECA
DA UFMG

5. CONCLUSÕES

1. O teste de PCR permitiu uma rápida, específica e sensível forma de detecção do CVS-2 em amostras de tecidos congelados, parafinados e formolizados, podendo ser um método bastante útil para constatar a presença do vírus em um plantel.
2. A utilização de tecidos congelados aumentou a probabilidade de detecção do DNA do CVS-2, possibilitando um menor número de amostras com resultados falso-negativos.
3. Todas as amostras positivas na reação externa foram também positivas na reação "nested", caracterizando a presença do CVS-2 nos animais analisados.
4. O DNA do CVS-2 foi detectado em um grande número de animais (97,1%), obtendo-se uma alta prevalência do CVS-2 nos animais analisados.
5. O CVS-2 pôde ser detectado em rebanhos dos Estados de Minas Gerais, Paraná e Goiás.
6. O DNA do CVS-2 estava presente em animais de 26 a 150 dias de idade e em leitões natimortos, demonstrando uma ampla distribuição do vírus em animais de diferentes faixas etárias.
7. A PCR pode ser considerada como uma importante ferramenta para o diagnóstico do CVS-2, detectando o vírus inclusive em tecidos de muitos suínos que não apresentavam sintomatologia clínica e achados histopatológicos que indicassem a presença da síndrome da refugagem pós-desmama. Devido a este fato, a técnica não deve ser utilizada separadamente para a realização do diagnóstico da síndrome.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, G. M.; PHENIX, V.; TODD, D.; McNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 4, n. 4, p. 17-26, 1994.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARK, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; MEEHAN, B.; ADAIR, M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 10, n. 1, p. 3 -10, 1998a.
- ALLAN, G.; MEEHAN, B.; TODD, D.; KENNEDY, S.; McNEILLY, J. A.; ELLIS, E. G.; CLARK, J.; HARDING, E.; ESPUNA, E.; BOTNER, A.; HARREYRE, C. E. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Veterinary Record*, v. 142, n. 17, p. 467-468, 1998b.
- ALLAN, G. M.; KENNEDY, S.; McNEILLY, S.; FOSTER, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MEEHAN, B.; ADAIR, B. Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of piglets with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal Comparative Pathology*, v. 121, n. 1, p. 1-11, 1999.
- ALLAN, G.M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a Review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, p. 3-14, n. 1, 2000.
- ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MEEHAN, B.; McNAIR, I.; WALKER, I.; KENNEDY, S. Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV-2 replication. *Archives of Virology*, v. 145, p. 2421-2429, 2000.



- BANLUNARA, W. K.; TANTILERTCHAROEN, R.; SUZUKI, K.; ALBARENQUE, S. M.; THANAWONGNUWECH, R. T.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin-fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 34, n. 5, p. 449-452, 2002.
- BARCELLOS, D. A.; PESCADOR, C. E. Circovirose suína. *Sanidade em Foco*, v. 6, p. 3., 2003.
- BASCUNANA, C. R.; BELAK, K. Detection and identification of Mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 10, p. 2351-2355, 1996.
- 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, n. 7, p. 548-550, 2001.
- BOLIN, S. R.; STOFFEREGEN, 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, n. 2, p. 185-194, 2001.
- BOTELHO, R. G. A. *Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos*. 2000. 45 f. Dissertação (Mestrado em medicina Veterinária)-Escola de Veterinária, Universidade federal de Minas gerais, Belo Horizonte.
- BRITO, L. A. B.; SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M. P. C.; SEGALÉS, J. Síndrome da dermatite e nefropatia suína. In: SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO, Jr, P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. *Circovirose suína e Circovirus suíno*. Goiânia: Pfizer, 2002, p. 44-51.
- 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, n. 5, p. 1848-1850, 2002.
- 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 circovirus 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: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiás, *Anais...Goiás: ABRAVES*, 2003, p. 107-108.
- CELER JR., V.; CARASOVA, P. First evidence of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection of pigs in the Czech Republic by semi-nested PCR. *Journal of Veterinary Medicine B*, v. 49, n. 3, p. 155-159, 2002.
- CHOI, C.; CHAE, C. In-situ Hibridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, v. 121, n. 3, p. 265-270, 1999.
- CHOI, C.; CHAE, C.; CLARK, E. G. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 12, n. 2, p. 151-153, 2000.
- COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Research*, v. 27, n. 16, p. 12,1999.

