

T636.033 69

B238c

2005



Clara Nilce Barbosa

**CIRCOVIRUS SUÍNO - 2 EM SUÍDEOS BRASILEIROS: DETECÇÃO VIRAL  
PELA IMUNOISTOQUÍMICA E ESTUDOS SOROLÓGICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
2005



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

05.08.05

1556805-09

374999

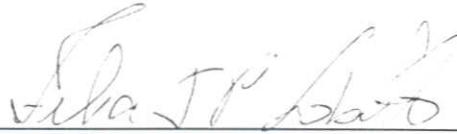
B238c Barbosa, Clara Nilce, 1966-  
Circovirus suíno – 2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela  
imunoistoquímica e estudos sorológicos / Clara Nilce Barbosa – 2005.  
96 p. : il.

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

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Imunoistoquímica – Teses. 3. Víruses  
em animais – Teses. I. lobato, Zélia Inês Portela. II. Universidade Federal  
de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96

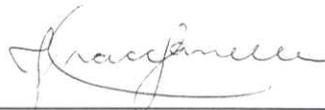
Tese defendida e aprovada em 17 de maio de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Zélia Inês Portela Lobato  
(orientadora)



Prof. Ernane Fagundes do Nascimento



Dra. Janice Reis Ciacci Zanella



Prof. José Lúcio dos Santos



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

*“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. E, enquanto acreditamos nos nossos sonhos, nada é por acaso”.*

**Henfil**

---

*“Independência é conquista e quem não é livre não vive intensamente, apenas passa pela vida”.*

**Margarida M. Barbosa**

Dedicatória:  
Ao meu irmão João Carlos Barbosa

---

### AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Zélia Inês Portela Lobato pelas valiosas sugestões, orientação e ensinamentos.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/MG, especialmente ao Diretor Ricardo Aurélio por permitir a realização de parte do experimento nesta instituição e de apoio às pesquisas.

Ao TECSA Laboratórios pela amostras de soros cedidas e ao Luiz Eduardo Ristow pelas sugestões no trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Profs. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins, Dr. Ernane Fagundes Nascimento, José Lúcio dos Santos e a pesquisadora Dra Janice Reis Ciacci-Zanella pelas contribuições dadas a este trabalho.

Ao Prof. Roberto Maurício Guedes pela grande ajuda e sugestões.

Ao Ronaldo Linhares Sanches e Massami Nakajima pela grande contribuição no trabalho.

Ao Prof. Andrey pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao José Eustáquio Calvacanti pela ajuda nas visitas às granjas de suínos e na coleta de material.

Ao Jorge Caetano Júnior por liberar as amostras de soros de javalis possibilitando o enriquecimento deste trabalho

À Luciana e Renata pela amizade, consideração e apoio.

À Ana Cláudia pela amizade e confiança.

À Doracy e Eduardo pelos conhecimentos transmitidos, atenção e muita paciência

À Nádia pelas contribuições na digitação e formatação do trabalho.

Ao colegiado dos cursos de pós-graduação da Escola de Veterinária pela atenção e colaboração.

Ao amigo João Carlos Timóteo pela amizade e ajuda durante o experimento.

À Prof<sup>ª</sup>. Adanira pela revisão no Inglês e constante incentivo.

Aos colegas: Marconi, Gilsara, Andréia, Kelly, Tânia, Karla, Eliane, Alessandra, Giovani, Maurício, Marcelo, Rodrigo, Remy, Eduardo, Isabel, Margareth pela amizade e ajuda.

Aos funcionários das granjas de suínos que me ajudaram com muita dedicação e força na coleta das amostras de sangue.

A todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

---

**SUMÁRIO**

---

	RESUMO .....	15
	ABSTRACT .....	15
1	INTRODUÇÃO GERAL .....	16
2	OBJETIVOS GERAL .....	18

**SECÃO 1**

	IMUNOISTOQUÍMICA PARA A DEMONSTRAÇÃO DO <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2</i> .....	19
--	--	----

**Capítulo I**

	PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) PARA A DEMONSTRAÇÃO DO <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2</i> (CVS2) .....	20
	1 INTRODUÇÃO .....	21
	2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
	2.1 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO .....	21
	2.2 TECIDOS POSITIVOS E NEGATIVOS .....	21
	2.3 SOROS E ANTI-SOROS .....	22
	2.4 TECIDOS SUSPEITOS .....	22
	2.5 REVESTIMENTO DAS LÂMINAS DE VIDRO .....	22
	2.6 HISTOPATOLOGIA .....	22
	2.7 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA .....	22
	2.7.1 Reidratação .....	22
	2.7.2 Bloqueio da peroxidase .....	23
	2.7.3 Recuperação antigênica .....	23
	2.7.4 Bloqueio das reações inespecíficas .....	23
	2.7.5 Anticorpo primário e secundário .....	23
	2.7.6 Controles .....	23
	2.7.7 Revelação .....	24
	2.7.8 Contracoloração .....	24
	2.7.9 Leitura e Interpretação .....	24
	3 RESULTADOS .....	24
	4 DISCUSSÃO .....	29

**Capítulo II**

	DEMONSTRAÇÃO DO <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2</i> (CVS2) EM TECIDOS DE ANIMAIS SUSPEITOS DA SÍNDROME DA REFUGAGEM MULTISSISTÊMICA (SRM) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) .....	31
	1 INTRODUÇÃO .....	32
	2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
	2.1 AMOSTRAS CLÍNICAS .....	32
	2.1.1 Amostras de tecidos obtidas em granjas de suínos do estado de Minas Gerais .....	32
	2.1.2 Amostras recebidas para diagnóstico histopatológico na escola de Veterinária da UFMG .....	33
	2.2 CONTROLES .....	33

2.2.1 Tecidos positivos .....	33
2.2.2 Tecidos negativos .....	33
2.2.3 Soros positivos.....	33
2.2.4 Soros negativos .....	33
2.3 IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) .....	33
3 RESULTADOS.....	35
4 DISCUSSÃO .....	45
5 CONCLUSÕES DA SEÇÃO 1 .....	47

## SEÇÃO 2

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS: PESQUISA DE ANTICORPOS PARA O <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO</i> TIPO 2 .....	48
---	----

### Capítulo I

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC) NA DEMONSTRAÇÃO DE ANTICORPOS PARA O <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO</i> TIPO 2 (CVS2) EM SOROS DE SUÍNOS .....	49
1 INTRODUÇÃO.....	50
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
2.1 REALIZAÇÃO DO EXPERIMNETO .....	50
2.2 SORO CONTROLE .....	50
2.3 SOROS TESTE .....	51
2.4 IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC).....	51
2.4.1 Vírus.....	51
2.4.2 Cultivo das células PK15 livres de CVS1 .....	51
2.4.3 Infecção das células Pk15 .....	51
2.4.3.1 Inoculação das células Pk15 em suspensão.....	51
2.4.3.2 Inoculação das células Pk15 em monocamada .....	52
2.4.4 Fixação da monocamada de células .....	52
2.4.5 Bloqueio da monocamada de células.....	52
2.4.6 Análise sorológica.....	52
2.4.7 Revelação .....	53
2.4.8 Leitura e Interpretação.....	53
3 RESULTADOS.....	53
4 DISCUSSÃO .....	58

### Capítulo II

ESTUDO DO PERFIL SOROLÓGICO PARA O <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO</i> TIPO 2 (CVS2) EM GRANJAS TECNIFICADAS PARA PRODUÇÃO COMERCIAL DE SUÍNOS.....	60
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	61
2.1 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO .....	61
2.2 GRANJAS E ANIMAIS.....	61
2.3 IDENTIFICAÇÃO E CARATERIZAÇÃO DAS GRANJAS.....	62
2.4 SOROS COLETADOS.....	63
2.5 ANÁLISE SOROLÓGICA.....	63
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
3 RESULTADOS.....	63
4 DISCUSSÃO .....	67

<b>Capítulo III</b>	
DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPOS PARA O <i>CIRCOVIRUS SUÍNO</i> TIPO 2 (CVS2) EM GRANJAS COMERCIAIS DE SUÍNOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS.....	71
1 INTRODUÇÃO.....	72
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
2.1 ÁREA ESTUDADA.....	72
2.2 REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	73
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
2.4 SOROS ESTUDADOS.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
<b>Capítulo IV</b>	
PREVALÊNCIA DO <i>CIRCOVÍRUS SUÍNO</i> TIPO 2 (CVS2) EM JAVALIS ( <i>SUS SCROFA SCROFA</i> ) NO BRASIL EMPREGANDO A TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC).....	78
1 INTRODUÇÃO.....	79
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS.....	79
2.2 ANÁLISE SOROLÓGICA.....	83
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4 CONCLUSÕES DA SEÇÃO 2.....	84
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL.....	85

**LISTA DE TABELAS**

<b>SEÇÃO 1</b>		
<b>Capítulo I</b>		
Tabela 1	Parâmetros usados para a leitura e interpretação dos testes de Imunoistoquímica na demonstração do <i>Circovírus suíno</i> tipo 2 em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina.....	24
<b>Capítulo II</b>		
Tabela 1	Frequência, tipo de lesões histopatológicas e resultados da Imunoistoquímica em tecidos dos 32 animais com suspeita da Síndrome da Refugagem Multissistêmica provenientes de granjas do estado de Minas Gerais.....	37
Tabela 2	Imunoistoquímica para o <i>Circovírus suíno</i> tipo 2 em suínos com a Síndrome da Refugagem Multissistêmica.....	38
Tabela 3	Frequência das amostras clínicas, enviadas e analisadas no laboratório de histopatologia do Departamento de Patologia da UFMG, presença de lesões histopatológicas, resultados no teste de Imunoistoquímica e intensidade das marcações.....	39
<b>SEÇÃO 2</b>		
<b>Capítulo I</b>		
Tabela 1	Diferentes concentrações dos fixadores (álcool etílico e acetona) usadas sobre monocamada de células PK15.....	52
Tabela 2	Resultados dos títulos sorológicos obtidos nos teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células realizados em amostras de soros provenientes de uma granja comercial de ciclo completo com suspeita da Síndrome da Refugagem Multissistêmica em diferentes faixas etárias.....	57

<b>Capítulo II</b>		
Tabela 1	Identificações e informações das oito granjas estudadas e dos animais necropsiados .....	62
Tabela 2	Idade dos animais e total de amostras de sangue coletadas em cada granja ..	63
Tabela 3	Percentagem de animais positivos para o <i>Circovírus suíno</i> tipo 2 usando o teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células em 240 amostras de soros de suínos provenientes de oito granjas comerciais de suínos.....	65
Tabela 4	Média dos títulos de anticorpos obtidos em cada faixa etária nas oito granjas estudadas .....	65
Tabela 5	Representação das médias geométricas dos títulos de anticorpos entre granjas suspeitas e não suspeitas da Síndrome da Refugagem Multissistêmica .....	66
<b>Capítulo III</b>		
Tabela 1	Títulos de anticorpos para o <i>Circovírus suíno</i> tipo 2 obtidos através do teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células 955 amostras de soros de suínos provenientes de 35 granjas do estado de Minas Gerais .....	75
<b>Capítulo IV</b>		
Tabela 1	Total de matrizes amostradas por granjas ou criatórios de suídeos de acordo com o Inquérito soroepidemiológico na Zona Livre de Peste Suína Clássica realizado em 2003 .....	79
Tabela 2	Resultados das análises sorológicas realizadas pelo teste de Imunoperoxidase em Monocamada de células em 1322 soros de javalis ( <i>Sus scrofa scrofa</i> ) provenientes de 119 criatórios no ano de 2003 .....	83
Tabela 3	Prevalência e intervalo de confiança encontrados para os soros de javalis ( <i>Sus scrofa scrofa</i> ) analisados pelo teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células.....	84

#### LISTA DE FIGURAS

<b>SEÇÃO I</b>		
<b>Capítulo I</b>		
Figura 1	Fotomicrografia das placas de Peyer de um suíno com Síndrome da Refugagem Multissistêmica. Notar a redução de células linfóides e presença de marcações nos macrófagos .....	27
Figura 2	Reação de Imunoistoquímica em um linfonodo infectado pelo <i>Circovírus suíno</i> tipo 2. Anticorpo primário utilizado soro de suíno livre de anticorpos para o <i>Circovírus suíno</i> tipo 2. ....	27
<b>Capítulo II</b>		
Figura 1	Ocorrências de lesões macroscópicas em 32 animais necropsiados provenientes de granjas localizadas no Estado de Minas Gerais.....	35
Figura 2	Resultados positivos nos testes de Imunoistoquímica nas diferentes amostras de tecidos analisadas.....	41
Figura 3	Fotomicrografia do linfonodo naturalmente infectado pelo <i>Circovírus suíno</i> tipo 2. Antígeno viral detectado pela técnica de Imunoistoquímica. Notar a marcação específica no citoplasma dos macrófagos .....	43
Figura 4	Controle negativo da reação no teste de Imunoistoquímica em linfonodo. O anticorpo primário representado pelo soro de suíno de animal SPF, cromógeno DAB, contracoloração por Hematoxilina de Mayer .....	43

<b>SEÇÃO 2</b>	
<b>Capítulo I</b>	
Figura 1	Teste Imunoperoxidase em Monocamada de Célula Pk15 para a detecção de anticorpos para o <i>Circovirus suíno</i> tipo 2. Em destaque células infectadas com marcação nuclear..... 55
Figura 2	Fotomicrografia da célula Pk15 infectada pelo <i>Circovirus suíno</i> tipo 2. .... 55
Figura 3	Controle negativo do teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células PK15..... 55
<b>Capítulo II</b>	
Figura 1	Perfil sorológico observado nas oito granjas estudadas mostrando a média geométrica dos títulos de anticorpos encontrados em cada faixa etária ..... 64
Figura 2	Representação das médias geométricas dos títulos de anticorpos entre granjas suspeitas e não suspeitas da Síndrome da Refugagem Multissistêmica..... 66
<b>Capítulo III</b>	
Figura 1	Estado de Minas Gerais destacando os municípios amostrados ..... 73
<b>Capítulo IV</b>	
Figura 1	Mapa do Brasil mostrando a origem e os números de amostras de soros de javalis ( <i>Sus scrofa scrofa</i> ) analisados pelo teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células..... 81
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO 01	Ficha de cadastro das granjas de suíno ..... 91
ANEXO 02	Títulos de anticorpos encontrados em diferentes faixas etárias do ciclo de produção nas oito granjas de suínos estudadas ..... 95
ANEXO 03	Inquérito Soroepidemiológico na Zona Livre de PSC – 2003. Formulário de investigação epidemiológica para rebanhos suídeos com sorologia positiva para PSC ..... 96

## RESUMO

Padronizou-se a técnica de Imunoistoquímica (IHQ) empregando um anticorpo comercial policlonal anti-PCV2 de origem suína para identificar o *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2). A técnica foi aplicada em tecidos de suínos provenientes de granjas com e sem suspeita da Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM). O antígeno viral foi demonstrado em 74 (36,45%) das 203 amostras analisadas, sendo linfonodo e pulmão os tecidos onde o vírus foi identificado com maior frequência. Foi também padronizada a técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC) objetivando a demonstração de anticorpos para o CVS2 suíno. Os soros foram diluídos e incubados sobre a monocamada de células PK15 previamente infectadas com o vírus e fixadas. A técnica permitiu a diferenciação e titulação dos soros em animais reagentes e não reagentes e o estabelecimento do perfil sorológico em oito granjas destinadas à produção comercial de suínos com e sem suspeita da SRM. Na análise dos resultados foi constatado que a infecção pelo o CVS2 ocorreu em todas as granjas. Com a finalidade de efetuar um estudo epidemiológico preliminar foram analisados também 955 soros provenientes de 35 granjas comerciais de suínos e 1322 soros de javalis de 119 criatórios localizados em seis estados brasileiros. Os resultados mostraram que 96,49% e 87% reagiram à presença do CVS2 em soros de suínos e javalis, respectivamente, estando o vírus disseminado em rebanhos brasileiros afetados ou não pela síndrome.

**Palavras-chave:** Suídeos, *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2), Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM), Imunoistoquímica (IHQ), Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC)

## ABSTRACT

An immunohistochemistry technique using a commercial swine polyclonal antibody anti-PCV2 was optimized. The technique was used in formalin-fixed swine tissue samples coming from farms with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) clinical signs. Virus antigen was detected in 74 (36,46%) of 203 studied samples. Virus antigen was more often detected in lymph nodes and lungs. An immunoperoxidase monolayer assay (IP) for detection of serum antibodies against PCV2 was also standardized. Fixed PCV2 infected Pk-15 cell monolayers in 96 well-plates were used for detection and titration of anti-PCV2 antibodies and establish the seroprofile of eight commercial hog farms with or without PMWS clinical signs in Minas Gerais. All farms tested had seropositive animals. Serum samples (955) from other 35 commercial hog farms and 1322 wild boar sera from 119 farms from six different brazilian states were tested. The results demonstrated that 96,49% and 87,00% of commercial hogs and wild boars were seropositive, respectively, showing that the PCV2 is widely spread in brazilian commercial pig and wild-boar herds with or without PMWS clinical signs.

**Keywords:** Swine, Type 2 porcine circovirus (PCV2), Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), Immunohistochemistry, Immunoperoxidase in monolayer assay (IP)

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, houve uma evolução no sistema de produção de suínos, principalmente quanto à genética, à nutrição, ao manejo e à sanidade. Os animais passaram a ser criados de forma cada vez mais intensiva, os rebanhos ficaram maiores e, conseqüentemente, predispondo ao aparecimento de várias doenças, dentre elas, a Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) associada ao *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2).

O *Circovírus suíno* (CVS) é um pequeno vírus, com 17nm de diâmetro, não envelopado e apresenta uma estrutura icosaédrica. O genoma é composto por um DNA circular covalentemente fechado, fita simples, senso positivo, com um peso molecular de  $0,56 \times 10^6$  Daltons e possui 1.760 nucleotídeos, um dos menores DNA vírus (Allan et al., 1994; Meehan et al., 1998).

O CVS é classificado pelo Comitê Internacional sobre Taxonomia Viral (ICTV) dentro da família *Circoviridae* que atualmente é composta por dois gêneros. O primeiro é o gênero *Circovírus* que inclui o *Circovírus suíno* tipo 1 (CVS1); *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2), o *Circovírus* do pombo (CoCV), *Circovírus* de gaivota, *Circovírus* de canário, *Circovírus* de ganso e o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (PBFDV). O outro é o vírus da anemia das galinhas e está incluído no gênero *Gyrovirus*. Uma característica comum dos vírus que pertencem à família *Circoviridae* é a associação com doenças que causam lesões em tecidos linfóides e imunossupressão (Lukert et al., 1995; Todd, 2000; Mankertz et al., 2000; Noteborn et al., 2001).

A SRM é reconhecida como uma doença emergente e tem sido descrita em vários países onde a suinocultura tem grande expressão econômica. Estudos realizados em rebanhos afetados pela síndrome mostraram que a morbidade e a mortalidade variam dependendo do estágio do surto e o

manejo dentro da unidade afetada. A taxa de morbidade é relativamente baixa entre 4 a 25%, enquanto a mortalidade pode alcançar índices de até 100% (Segalés et al., 2004).

Os prejuízos decorrentes da síndrome nos plantéis afetados são substanciais para a indústria suinícola. Entre eles os gastos com antibióticos, as mortes ocorridas, o declínio das taxas de crescimento e a queda na conversão alimentar que elevam os números de animais refugos e/ou debilitados. A SRM tem sido descrita em quase todos os tipos de granjas incluindo as granjas de ciclo completo, operações em múltiplos sítios, de tamanho entre 30 a 10.000 matrizes e também em criatórios não tecnificados (Segalés et al., 2004).

Dados sorológicos indicam que a infecção pelo CVS2 está amplamente distribuída entre a população suína mundial. Além disso, informações de diferentes países europeus mostram que quase 100% do rebanho é soroprevalente, indicando que a infecção pelo CVS2 ocorre em rebanhos afetados e não afetados pela SRM (Larochelle et al., 2003).

Além da SRM, o CVS2 tem sido associado a várias enfermidades em suínos, tais como: Síndrome da Nefropatia e Dermatite Suína, Falha Reprodutiva, Complexo da Doença Respiratória Suína, Pneumonia Necrozante e Tremor Congênito tipo A II (Harding; Clark, 1997; Segalés, 2002; Kim et al., 2003).

Soma-se à patologia da SRM a participação de coinfeções que agravam a doença e modificam ou acentuam os sinais clínicos, dificultando o diagnóstico diferencial. Um grande número de suínos com a síndrome apresenta infecções concorrentes causadas por bactérias tais como: *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e outras. Em particular, a diarreia causada pela *Lawsonia intracellularis* e a *Brachyspira pilosicoli* que também induzem ao emagrecimento progressivo. Além disso, a presença de agentes secundários habitualmente associado com a

imunossupressão como o *Pneumocystis carinii*, *Staphylococcus hyicus*, *Aspergillus* spp e *Chlamydia* spp tem sido identificados com freqüência nos animais afetados com SRM (Clark, 1997; Watrang et al., 2002; Segalés et al., 2004).

A infecção natural do CVS é adquirida principalmente pela via oro-nasal. Porém, a associação do CVS1 e CVS2 com presença de abortos e natimortos indicam que a transmissão transplacentária pode ser um fator importante. O agente tem sido identificado por reação em cadeia da polimerase (Polimerase chain reation-PCR) em fezes, urina e cavidade nasal de animais naturalmente infectados pela síndrome e tem sido demonstrado na cavidade nasal de animais clinicamente sadios (Hines; Lukert, 1994; Calsamiglia et al., 2002).

A SRM acomete suídeos, principalmente de seis a 12 semanas de vida e os sinais clínicos mais freqüentes incluem emagrecimento progressivo, distúrbios respiratórios e diarréia. As lesões macroscópicas são variáveis, sendo mais freqüente a linfadenomegalia regional ou generalizada e consolidação pulmonar crânio-caudal. As lesões histopatológicas, especialmente em tecidos linfóides, são representadas por diminuição dos números de linfócitos, seguida de proliferação de histiócitos, formação de células gigantes multinucleadas e, ocasionalmente, presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos.

O diagnóstico da SRM é complexo pelo fato de haver uma multiplicidade de órgãos envolvidos, sinais clínicos inespecíficos, sistema imune comprometido e a presença de doenças concorrentes, tanto de origem viral como bacteriana. Sendo assim, o diagnóstico confirmativo da SRM deve ser baseado nos seguintes critérios:

- Presença de sinais clínicos compatíveis com a doença e achados de necropsia;
- Presença de lesões histopatológicas características, moderadas a severas;

- Demonstração do antígeno viral ou ácido nucléico dentro das lesões.