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.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, 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, n. 1, 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, 1999.

ELLIS, J. A.; ALLAN G. M. The natural History of Porcine circoviruses. In: POST-WEANING Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS): a new emerging disease of swine. Melburn: Merial, 2000. p. 3-19.

FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; GILL, M.; TOTH, T.E.; MENG, X. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 7, p. 2494-2503, 2000.

FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; HAQSHENAS, G.; ROYER, R.; THOMAS, P.; NAWAGITGUL, P.; GILL, M.; TOTH, T. E.; MENG, X. J. Cloned Genomic DNA of

type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *Journal of Virology*, v. 76, n. 2, p. 541-551.

GUILLMOTO, H.; SABINE, W. R. Control of PMWS in Brittany - a mainly zootechnical approach. In: POST-WEANING Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS): a new emerging disease of swine. Melburn: Merial, 2000. p. 45-55.

GREER, C. E.; PETERSON, S. L.; KIVIAT, N. B.; MANES, M. M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: effects of fixative and fixation time. *American Journal Clinical Pathology*, v. 95, p. 117-124, 1991.

HAMEL, A. L.; LIN, L. L.; NAYAR, G. P. S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, v. 72, p. 5262-5267, 1998.

HAMEL, A. L.; LIN, L.L.; SACHVIE, C.; GRUDESKEI, E.; NAYAR, G. P. S. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *The Canadian Journal of Veterinarian Research*, v. 64, n. 1, p. 44-52, 2000.

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

HARDGE, T.; GAUMANN, H.; HASBERG, W.; LANGE, S. The economic impact of PMWS in the nursery- review of a successful control program. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 4, 2003, Rome. *Anais...Roma, 2003, p. 203-204.*

HARDING, J. C.; HALBUR, P. G. PMWS or a group of Pcv-2 associated syndromes: ever-growing concerns. In: PMWS and PCV2 disease-beyond the debat. Ames: Merial, 2002, p. 19-31.

- KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. M. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *Journal Comparative Pathology*, v. 122, n. 1, p. 9-24, 2000.
- 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, 2001.
- KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and Porcine Parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, v. 128, n. 1, p. 52-59, 2003.
- KIPEL, 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, n. 4, 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, n.3, p. 254-263, 2000.
- 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.
- LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; McNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunoestimated and non-immunoestimated 3 week old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Veterinary Microbiology*, v. 89, n.2, p. 97-114, 2002.
- 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.
- LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. PCR Detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 12, p. 4629-4632, 2000.
- LIU, K.; WANG, L.; WILLSON, P.; BALBIUK, L. A. Quantitative, competitive pcr analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3474-3477, 2000.
- LUKERT, P. D. *Porcine circovirus*. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. (Ed.). *Disease of swine*. 8. ed. Iowa: Academic Press, 1999. p. 119-124.
- MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*, v. 63, n.3, p. 223-233, 2000.
- MANKERTZ, A.; DOMINGO, M.; FOLCH, J. M.; LeCANN, P.; JESTIN, A.; SEGALÉS, J.; GHIELEWICZ, B.; PLNADURÁN, J.; SEIKE, D. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research*, v. 66, p. 66-77, 2000.

MARGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S. LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. *Journal of Comparative Pathology*, v.123, n.4, p. 258-269, 2000.

McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for detection of a new porcine circovirus on formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Virology Methods*, v. 80, p. 123-128, 1999.

MEEHAN, B. M.; McNEILLY, F.; TOOD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V. A.; ELLIS, J. A.; HASSARD, L. E.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M.; ALLAN, G. M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2171-2179, 1998.