Estes critérios analisados separadamente não confirmam a presença da doença, pois a infecção pelo CVS2 não implica na presença da doença no rebanho (Clark; Harding, 1997; Roseil et al., 1999; Sorden, 2000; Larocelle et al., 2003).

Muitos métodos de diagnóstico têm sido descritos na literatura para a identificação do agente viral. Entre eles, o isolamento viral, Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), Imunoistoquímica (IHQ) e Hibridização *in situ* (HIS). Os estudos sorológicos têm sido realizados empregando os testes de Imunofluorescência Indireta (IFI), Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC) ou ELISA competitivo. Os resultados mostram que os anticorpos contra os CVS são muito comuns nas populações de suínos dos continentes Europeus, Americanos e Asiáticos (Allan; Ellis, 2000; Calsamiglia et al., 2002; Rodríguez-Arrijoja et al., 2003).

O CVS2 foi identificado e a doença descrita no Brasil no ano de 2000 pela pesquisadora Janice Reis Ciacci-Zanella e colaboradores da Embrapa Suínos e Aves, em leitões de recria, provenientes de granja com histórico de emagrecimento progressivo. As análises macroscópicas e microscópicas revelaram características compatíveis com síndrome. Foi realizado o isolamento do vírus em material suspeito e identificação viral pela técnica de (IPMC). Além disso, a caracterização molecular de amostras isoladas no Brasil foram realizadas, confirmando a presença do CVS2 em suínos de plantéis nacionais através da demonstração do DNA viral usando a PCR.

A doença foi chamada inicialmente de Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD). Atualmente, a doença tem sido chamada de Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) e está sendo considerada uma doença emergente. Ainda não se sabe a prevalência da doença, mas o CVS2 pode estar disseminado nas criações nacionais

de suínos (Ciacci-Zanella et al., 2000; Ciacci-Zanella et al., 2003).

Em Goiás foram realizados diagnósticos confirmatórios da SRM e identificação do agente viral. Em Minas Gerais, tem-se verificado sinais clínicos, achados de necropsia compatíveis com a SRM e presença de lesões histopatológicas características da doença. Foram realizados isolamentos e identificação do agente viral por IPMC, PCR e IHQ em um grande número de amostras clínicas provenientes de regiões produtoras de suínos de grande importância econômica para o Estado. Em São Paulo foram realizados trabalhos sobre a associação entre o CVS2 e as doenças respiratórias no Brasil, além da caracterização e diferenciação entre amostras dos CVS1 e CVS2. Finalmente foram descritas as lesões histopatológicas associadas a Circovirose em suínos nas fases de recria e terminação em rebanhos no Rio Grande do Sul (Sobstiansky et al., 2002; Moreno et al., 2003; Pescador et al., 2003; Pinto et al., 2003; Almeida et al., 2004; Barbosa et al., 2004).

Muitos especialistas em suínos consideram a SRM um dos principais problemas de ordem sanitária na suinocultura mundial. A diversidade de fatores de riscos associados à infecção e aliados ao envolvimento de diferentes agentes etiológicos criam dificuldades no controle e manutenção de um baixo nível de infecção nos rebanhos. O

reconhecimento precoce do problema é fundamental para que medidas de controle possam ser aplicadas. Até no momento, não se conhece a existência de um tratamento único capaz de controlar a SRM dentro de rebanho e as medidas recomendadas estão direcionadas ao manejo, à nutrição, programa de higiene e bem estar dos animais.

## 2 OBJETIVOS GERAL

O presente trabalho tem por objetivos:

- Padronizar a técnica de Imunoistoquímica (IHQ) para a demonstração de antígenos de CVS2 em tecidos *in vitro* e *in vivo*.
- Investigar a presença de CVS2 por Imunoistoquímica (IHQ) em materiais de campo.
- Padronizar e aplicar a técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC) na demonstração de anticorpos para o CVS2 em diferentes granjas comerciais e criatórios de suídeos.
- Promover estudo epidemiológico da SRM por análise de anticorpos CVS2 com a técnica de técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC).

**SEÇÃO 1**

**IMUNOISTOQUÍMICA PARA A DEMONSTRAÇÃO DO  
*CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO 2***

## Capítulo I

### PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) PARA DEMONSTRAÇÃO DO *CIRCOVIRUS SUÍNO* TIPO 2 (CVS2)

#### RESUMO

Foi padronizada uma técnica de Imunoistoquímica (IHQ) para a demonstração do *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2). Utilizou-se um anticorpo policlonal comercial anti-CVS2 de origem suína, que foi aplicado sobre os cortes histológicos, fixados com formalina e embebidos em parafina, sabidamente positivos ou negativos para o CVS2. Os tecidos positivos continham lesões características da Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) e o genoma do CVS2 foi demonstrado previamente pela técnica de Hibridização *in situ* (IHS). Os tecidos coletados de animais com suspeita clínica da síndrome foram estudados utilizando a técnica padronizada. Verificou-se pelo método padronizado uma correlação entre a presença do agente viral e as lesões histopatológicas compatíveis com a doença.

**Palavras-chave:** *Circovirus suíno* tipo 2, Suíno (*Sus scrofa scrofa*), Diagnóstico, Imunoistoquímica

#### ABSTRACT

An immunohistochemical technique was developed and standardized for the demonstration of type 2 porcine circovirus (PCV2). A commercial polyclonal antibody anti-PCV-2 derived from pigs was used, which was applied on histological sections, formalin-fixed and paraffin-wax embedded, seropositive or seronegative for PCV2. The tissues had characteristic lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) and the PCV-2 genome was demonstrated by the *in situ* hybridization technique. A correlation between the presence of the viral agent and the histopathological lesions consistent with the disease was observed using the standardized method.

**Keywords:** Type 2 porcine circovirus (PCV2), Swine (*Sus scrofa scrofa*), Diagnostic, Immunohistochemical

## 1. INTRODUÇÃO

O *Circovírus suíno* (CVS2) é atualmente reconhecido como um patógeno associado à Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM). A doença acomete suínos principalmente com seis a 12 semanas de vida e causa grande impacto econômico nos plantéis afetados (Segalés; Domingo, 2002; Harding et al., 2004).

Os animais doentes exibem emagrecimento progressivo, distúrbios respiratórios e diarreia. Os achados macroscópicos mais característicos são linfadenomegalia e áreas de consolidação pulmonar crânio-ventral. As lesões histopatológicas nos órgãos linfóides são caracterizadas por redução dos números de linfócitos seguida por proliferação de histiócitos, presença de células gigantes multinucleadas e, ocasionalmente, identificação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Allan; Ellis, 2000; Segalés, 2002).

Na literatura têm sido descritos muitos métodos de diagnósticos que podem ser empregados para a demonstração do CVS2 em suínos. Para estudos sorológicos, o uso das técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI), Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC) e Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) fornecem informações sobre o perfil sorológico e epidemiologia do rebanho.

O isolamento viral e outras técnicas são aplicados para a identificar a presença do agente ou do seu ácido nucléico tais como Reação em Cadeia por Polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR), Imunofluorescência Direta (IF) e Microscopia Eletrônica (ME). Finalmente, utilizam-se as técnicas de Hibridização *in situ* (HIS) e a Imunoistoquímica (IHQ), para demonstrar respectivamente, o ácido nucléico e proteína viral em tecidos (Tischer et al., 1982; Ellis et al., 1998; McNeilly et al., 1999; Segalés et al., 2004).

Atualmente, a técnica de IHQ vem sendo amplamente usada em diagnóstico de

rotina. Ela permite a combinação de técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, possibilitando a demonstração de antígenos tissulares *in situ* por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras. A IHQ possui boa sensibilidade, especificidade e rapidez, podendo obter a leitura entre 24 a 48 horas (Gimeno, 1995).

O objetivo do trabalho foi de padronizar e aplicar a técnica de IHQ para a demonstração do CVS2 em diferentes tecidos de suínos fixados em formalina e embebidos em parafina, usando um anticorpo policlonal comercial anti-CVS2 de origem suína e um antiespécie conjugado com a enzima peroxidase.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nas dependências da Seção de Biologia do Laboratório Nacional de Agropecuária/Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MG-MAPA) e no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG.

### 2.2. TECIDOS POSITIVOS E NEGATIVOS

Foram utilizados para a padronização do teste de IHQ um total de 23 blocos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, dos quais 12 foram provenientes de suínos com a SRM e o genoma viral do CVS2 foi previamente confirmado através do teste de HIS pelo Professor Joaquim Segalés da Universidade Autônoma de Barcelona/Espanha. Os demais blocos de tecidos vieram de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogens Free-SPF) enviados da Embrapa Suínos e Aves.

## 2.3. SOROS E ANTI-SOROS

2.3.1. Controle positivo: soro policlonal de origem suína contra CVS2 (VMRD, Inc. catálogos n.º: 211-P-PCRIV e n.º: 210-70-PCRIV).

2.3.2. Controle negativo: soro controle negativo de origem suína livre de anticorpos contra o CVS2 (VMRD, Inc.<sup>1</sup> catálogo n.º 211-N-PCRIV) e soro de animais provenientes da Embrapa Suínos e Aves, de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogens Free-SPF).

## 2.4. TECIDOS SUSPEITOS

Foram testados, após a padronização da técnica, 16 blocos de tecidos fixados e embebidos em parafina, oriundos de animais de granjas de suínos com histórico de refugagem. Dos 16 blocos, 10 foram também testados para verificar a presença do ácido nucléico viral através do teste de HIS pelo Prof. Joaquim Segalés. Todos os blocos de parafina continham de três a quatro diferentes tecidos correspondentes ao mesmo animal.

## 2.5. REVESTIMENTO DAS LÂMINAS DE VIDRO

Para o revestimento das lâminas de vidro foi usada a solução de silane (gama aminopropiltrióxsilane SIGMA, n.º A-3648) a 2% diluída em acetona. A solução foi anteriormente preparada e estocada a temperatura de 4°C em recipiente de vidro, cor âmbar, devidamente fechado. Inicialmente as lâminas de vidro foram imersas em solução de álcool-éter na proporção 1:1 e mantidas nesta solução por 12 horas, também a temperatura de 4°C. Após esse período, as lâminas foram colocadas num suporte metálico e lavadas com água destilada em 2 ciclos por 5 minutos.

O suporte metálico com as lâminas foi transferido para uma cuba contendo a

solução de silane a 2% permanecendo por um minuto, sendo imediatamente transferido para outra cuba com água destilada e mantido também por um minuto. Esses procedimentos foram realizados em capela de exaustão. Posteriormente, o suporte metálico com as lâminas foi incubado em estufa à temperatura de 60°C por 120 minutos.

## 2.6. HISTOPATOLOGIA

Os fragmentos de tecidos fixados em formalina a 10% tamponada com pH 7,2 foram processados em equipamento histotécnico automático, seguindo-se as etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Após esse procedimento, os blocos de parafina foram cortados em micrômetro com 5 µm de espessura e montados em lâminas de vidros, previamente desengorduradas com solução álcool-éter. Foram montadas duas lâminas, uma para análises histopatológicas e outra para o teste de IHQ em lâmina previamente revestida pelo silane. Em cada lâmina foram colocados dois a três cortes do mesmo tecido que posteriormente foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) preconizada por Luna (1968) e examinada ao microscópio óptico.

## 2.7. TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica de IHQ foi padronizada segundo as metodologias descritas por Ellis et al. (1998), Sorden et al. (1999) e Chianini et al. (2001) com algumas adaptações e constituiu de várias etapas, que estão descritas detalhadamente.

### 2.7.1. Reidratação

As lâminas de vidro contendo os cortes histológicos previamente preparadas pelas técnicas histológicas foram desparafinizadas utilizando-se quatro banhos de xileno com uma duração de 3 minutos em cada etapa. A remoção do xileno foi executada pela imersão das lâminas em recipientes de vidro, individualizados e devidamente identificados, através do processo de reidratação em álcool etílico a 96° GL (Gay

<sup>1</sup> VMRD, Inc Veterinary Medical Research & Development

Lussac) e em soluções alcoólicas decrescentes de 90%, 80% e 70% durante um período de 3 minutos em cada etapa. Imediatamente, as lâminas foram depositadas em um recipiente com água destilada também por um período de 3 minutos.

### **2.7.2. Bloqueio da peroxidase**

O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado usando uma solução de peróxido de hidrogênio (MERK, cat. n.º 2836) diluída em metanol, obtendo-se uma concentração final de 3%. A solução foi depositada em um recipiente de vidro, protegida da ação da luz e as lâminas foram imersas na solução e mantida em contato com os cortes histológicos por um período de 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente os cortes histológicos foram lavados em água corrente por 10 minutos, seguido de um banho com solução de salina tamponada (Phosfato Buffer Solution-PBS) por um período de 5 minutos.

### **2.7.3. Recuperação antigênica**

A recuperação antigênica foi realizada aplicando a proteinase K (GIBCO BRL, cat. n.º 25530-015) diluída em tampão fosfato a 0,1 M numa concentração de 0,05% sobre os cortes histológicos. As lâminas foram mantidas dentro da câmara úmida em estufa à temperatura de 37°C, por períodos de 3 a 10 minutos. Posteriormente, realizou-se uma lavagem em água corrente e um banho em solução de PBS por 10 minutos e 5 minutos respectivamente.

### **2.7.4. Bloqueio das reações inespecíficas**

O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com o uso de uma solução de soro albumina bovina (SIGMA, n.º A-1327) na concentração final de 4% diluída em PBS, pH 7,2. A solução foi adicionada sobre os cortes histológicos e mantidos em câmara úmida por um período de 30 minutos em estufa à temperatura de 37°C, seguido-se dos mesmos procedimentos de lavagem já descrito anteriormente.

### **2.7.5. Anticorpos primário e secundário**

Para padronização da melhor diluição a ser utilizada, o anticorpo primário (VMRD, cat. n.º: 210-70-PCR.V) foi diluído em PBS, pH 7,2 nas seguintes diluições: 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:1.500, 1:2.000, 1:2.500, 1:3.000, 1:3.500, 1:5.000 e 1:10.000. Cada diluição foi testada separadamente e aplicada sobre três cortes histológicos num volume suficiente para cobri-los completamente. As lâminas foram depositadas em câmara úmida e mantidas por diferentes períodos de incubação em estufa à temperatura de 37°C. Inicialmente trabalhou-se com tempo de 15 minutos, depois 30, 45 e 60 minutos. Após a etapa de incubação, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e em seguida com PBS por 5 minutos. Essa etapa foi finalizada por uma drenagem cuidadosa das bordas dos cortes histológicos com o uso de papel absorvente.

O anticorpo secundário (anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase – SIGMA, n.º A-9417) foi adicionado individualmente num volume suficiente para cobrir os cortes histológicos. As diluições usadas foram as seguintes: 1:500, 1:1.000, 1:1.500, 1:2.500 e 1:5.000. Cada diluição foi testada em triplicata e as lâminas contendo os cortes histológicos foram colocadas em câmara úmida e mantidas por diferentes períodos de tempo. Trabalhou-se com 15, 30, 45 e 60 minutos e foram realizados os mesmos procedimentos de lavagem e secagem como descrito nas etapas anteriores.

### **2.7.6. Controles**

Foram usados três controles positivos e três controles negativos em cada bateria de testes. Esses foram trabalhados da seguinte forma: aplicou-se 50 µL de PBS no lugar do anticorpo primário em dois controles positivo e negativo. Nos dois outros controles positivo e negativo adicionou-se 50 µL de anticorpo policlonal anti-CVS2. Finalmente, aplicou-se 50 µL de soro negativo em dois tecidos um positivo e outro negativo.

### 2.7.7. Revelação

A revelação foi feita utilizando-se o substrato diaminobenzidina (DAKO LSAB Kit Substrate peroxidase-DAB) peróxido de hidrogênio. As lâminas, sobre ação do substrato, foram mantidas à temperatura ambiente, dentro de uma câmara úmida e protegidas da ação da luz. Foram avaliados individualmente diferentes períodos de incubação de 5, 7, 8, 10 e 15 minutos. A reação foi paralisada com a lavagem dos cortes histológicos em água corrente.

### 2.7.8. Contracoloração

A hematoxilina de Mayer foi usada para contracorar os cortes histológicos por 45 segundos e lavados imediatamente em água corrente por 5 minutos. Os cortes histológicos foram desidratados em

soluções crescentes de álcoois, permanecendo 1 minuto em cada cuba. As lâminas foram montadas em laminulas usando o bálsamo do Canadá.

### 2.7.9. Leitura e Interpretação

A leitura dos testes de HE e IHQ foi realizada usando o microscópio óptico nos aumentos de 10X e 40X. No teste de HE as lesões histopatológicas visualizadas foram comparadas com aquelas previamente documentadas para a SRM (Rosell et al.1999), enquanto que no teste de IHQ foram avaliados os detalhes da morfologia celular, a presença e a distribuição antígeno viral. Para se obter um padrão de interpretação dos resultados foram adotados os parâmetros descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros usados para a leitura e interpretação dos testes de Imunoistoquímica na demonstração do *Circovirus suíno* tipo 2 em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina

Classificação	Intensidade	Reação	Interpretação
Reação negativa	-	Ausência de marcação	Ausência do antígeno
Reação positiva fraca	+	visualização de marcação em menos de 25% do campo em análise	quantidade mínima do antígeno
Reação positiva moderada	(++)	visualização de marcação entre 25 % a 50% do campo em análise	quantidade moderada do antígeno
Reação positiva forte	(+++)	visualização de marcação acima de 50% do campo em análise	quantidade abundante do antígeno

## 3. RESULTADOS

As investigações nos cortes histológicos provenientes de animais SPF mostraram uma estrutura histológica normal quando corados pela técnica do HE, enquanto os tecidos sabidamente positivos revelaram lesões histopatológicas características da SRM. Nos órgãos linfóides, representados

pelos linfonodos e placas de Peyer foram observados acentuada redução de linfócitos com desaparecimento dos folículos linfóides e proliferação de histiócitos. Além disso, nos linfonodos foi evidenciada a presença de células gigantes multinucleadas e os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos foram ocasionalmente identificados. No pulmão foi identificada broncopneumonia intersticial de intensidade variada. No fígado

observou-se a presença de infiltrado inflamatório linfohistiocitário. No rim constatou-se a presença de nefrite intersticial linfohistiocitária de distribuição multifocal.

Para a recuperação antigênica foi gasto um tempo de 5 minutos nos cortes histológicos com 5µm de espessura. Várias diluições dos anticorpos primários e secundários foram avaliadas, constatando ótima marcação quando os cortes histológicos foram incubados nas diluições de 1:3.000 e 1:2.500 do anticorpo primário e secundário, respectivamente por um período de 45 minutos em câmara úmida à temperatura de 37°C. O melhor tempo de ação do substrato foi de 5 minutos. Utilizando esses procedimentos a coloração de fundo foi minimizada e a visualização da reação melhorada significativamente.

As células positivas para a presença do CVS2, exibiam marcação de cor marrom, caracterizando a presença do antígeno, concentrando-se principalmente nos citoplasmas e ocasionalmente nos núcleos das células infectadas. As células positivas encontravam-se agrupadas nos infiltrados inflamatórios ou disseminadas pelo tecido. Um forte sinal (+++) de marcação foi demonstrado no citoplasma dos macrófagos especialmente nos histiócitos, em células gigantes multinucleadas e ao redor dos corpúsculos de inclusão. Além disso, os histiócitos disseminados pelo tecido em análise exibiam, em menor intensidade, dispersos sinais de marcação.

A distribuição de células positivas nos linfonodos foi multifocal e quando o sinal de marcação foi demonstrado, estava associado a um processo inflamatório. Particularmente, nos linfonodos, foram observadas marcações consistentes,

assumindo intensidades que variavam de moderada (++) a forte (+++).

A marcação nas placas de Peyer (Fig.1) foi moderada (++) e o sinal demonstrado apresentava-se geralmente em células com um núcleo grande, citoplasma abundante e a distribuição no tecido foi totalmente retalhada. Comparação com os mesmos cortes histológicos corados por HE indicou que muitas destas células eram histiócitos.

O antígeno viral foi também demonstrado em histiócitos localizados no fígado, pulmão e rim. As células infectadas pelo CVS2 no fígado foram predominantemente os hepatócitos e encontravam-se distribuídas de forma difusa e a intensidade de marcação foi classificada como fraca (+). Nos pulmões foram ocasionalmente visualizadas marcações em células que se assemelhavam a histiócitos intersticiais e a intensidade dos resultados foi também moderada (++) . No rim o sinal de marcação foi moderado (++) sendo observado nas células epiteliais tubulares e histiócitos intersticiais.

Nos controles negativos, da técnica de IHQ, não foram verificados sinais de marcação, prevalendo apenas uma cor violácea resultante da ação da hematoxilina de Mayer conforme mostra a figura 2.

A técnica padronizada foi utilizada para testar amostras de campo e observou-se uma correlação entre os 10 blocos de tecidos que foram submetidos às técnicas de IHQ e HIS e deram resultados negativos. Além disso, as amostras de tecidos provenientes de granjas com histórico clínico, lesões macroscópicas e histopatológicas características da síndrome, identificaram com nitidez a presença do antígeno viral.

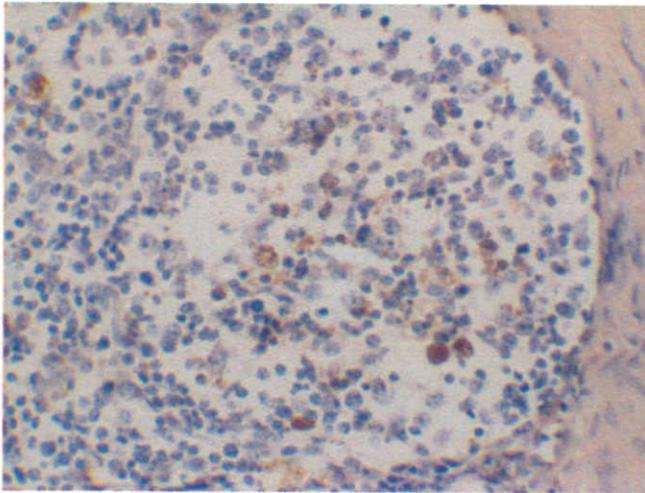


Figura 1 Fotomicrografia das placas de Peyer de um suíno com Síndrome da Refugagem Multissistêmica. Notar a redução de células linfóides e presença de marcações nos macrófagos. Aumento 400X.