MEEHAN, B. M.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; WALKER, I.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. M. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology*, v. 146, p. 835-842, 2001.

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, n. 9, p. 2535-2541, 1998.

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.

NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.; MOROZOV, I.; THACKER, B. J.; SORDEN, S.D.; LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P.S. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of

antibodies to PCV. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, p. 33-40, 2002.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BORGDAN, 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.

OUARDANI, M.; WILSON, L.; JELLE, R.; MONTPETIT, C.; DEA, S. Multiplex PCR for detection of porcine circovirus and typing of porcine circoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3917-3924, 1999.

PINTO, F. F.; LOBATO, Z. I. P.; NASCIMENTO, E. F.; ROCHA, M.A.; BARBOSA, C.N. Detecção do circovirus 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.; PLANADURAN, J.; DOMINGO, M. Diagnostic profile of a conventional pig farm with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Record*, v. 149, p. 357-361, 2001.

REED, L. J.; MUENCH, H. A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene*, n. 27, p. 493-497, 1938.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; RESENDES, A. R.; BALASCH, M.; PLANA-DURÁN, J.; CASAL, J.; DOMINGO, M. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal Veterinary Research*, v. 63, p. 354-357, 2002.



- ROLFS, A.; SHELLER, I.; FINCKH, U. *PCR: clinical diagnostics and research*. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 268p.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLUNADURÁN, J.; BALUSCH, 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, n.1, p. 59-78, 1999.
- ROSSEL, C.; SEGALÉS, J.; ROVIRA, A.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record*, v. 146, n. 2, 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.
- SEGALÉS, J.; ALONSO, F.; ROSELL, C.; PASTOR, J.; CHIANINI, F.; CAMPOS, E.; LÓPEZ-FUERTES, L.; QUINTANA, J.; DOMINGO, M. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting disease (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 81, n. 1-2, p. 37-44, 2001.
- SEGALÉS, J. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. *Journal of Swine Health and Production*, v. 10, n. 6, p. 277-281, 2002.
- SEGALÉS, J.; CLARK, E. G. Immunoestimulation and immunosuppression: two faces of the same coin. In: PMWS and PCV2 disease-beyond the debat. Ames: Merial, 2002, p. 33-42.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Circovirose suína e circovirus suíno. In: SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO, Jr, P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. *Circovirose suína e Circovirus suíno*. Goânia: Pfizer, 2002, p. 5-33.
- SEGALÉS, J.; CASAMIGLIA, M.; DOMINGO, M. How we diagnose postweaning multisystemic wasting syndrome. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASES, 4, 2003, Roma, *Anais...*Roma: American Association of Swine Veterinarian, 2003, p. 149-151.
- SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Production*, v. 8, p. 133-136, 2000.
- SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO JR. P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M.; Circovirose suína e circovirus suíno. *Sanidade em Foco*, v.4, 52p., 2002.
- STEVERINK, P. Type 2 circovirus-critical literature review and assessemant of research that has brought us to the association of ype II circovirus with PMWS. In: PRRS & type 2 Circovirus: advances in diagnostics, research, and pathogenesis. Kansas: American Association of Swine Veterinarians, 2000, p. 5-11.
- TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, v. 295, p. 64-66, 1982.
- TISCHER, I.; BODE, L.; APODOCA, F.; TIMM, H.; PETERS, D.; RASH, R.; POCIULII, S.; GERIKE, E. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Archives of Virology*, v. 140, p. 1427-1439, 1995.
- WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Clelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. v. 10, n.4, p. 506-511, 1991.

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.

ZANELLA, C. J. R.; MORÉS, N.;
SCHIOCHET, M. F.; TROMBETTA, C.
Diagnóstico molecular e caracterização do
circovirus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In:
CONGRESSO BRASILEIRO DE
VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM
SUÍNOS, 2001, 10, Porto Alegre.
*Anais...*Porto Alegre: ABRAVES, 2001, p.
97-98.