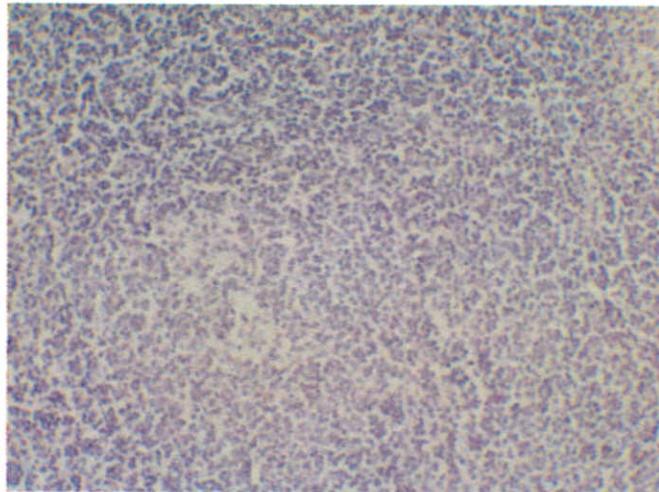


Figura 2 Reação de Imunoistoquímica em um linfonodo infectado pelo *Circovirus suino* tipo 2. Anticorpo primário utilizado soro de suíno livre de anticorpos para o *Circovirus suino* tipo 2. Aumento 200X

#### 4. DISCUSSÃO

O diagnóstico da SRM é baseado na avaliação do histórico sanitário do rebanho, lesões macroscópicas, histopatológicas características da doença e a demonstração do CVS2 em tecidos lesados. Segundo Ellis et al. (1998); McNeilly et al. (1999); Allan; Ellis, (2000), as técnicas de HIS e IHQ têm sido amplamente empregadas, pois permitem confrontar as alterações histopatológicas e a presença do ácido nucléico e /ou agente viral, respectivamente, nos tecidos em análises.

A IHQ está sendo considerada uma ótima alternativa para os processos laboratoriais que consomem muito tempo, ao adotar metodologias muito complexas e custos elevados, como o isolamento viral ou culturas microbiológicas usadas em diagnósticos de doenças infecciosas de suínos. Além disso, sua especificidade pode ser aumentada, empregando-se anticorpos monoclonais que reduzem consideravelmente as reações inespecíficas.

Outra vantagem da reação de imunoperoxidase é a possibilidade da mesma ser visualizada pelo uso de microscópio óptico convencional. No entanto, para sua execução é necessário dispor de uma capela de exaustão para realizar a etapa de reidratação, uma área física adequada para maior rapidez, dinamismo e segurança do operador, além de um laboratório de histopatologia para apoio técnico.

A técnica pode ser adaptada para os diagnósticos de várias doenças, desde que conte com os anti-soros específicos. Pequenas quantidades dos antígenos podem ser identificadas nos tecidos lesados e a reação enzimática com a peroxidase pode ser também processada, partindo-se de tecidos fixados e embebidos em parafina.

Durante todo o procedimento de execução da técnica, a morfologia celular,

preservação e aderência dos cortes histológicos em lâminas de vidros foram mantidas com sucesso, apesar de algumas etapas serem muito agressivas para o corte de tecido. A boa aderência e a preservação dos cortes histológicos nas lâminas de vidro dependem essencialmente do prévio revestimento pelo silane.

Para a recuperação antigênica, muitas enzimas com atividade proteolítica podem ser usadas, tais como a tripsina, pepsina, protease XIV, proteinase K, dentre outras. Nesse estudo, foi empregada a proteinase K e a escolha do produto foi em virtude da facilidade de aquisição. Os pesquisadores Allan et al. (1989) e Haines et al. (1992) reportaram que a função dessa enzima sobre o tecido é levar à ruptura das ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas e, conseqüentemente, promover a recuperação das partes imunorreativas dos antígenos previamente fixados. Cuidados devem ser tomados durante o procedimento, devido à possibilidade do próprio antígeno, em pesquisa, ser atingido pela reação de proteólise enzimática. Daí a importância da padronização exata do tempo de ação da enzima sobre o tecido em análise. O tempo utilizado nesse trabalho foi de 5 minutos para um corte histológico com 5  $\mu$ m. Esse período foi suficiente para manter a integridade do tecido e uma boa visualização da reação.

Com relação à padronização dos anticorpos primários e secundários observou-se que nas baixas diluições a marcação de fundo foi intensa, impedindo a leitura do teste. Nas altas diluições não houve diferenciação entre controle positivo e negativo prevalecendo apenas a cor violácea, característica do controle negativo. A marcação ocorreu e não houve coloração de fundo quando os cortes histológicos foram incubados nas diluições de 1:3.000 e 1:2.500 do anticorpo primário e anticorpo secundário, respectivamente. Deve-se ressaltar que todas as etapas da técnica foram críticas, não bastando padronizar apenas um reagente ou definir um único tempo. Foi necessária a padronização individual de todas as etapas, confrontando-

se com o todo para chegar a um resultado confiável.

A verificação de histiócitos marcados, principalmente no citoplasma, caracterizou a reação positiva em tecidos linfóides e não-linfóides. Pelos resultados obtidos os linfonodos foram os que apresentaram melhor intensidade de marcação classificada como forte (+++). Além disso, as análises permitiram confrontar nitidamente as alterações histopatológicas características da doença, como a ausência de folículos linfóides, redução acentuada de linfócitos e proliferação de histiócitos com a presença do agente viral demonstrado pela técnica de IHQ. West et al. (1999); Krakowka et al. (2000) descreveram que mesmo em infecções subclínicas da SRM, nos centros germinativos dos linfonodos são demonstradas quantidades mínimas de antígeno viral pelo teste de IHQ.

Nos cortes oriundos de material suspeito da SRM foi verificada nitidamente a presença de lesões histopatológicas características da síndrome como a redução de linfócitos,

proliferação de histiócitos. A presença de marcação foi localizada principalmente no citoplasma dos histiócitos identificando o antígeno viral.

A combinação das técnicas de histopatologia e IHQ pode ser vistas como um excelente instrumento para o diagnóstico de rotina na demonstração do CVS2 (Barbosa et al., 2004). No entanto, essa recomendação depende da utilização de reagentes e controles específicos para o agente em estudo, diluições adequadas, cuidadosamente padronizadas, equipamentos de histopatologia e técnicos especializados.

Neste trabalho, padronizou-se uma técnica de IHQ para a demonstração do CVS2 em diferentes tecidos de suínos, usando um anticorpo policlonal comercial. Observou-se total concordância nos resultados das análises com o histórico das amostras de campo submetidas aos testes de IHS e IHQ, confirmando a coerência dos resultados. A técnica padronizada pode ser aplicada como uma ferramenta na demonstração do CVS2 e, conseqüentemente, auxiliar no diagnóstico da SRM.

## Capítulo II

### DEMONSTRAÇÃO DO *CIRCOVIRUS SUÍNO* TIPO 2 (CVS2) EM TECIDOS DE ANIMAIS SUSPEITOS DA SÍNDROME DA REFUGAGEM MULTISSISTÊMICA SUÍNA (SRM) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ)

#### RESUMO

A presença do *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2) foi estudada em diferentes tecidos provenientes de animais com suspeita clínica da Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) através da técnica de Imunoistoquímica (IHQ). O antígeno viral foi demonstrado em 74 (36,45%) das 203 amostras de tecidos analisadas, sendo linfonodo e pulmão os tecidos onde o vírus foi encontrado com maior frequência. A técnica possibilitou uma correlação entre as alterações histopatológicas e a distribuição do agente viral.

**Palavras-Chave:** Suíno (*Sus scrofa scrofa*), *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2), Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM), Histopatologia, Imunoistoquímica

#### ABSTRACT

The presence of the type 2 *porcine circovirus* (PCV2) was studied in different tissues samples derived from animals which showed clinical signs of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) through the immunohistochemical technique. The viral antigen was demonstrated in 74 (36,45%) of the 203 of analysed tissue samples. The virus was found more frequently in lymph node and lung tissues. The technique made it possible a correlation between histopathological alterations and viral detection spread.

**Keywords:** Swine (*Sus scrofa scrofa*), Type 2 porcine circovirus (PCV2), of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), Histopathology, Immunohistochemical

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) associada ao *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2) é reconhecida como uma doença emergente e tem sido descrita em vários locais do mundo, onde a suinocultura tem grande expressão econômica. A enfermidade acomete suínos principalmente de 6 a 12 semanas de idade (Segalés; Domingo, 2002; Harding, 2004).

Os sinais clínicos mais representativos da doença incluem baixo ganho de peso, desenvolvimento corporal deficiente, distúrbios respiratórios e diarreia. As lesões macroscópicas associadas à doença são muito variáveis, sendo constatadas linfadenomegalia regional ou generalizada e pulmões com áreas de consolidação nos lobos anteriores crânio-ventral (Segalés et al., 2004).

As principais alterações microscópicas localizam-se especialmente nos tecidos linfóides do baço, tonsilas e linfonodos e são caracterizadas por redução nos números de linfócitos, proliferação de histiócitos e formação de células gigantes multinucleadas. Outro achado histopatológico eventualmente observado é a presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático (Rosell et al., 1999; Segalés, 2002; Kim et al., 2003).

Constitui-se em dificuldade para a obtenção do diagnóstico da SRM o fato dos sinais clínicos serem inespecíficos, de haver grande multiplicidade de órgãos envolvidos, comprometimento do sistema imune e a presença de doenças concorrentes como a síndrome respiratória reprodutiva suína (SRRS), a Parvovirose Suína, Enteropatia Proliferativa, Doença de Glässer e outras. Assim, o diagnóstico final deve ser estabelecido nos seguintes critérios: presença de sinais clínicos e achados de necropsia compatíveis com a doença, identificação de lesões histopatológicas características e a demonstração do ácido nucléico e/ou do antígeno viral dentro das lesões pelas técnicas de Hibridização *in situ*

(HIS) ou de Imunoistoquímica (IHQ) respectivamente. Esses critérios analisados separadamente não confirmam a presença da doença, pois a infecção pelo CVS2 não implica necessariamente na existência da SRM no plantel (Ellis et al., 1998; Larocelle et al., 2003; Harding, 2004).

Atualmente, a técnica de IHQ está sendo amplamente empregada em diagnósticos de enfermidades humanas e de animais. Em particular, nas doenças infecciosas suínas de etiologias bacterianas e virais. A IHQ conjuga as técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, possibilitando a demonstração de antígenos tissulares *in situ* por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (Gimeno, 1995).

A proposta deste estudo foi investigar a presença do CVS2 através da técnica de IHQ em tecidos de suínos com sinais clínicos sugestivos da síndrome da SRM.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras clínicas utilizadas neste trabalho compreenderam dois grupos.

#### 2.1.1. Amostras de tecidos obtidas em granjas de suínos do estado de Minas Gerais.

Os animais que apresentavam como principal sinal clínico, a elevação da refugagem, foram selecionados durante visitas em granjas de suínos, localizadas em diversos municípios do estado de Minas Gerais. Foram visitadas 12 granjas comerciais e realizadas 32 necropsias em suínos com idades de cinco a 11 semanas. Os animais foram identificados pela letra S e números de 1 até 32 (Sn).

Os animais necropsiados exibiam além de elevada refugagem, alguns sinais clínicos relacionados a SRM como: inapetência, dispnéia, taquipnéia, palidez da pele, diarreia, tosse, necrose de orelha e febre.

Na necropsia foram consideradas alterações macroscópicas sugestivas da SRM como: linfadenomegalia regional ou generalizada, pulmão com áreas de consolidação nos lobos pulmonares, especialmente nos lobos porção crânio ventrais e nos rins, manchas brancacentas com hemorragias tipo petequial distribuídas sobre a córtex renal.

Dos 32 suínos submetidos à necropsia, 92 amostras de tecidos foram selecionadas para análise histopatológica. Sendo 38 (41,30%) linfonodos, 16 (17,39%) pulmões, 14 (15,21%) fígados, 16 (17,39%) rins, cinco (5,43%) fragmentos de intestino e 3 (3,60%) tonsilas.

Os fragmentos de tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por um período de até 48 horas e, posteriormente, processadas, laminadas a 5 µm e coradas através da técnica de hematoxilina e eosina (HE).

#### **2.1.2. Amostras recebidas para diagnóstico histopatológico na Escola de Veterinária da UFMG**

Foram estudadas amostras de demanda recebidas no laboratório de patologia da Escola de Veterinária da UFMG, provenientes de granjas de suínos localizadas nos Estados de Goiás, Santa Catarina e Mato Grosso. Os animais apresentavam forte suspeita clínica da SRM no momento da coleta. As amostras foram recebidas durante o período de setembro de 2003 a março de 2004, sendo representadas por 36 linfonodos, 31 pulmões, 26 fígados e 18 rins, totalizando 111 tecidos analisados.

## **2.2. CONTROLES**

### **2.2.1. Tecidos positivos**

Foram utilizados como controles positivos tecidos incluídos em parafina, sabidamente positivos para a presença do CVS2, originários do Veterinary Diagnostic Laboratory-University of Minnesota-USA e Universidade Autônoma de Barcelona-ES,

cortesia dos Professores James Collins e Joaquim Segalés respectivamente.

### **2.2.2. Tecidos negativos**

Foram utilizados como controles negativos tecidos incluídos em parafina, sabidamente negativos, provenientes de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogens Free-SPF) gentilmente enviados pela Embrapa Suínos e Aves.

### **2.2.3. Soros positivos**

Soro policlonal de origem suína contra CVS2 (VMRD, Inc. catálogos nº : 211-P-PCR e nº : 210-70-PCR).

### **2.2.4. Soros controles negativos**

Soro de origem suína livre de anticorpos contra o CVS2 (VMRD, Inc. catálogo nº : 211-N-PCR) e soro de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogens Free-SPF) provenientes da Embrapa Suínos e Aves.

## **2.3. IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ)**

A técnica de IHQ foi padronizada segundo as metodologias descritas por Ellis et al. (1998), Sorden et al. (1999) e Chianini et al. (2001) com algumas modificações. Resumidamente, os cortes histológicos foram colocados em lâmina de vidro previamente revestida pelo aminopropiltrióxido (silane) (SIGMA, nº A-3648), desparafinizados com xilol. A atividade da peroxidase endógena foi inibida por imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (MERK, nº 2836) a 3% diluída em metanol por 30 minutos reidratados em soluções alcoólicas decrescentes. A recuperação antigênica foi realizada utilizando a proteinase K (GIBCO BRL, cat. nº 25530-015) a 0,05% diluída em tampão fosfato a 0,1M e o bloqueio das reações inespecíficas foi executado com soroalbumina bovina (SIGMA, nº A-1723) a 4%.

Foi adicionado 50µL de anticorpo policlonal anti-CVS2 (VMRD, Inc. cat. nº: 210-70-PCR) sobre os cortes de tecidos na diluição de 1:3.000 e incubados em câmara úmida por 40 minutos à temperatura de 37°C. As lâminas foram lavadas, drenadas e aplicado sobre os cortes de tecidos 50 µL anticorpo secundário anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (SIGMA nº A-9417) na diluição de 1:2.500. Finalmente, as lâminas foram incubadas com a solução de diaminobenzidina (DAKO, LSAB Kit Substrate peroxidase-DAB)-peróxido hidrogênio, por sete minutos, lavadas, contra-coradas pela hematoxilina de Mayer e desidratadas em soluções crescentes de álcoois. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e examinadas ao microscópio óptico nos aumento de 20x e 40x. Em cada bateria de testes foram utilizados dois controles positivos e dois controles negativos. Foram adotados os seguintes parâmetros para a interpretação dos resultados:

Reação negativa = (-) ausência total de marcações (*ausência do antígeno viral*).

Reação positiva fraca = (+) visualização de marcações em menos de 25% do campo em análise (*quantidade mínima do antígeno viral*).

Reação positiva moderada = (++) visualização de marcações entre 25 a 50% do campo em análise (*quantidade moderada do antígeno viral*).

Reação positiva forte = (+++) visualização de marcações acima de 50% do campo em análise (*quantidade abundante do antígeno viral*).

### 3. RESULTADOS

Dos 32 animais necropsiados, provenientes das 12 granjas do Estado de Minas Gerais, todos exibiram sinais clínicos de refugagem, 13 (40,62%) apresentaram distúrbios respiratórios e em 6 (18,75%) foi verificada diarreia.

Os principais achados macroscópicos observados à necropsia estão sumarizados na Figura 1. Observa-se que a linfadenomegalia foi o achado mais freqüente (59,37%), seguido de áreas de consolidação pulmonar (50,00%).

Na Tabela 1 estão resumidos os dados referentes às amostras dos animais necropsiados, lesões histopatológicas encontradas, resultados do teste de IHQ e as respectivas intensidades das marcações observadas.

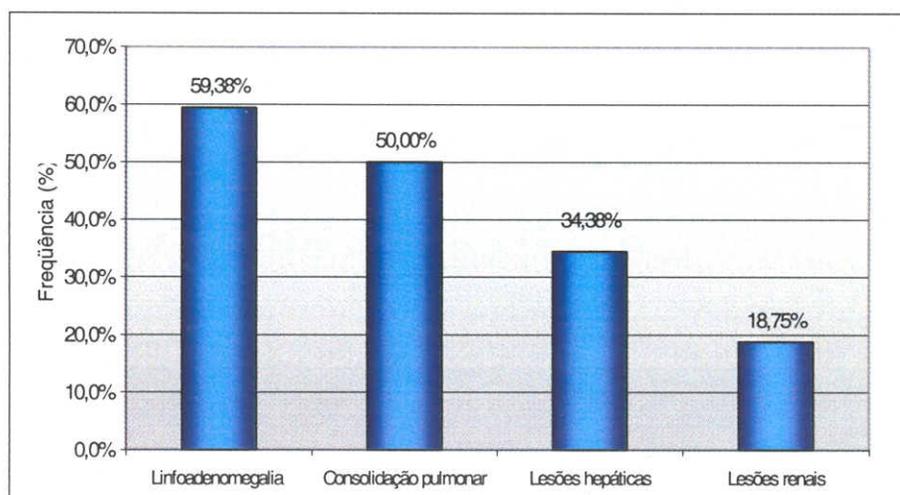


Figura 1: Ocorrências de lesões macroscópicas em 32 animais necropsiados provenientes de granjas localizadas no estado de Minas Gerais

Tabela 1. Frequência, tipo de lesões histopatológicas e resultados da Imunoistoquímica em tecidos dos 32 animais com suspeita da Síndrome da Refugagem Multissistêmica provenientes de granjas do estado de Minas Gerais

Tecidos	Lesões histopatológicas	Nº de tecidos com lesões/ total de tecidos examinados	Resultados do teste de IHQ/ total de tecidos examinados	Intensidade das marcações
Linfonodos*	Redução de células linfóides	4/38	4/38	++ +++
	Proliferação de histiócitos	4/38		
	Ausência de folículos	3/38		
	Presença de célula gigante	2/38		
	Presença de corpúsculos de inclusão	2/38		
Tonsila	Redução de células linfóides	0/3	0/3	-
	Proliferação de histiócitos	0/3		
	Ausência de folículos	0/3		
	Presença de célula gigante	0/3		
	Presença de corpúsculos de inclusão	0/3		
Baço	Redução de células linfóides	0/7	0/7	-
	Proliferação de histiócitos	0/7		
	Ausência de folículos	0/7		
	Presença de célula gigante	0/7		
	Presença de corpúsculos de inclusão	0/7		
Intestino (Placas de Peyer)	Redução de células linfóides	0/15	0/15	-
	Proliferação de histiócitos	0/15		
	Ausência de folículos	0/15		
	Presença de célula gigante	0/15		
	Presença de corpúsculos de inclusão	0/15		
Pulmão*	Pneumonia intersticial	2/16	3/16	+ ++
	Broncopneumonia	1/16		
	Presença de célula gigante	1/16		
Rim	Nefrite intersticial multifocal	0/12	0/12	-
	Glomérulo nefrite	0/12		
	Presença de célula gigante	0/12		
Fígado	Hepatite periportal	0/11	0/11	-
	Presença de célula gigante	0/11		
<b>Total</b>			<b>7/92</b>	

\*Lesão em pelo menos um linfonodo examinado (inguinal superficial, mesentérico, mediastínico).

\*Lesão em pelo menos um lobo do pulmão (lobo apical direito e esquerdo, lobo cardíaco direito e esquerdo, lobo diafragmático direito e esquerdo e lobo acessório).

Reação negativa = (-) ausência total de marcação.

Reação positiva fraca = (+) visualização de marcações em menos de 25% do campo em análise.

Reação positiva moderada = (++) visualização de marcações entre 25% a 50% do campo em análise.

Reação positiva forte = (+++) visualização de marcações acima de 50% do campo em análise.

A análise dos resultados revelou a presença de lesões histopatológicas características da síndrome em quatro amostras dos 38 (10,52%) linfonodos e em três amostras dos 16 (18,75%) pulmões analisados.

Foram identificadas lesões histopatológicas como redução do número de células linfóides e proliferação de histiócitos em 10,53% (4/38), ausência de folículos em 7,90% (3/38). Além disso, evidência clara de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e células gigantes multinucleadas foram encontrados em 6,25% (2/38) amostras dos linfonodos estudados.

Dos 16 pulmões analisados foram demonstradas lesões de pneumonia intersticial em 12,50% (2/16), broncopneumonia em 6,25% (1/16) e

presença de célula gigante também em 6,25% (1/6). As demais amostras de tecidos analisadas histopatologicamente como intestino, baço, tonsila, rim e fígado não mostraram alterações compatíveis com a SRM.

Do total de 32 animais examinados somente três foram positivos no teste de IHQ (Tab. 2). O animal identificado por S<sub>1</sub> apresentou marcação em dois linfonodos inguinais e mesentéricos e também no pulmão. Os outros dois animais identificados por S<sub>24</sub> e S<sub>28</sub> apresentaram marcações no linfonodo e no pulmão. As marcações, nesses tecidos, variavam de fortes (+++) a moderadas (++) . Dos sete resultados positivos, três linfonodos apresentaram marcações fortes (+++), três pulmões e um linfonodo mostraram marcações moderadas (++) .

Tabela 2. Imunoistoquímica para o *Circovirus suíno* tipo 2 em suínos com a Síndrome da Refugagem Multissistêmica

Granja	Animais necropsiados	Resultados positivos/tecidos coletados						
		linfonodo	tonsila	pulmão	fígado	rim	baço	intestino
G <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	2/3	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
G <sub>9</sub>	S <sub>24</sub>	1/1	0/1	1/1	0/1	0/0	0/0	0/0
G <sub>11</sub>	S <sub>28</sub>	1/1	0/0	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0

A amostra de pulmão com lesão de broncopneumonia intersticial e negativa para a presença de antígeno viral CVS2 no teste de IHQ foi procedente de granja sabidamente positiva para pneumonia enzoótica.

Os resultados obtidos nas 113 amostras recebidas na EV da UFMG, com suspeita da SRM estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Frequência das amostras clínicas analisadas, enviadas ao laboratório de histopatologia do Departamento de Patologia da UFMG, presença de lesões histopatológicas, resultados no teste de Imunoistoquímica e intensidade das marcações.

Tecidos	Lesões	Frequência de tecidos com lesões /total de tecidos analisados	Resultados da IHQ/ total de tecidos analisados	Intensidade da marcação
Linfonodos	Proliferação de histiócitos	34/36	31/36	++ +++
	Redução de células linfóides	32/36		
	Ausência de folículos	29/36		
	Presença de célula gigante	19/36		
	Presença de corpúsculos de inclusão	16/36		
Pulmão	Pneumonia intersticial	13/31	16/31	++
	Broncopneumonia	9/31		
	Presença de célula gigante	2/31		
Rim	Nefrite intersticial multifocal	9/26	11/26	++ +
	Glomérulonefrite	4/26		
Fígado	Hepatite periportal	13/16	8/16	+
	Necrose	1/16		
Total			66/111	

\*Lesão em pelo menos um linfonodo examinado (inguinal superficial, mesentérico).

\*Lesão em pelo menos um lobo do pulmão (lobo apical direito e esquerdo, lobo cardíaco direito e esquerdo, lobo diafragmático direito e esquerdo e lobo acessório).

Reação negativa = (-) ausência total de marcação.

Reação positiva fraca= (+) visualização de marcações em menos de 25% do campo em análise.

Reação positiva moderada= (++) visualização de marcações entre 25% a 50% do campo em análise.

Reação positiva forte= (+++) visualização de marcações acima de 50% do campo em análise.

Na presente investigação, lesões microscópicas atribuídas a SRM foram encontradas em órgãos linfóides (linfonodos) e órgãos não-linfóides como pulmão, fígado e rins conforme mostra a Tabela 3.

Dos 36 linfonodos analisados, as lesões mais frequentes foram proliferação de histiócitos e redução de células linfóides com 94,44% (34/36) e 88,88% (32/36), respectivamente. Seguido por ausência de folículos linfóides em 80,55% (29/36), presença de células gigantes em 52,77% (19/36) e 44,44% (16/36) corpúsculos de inclusão.

Dos 31 pulmões analisados, 44,82% (13/31) apresentavam pneumonia intersticial, 31,04% (9/31) broncopneumonia e 6,45% (2/31) presença de célula gigante multinucleada. Nos rins, das 26 amostras analisadas, foi constatada nefrite intersticial multifocal em 34,61% (9/26) e glomérulonefrite em 15,38% (4/26).

Significativa proliferação de histiócitos foi verificada no fígado em 81,25% (13/16) das amostras analisadas. As células inflamatórias estavam distribuídas na tríade portal e concentrada em focos distribuídos aleatoriamente, o qual ocasionalmente representou simples células em necrose 6,25% (1/16).

Os resultados dos testes de IHQ realizados em 92 amostras de animais necropsiados e em 111 amostras de materiais recebidos para diagnóstico, observamos 35,96% (203/73) de amostras positivas. A presença do antígeno viral foi verificada em tecidos linfóides e não-linfóides conforme mostram as Tabelas 1 e 3 e a Figura 2.

No teste de IHQ houve uma variação na quantidade e distribuição do antígeno viral nos tecidos analisados. O antígeno viral foi identificado pela marcação de pequenos

grânulos, amorfos, apresentando cor marrom, distribuídos de forma abundante e uniforme pelo citoplasma e, ocasionalmente, no núcleo das células infectadas, conforme mostra a Figura 3.

Os resultados mostraram que as marcações ocorreram principalmente nos histiócitos. Além disso, o antígeno viral foi também demonstrado, em menor freqüência no citoplasma das células gigantes e na periferia dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos.

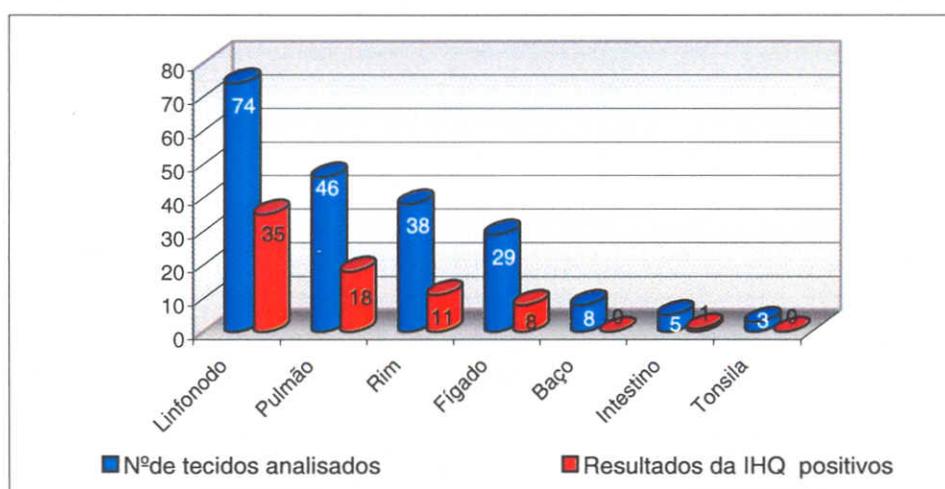


Figura 2. Resultados positivos nos testes de Imunoistoquímica nas diferentes amostras de tecidos analisadas.

Neste estudo o antígeno viral foi demonstrado através do teste de IHQ sempre em associação com lesões histopatológicas características da SRM. Os dados obtidos mostraram uma maior freqüência de resultados positivos nos linfonodos e pulmões seguidos pelo rim e fígado. Os controles negativos analisados paralelamente com as análises mostraram uma estrutura histológica normal quando corados pela HE (Fig. 4).

Houve variação na quantidade e distribuição do antígeno viral nos tecidos analisados

como pode ser verificado nas Tabelas 01 e 03. Nos linfonodos, variáveis números de histiócitos presentes no infiltrado apresentaram marcações moderadas (++) e principalmente fortes (+++). No pulmão observaram-se marcações moderadas (++) . No rim muitas células positivas foram observadas nos interstícios e as marcações variavam de fracas (+) a moderadas (++) . No fígado, variável número de células positivas foi observado na região periportal e apresentaram marcações fracas (+).

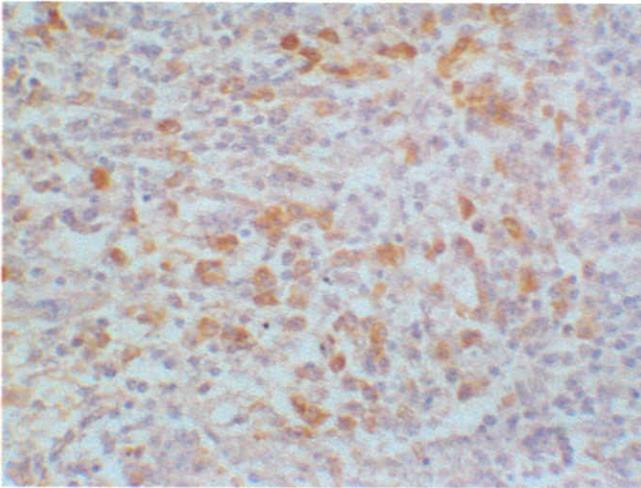


Figura 3 Fotomicrografia do linfonodo naturalmente infectado pelo *Circovirus suino* tipo 2. Antígeno viral detectado pela técnica de Imunoistoquímica. Notar a marcação específica no citoplasma dos macrófaos. Aumento 400X.

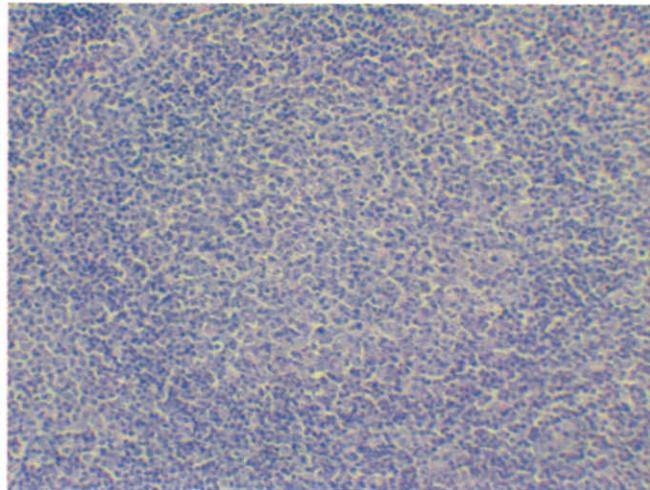


Figura 4. Controle negativo da reação no teste de Imunoistoquímica em linfonodo. O anticorpo primário representado pelo soro de suíno de animal SPF, cromógeno DAB, contracoloração por Hematoxilina de Mayer. Aumento 200X.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrada a presença do CVS2 pelo teste de IHQ, em diferentes tecidos provenientes de suínos com suspeita clínica da SRM. Os resultados mostraram altas freqüências das lesões macroscópicas como linfadenomegalia e áreas de consolidação pulmonar nos 32 animais necropsiados, apesar de apenas três deles terem sido positivos na IHQ.

É consenso de vários pesquisadores que os achados macroscópicos não são conclusivos para a diagnosticar a doença no plantel. No entanto, a constatação do aumento nos linfonodos, principalmente os inguinais superficiais e mesentéricos, as áreas de consolidação pulmonar especialmente nos lobos anteriores porções crânio-ventral, manchas brancacentas nos rins, com hemorragias tipo puntiforme distribuídas na córtex renal e visualização de pontos amarelados no fígado, são fortes indicativos de uma possível existência da síndrome no plantel, podendo auxiliar no direcionamento do diagnóstico laboratorial (Rosell et al., 1999; Segalés et al., 2004).

A distribuição das lesões histopatológicas em órgãos linfóides (linfonodos e placas de Peyer) e não-linfóides (pulmão, rim e fígado) nos tecidos dos suínos analisados, concordam parcialmente com as prévias descrições de Ellis et al. (1999). As mais relevantes e freqüentes alterações observadas nos linfonodos com depleção linfóide e proliferação de macrófagos, especialmente histiócitos. Os resultados são compatíveis com as documentações realizadas por Ellis et al. (1999) que verificaram em 131 tecidos analisados 54 foram positivos no teste de IHQ. Dos 54 resultados positivos, 27 apresentavam lesões histopatológicas características da síndrome como redução nos números de linfócitos e infiltração de histiócitos. Todd, (2000) descreveram que essas lesões são sugestivas de um fenômeno de imunossupressão.

Neste trabalho, a aplicação do teste de IHQ demonstrou a presença do antígeno viral regularmente distribuído nos linfonodos, pulmão, rins e em menor grau no fígado. Esses resultados concordaram, parcialmente, com os achados de Rosell et al. (1999) que encontraram antígeno viral em maior concentração no fígado, quando comparados com os rins.

Foram verificadas altas concentrações do antígeno viral no citoplasma das células infectadas caracterizando a reação positiva. As melhores marcações, que variavam de evidentes a fortes, foram demonstradas principalmente nos linfonodos, pulmões e rins. Segundo Rosell et al. (1999) a variação em intensidade e distribuição das lesões histopatológicas em órgãos linfóides e não-linfóides nos casos de animais suspeitos da SRM, provavelmente dependem do estágio da doença em que os animais se encontram. Segalés et al. (2002), relataram que podem ser casos representativos da forma aguda da doença e os tecidos que apresentavam lesões histopatológicas como redução dos números de linfócitos e proliferação de histiócitos em órgãos linfóides mostraram forte imunorreação pela técnica de IHQ. McNeilly et al. (1999) descreveram que em virtude das freqüentes infecções subclínicas causadas pelo CVS2 serem comuns dentro dos rebanhos de suínos é recomendada a demonstração de grande quantidade de ácido nucléico ou antígeno do CVS2 pelos testes de IHQ\ HIS em lesões histopatológicas.

Os resultados deste trabalho evidenciaram que tipicamente o antígeno viral foi localizado no citoplasma de histiócitos (Fig. 3), em células gigantes multinucleadas e, algumas vezes, na periferia dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. As marcações não foram encontradas em células epiteliais e esses achados concordam parcialmente com Ellis et al. (1999) que encontraram, ocasionalmente, marcações em células epiteliais. A aparente ausência de marcação pelo teste de IHQ no núcleo das células infectadas pelo CVS2 necessita de mais estudos.

Pasick (2002) verificou através da técnica de HIS que uma grande quantidade de ácido nucléico do CVS2 foi observada em histiócitos e está em concordância com outros pesquisadores que sustentam o argumento das células de defesa serem alvos primários para a replicação do vírus. Porém, recentemente, Vincent et al. (2003) propuseram que os monócitos, histiócitos e células dendríticas sejam alvo primário do CVS2, podendo ser identificado por várias semanas nestas células, havendo indicação de replicação viral nas mesmas. Gilpin et al. (2003), descreveram que a presença do vírus nas células está relacionada com endocitose e não com a multiplicação viral nas mesmas. Darwich et al. (2004) reportaram que os histiócitos e células dendríticas contêm o vírus em grande quantidade no citoplasma e podem não ser a fonte primária de replicação viral.

Magar et al. (2000) avaliaram em infecção experimental a presença de inclusões basofílicas intracitoplasmáticas e células gigantes multinucleadas em 10 dos 16 tecidos analisados, mostrando inflamação granulomatosa. Segalés (2002) contatou a presença dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em aproximadamente 30% a 35% dos casos positivos da SRM. Em alguns casos a presença do CVS2 tem sido demonstrada somente pela identificação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. Trata-se de formações arredondadas e de coloração basofílica encontradas ocasionalmente nos macrófagos dos tecidos afetados pelo CVS2, corados pela técnica de HE e apresentaram marcação na periferia através da técnica de IHQ.

A baixa frequência na demonstração do antígeno viral pelo teste de IHQ em 7,60% (7/92) das amostras de tecidos analisadas em 32 animais de 12 granjas de suínos de Minas Gerais sugere, que as amostras teciduais foram procedentes de animais que já eram refugos e não que se tornaram refugos por causa da infecção pelo CVS2 e sim por outros agentes infecciosos e ou por falhas de manejo. Portanto, a escolha do animal ou animais para serem submetidos à necropsia é de fundamental importância e

mais de um animal do plantel deve ser examinado para auxiliar no diagnóstico diferencial.

Os resultados dos testes histológicos (HE) foram confrontados com os resultados dos testes de IHQ, conforme mostram as Tabelas 2 e 4, que ilustram claramente a relação entre a presença de lesões histopatológicas, compatíveis com a SRM e a demonstração do antígeno viral CVS2. Essas observações coincidem com as investigações realizadas por Rosell et al. (1999) e Calsamiglia et al. (2002) que verificaram respectivamente nos testes de IHQ e HIS a correlação entre as lesões histopatológicas características da SRM e a presença do antígeno viral e ou ácido nucléico viral em diferentes tecidos de suínos.

A alta frequência de resultados positivos encontrados nos linfonodos (47,29%) sugere que esse tecido deve ser usado como amostra de eleição para tentativa de demonstração do CVS2 no teste de IHQ. Pelos resultados obtidos observa-se que dentro das amostras de tecidos analisadas os linfonodos foram os que apresentaram maior frequência de resultados positivos e maior frequência de marcações classificadas como fortes no teste de IHQ, permitindo-se uma fácil leitura, interpretação e confiabilidade dos resultados obtidos. Moreno et al. (2003) escolheram os linfonodos como o material mais indicado para a demonstração do CVS2 pelo teste de PCR.

Por ser um órgão de fácil identificação, especialmente o linfonodo inguinal e pelo fato deste se encontrar aumentado de volume na maioria dos casos de SRM, ele é facilmente visualizado facilitando o processo de coleta da amostra. A qualidade de qualquer análise laboratorial seja de natureza física-química ou microbiológica inicia-se na obtenção correta do material de campo.

Foi possível confrontar nitidamente as alterações histopatológicas características da SRM como redução acentuada de linfócitos e proliferação de histiócitos, a

ausência de folículos linfóides, presença de células gigantes e corpúsculos de inclusão com a presença do agente viral dentro das lesões pelo teste de IHQ. Além disso, os pesquisadores Allan; Ellis, (2000); Krakowka et al. (2000) verificaram que mesmo nas infecções subclínicas, nos centros germinativo dos linfonodos são demonstradas pequenas quantidades do antígeno viral do CVS2.

Outro aspecto a considerar é o cuidado na seleção dos animais e a coleta das amostras. Inicialmente, deve-se lançar mão do exame clínico completo, coletivo e individual, acompanhado pela necropsia do animal, se possível, de vários que é o ideal. Esses cuidados auxiliam também no diagnóstico diferencial da SRM no rebanho. Se essa conduta for inviável, a

disponibilidade de tecidos linfóides, em particular os linfonodos, podem ser satisfatórios.

### **CONCLUSÕES DA SEÇÃO 1**

Há evidências suficientes para concluir que:

Houve uma consistente associação entre a presença do antígeno viral CVS2 demonstrado pela IHQ e as lesões histopatológicas características da SRM.

O linfonodo é a amostra de eleição para a demonstração do antígeno viral pela técnica de IHQ.

O teste de IHQ associado ao exame histopatológico pode ser usado para o diagnóstico da SRM.

## SEÇÃO 2

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE  
CÉLULAS: PESQUISA DE ANTICORPOS PARA O *CIRCOVIRUS SUÍNO* TIPO 2

## Capítulo I

### PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC) NA DEMONSTRAÇÃO DE ANTICORPOS PARA O *CIRCOVIRUS SUÍNO* TIPO 2 (CVS2) EM SOROS DE SUÍNOS

#### RESUMO

Foi padronizada a técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC) objetivando-se a demonstração de anticorpos para o *Circovirus suíno* tipo 2 em suínos. Os soros foram diluídos e incubados sobre a monocamada de células PK15 infectadas e fixadas. O método permitiu a diferenciação e titulação de soros de referências reagentes e não reagentes e a avaliação preliminar de soros de campo. As reações positivas produziram uma marcação de cor marrom no interior das células podendo ser lida ao microscópio óptico.

**Palavras-chave:** Suíno (*Sus scrofa scrofa*), *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2), Imunoperoxidase em monocamada de células (IPMC), Sorologia

#### ABSTRACT

The immunoperoxidase in monolayer assay was standardized for the detection of serum antibodies against type 2 porcine circovirus (PCV2) in pigs. Sera were diluted and incubated over PK-15 cells PCV2 infected and fixed monolayer. The technique allowed the differentiation of reacting and non-reacting references serum samples and the study of field sera from animals originated from herds suspected of being infected with PCV-2. The positive reaction was demonstrated by the cell brown labelling that could be seen by optical microscope.

**Keywords:** Swine (*Sus scrofa Scrofa*), Type 2 porcine circovirus (PCV2), Immunoperoxidase in monolayer of cells (IP), Serology

## 1. INTRODUÇÃO

O *Circovírus suíno* (CVS) é membro da família *Circoviridae*, mede 17nm de diâmetro, apresenta uma estrutura icosaédrica e não possui envelope lipídico. O genoma é composto por um DNA circular covalentemente fechado, fita simples, senso positivo, com um peso molecular de  $0,56 \times 10^6$  Daltons e possui em torno de 1.760 nucleotídeos (Lukert et al., 1995; Mankertz et al., 2000).

O *Circovírus suíno* tipo 1 (CVS1) é considerado não patogênico para os suínos e já é conhecido há muito tempo, como contaminante não citopatogênico da linhagem de células derivadas de rim suíno (Porcine Kidney-PK15). O *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2) tem sido associado a várias doenças de suínos entre elas a Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) (Tischer et al., 1986; Kim et al., 2003; Segalés et al., 2004).

Os animais clinicamente afetados pela SRM exibem emagrecimento progressivo, distúrbios respiratórios e diarreia. Os achados macroscópicos mais frequentes são linfadenomegalia e áreas de consolidação pulmonares especialmente nos lobos anteriores nas porções crânio-ventrais. As lesões histopatológicas nos órgãos linfóides são caracterizadas por redução dos números de linfócitos seguida por proliferação de histiócitos, presença de células gigantes multinucleadas e, ocasionalmente, são observados numerosos corpúsculos de inclusão intracitoplasmático (Clark; Harding, 1997; Segalés, 2002).

Muitos métodos de diagnóstico têm sido descritos na literatura para demonstrar a presença do CVS2 em suínos. O vírus pode ser identificado usando técnicas como isolamento, Imunofluorescência direta (IF), Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC), Reação em Cadeia por Polimerase (Polimerase Chain Reaction-PCR), Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) de captura, Hibridização *in situ* (HIS) e

Imunoistoquímica (IHQ) (McNeilly et al., 1999; Allan; Ellis, 2000; Segalés et al., 2004).

Na pesquisa de anticorpos para o CVS2, a literatura cita vários testes sorológicos como Imunofluorescência Indireta (IFI), o ELISA competitivo e a Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC) (Balasch et al., 1999; Walker et al., 2000; Rodríguez-Arrijoja et al., 2003). Porém, a interpretação dos resultados é uma tarefa bastante delicada, em virtude da ocorrência de grandes variações em especificidade dos testes e reprodutibilidade entre os laboratórios.

O objetivo deste trabalho foi padronizar e aplicar a técnica IPMC na demonstração de anticorpos para o CVS2 em soros de suínos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido nas dependências da Seção de Biologia do Laboratório Nacional Agropecuário/Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MG-MAPA) e no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária da UFMG.

### 2.2. SOROCONTROLE

Soro positivo: Soro policlonal de origem suína contra CVS2 (VMRD, Inc. catálogo nº: 211-P-PCRv e catálogo nº: 210-70-PCRv).

Soro negativo: Soro controle negativo de origem suína livre de anticorpos contra o CVS2 (VMRD, Inc. catálogo nº: 211-N-PCRv) e soro de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogens Free-SPF) provenientes da Embrapa Suínos e Aves.

### 2.3. SOROS TESTE

Foram analisados soros de campo, provenientes de granja comercial de suínos de ciclo completo com suspeita clínica da SRM. As amostras de soros foram coletadas em todas as faixas etárias totalizando-se 30 assim divididas: 2 a 3 semanas, 4 a 6 semanas, 7 a 10 semanas; 11 a 13 semanas; 14 a 21 > de 24 semanas. Os soros foram devidamente identificados e armazenados a -20°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

### 2.4. IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC)

A padronização da técnica de IPMC utilizada na demonstração de anticorpos para o CVS2, seguiu a metodologia descrita nos trabalhos de Balasch et al. (1999) e Rodríguez-Arrijo et al. (2000), com modificações.

#### 2.4.1. Vírus

Para a infecção das células foi utilizada a amostra viral de CVS2 recuperada de um suíno com SRM de Minnesota-USA, gentilmente cedida pelo Prof. Han So-Joo. O estoque viral foi obtido por passagens seriadas em células de linhagem derivadas de rim de suíno, PK15 (Porcine Kidney), semiconfluentes e tratadas com solução de D-glucosamina-HCl (ALDRICH, nº: G220-6) na concentração de 300 mM (Tischer et al., 1987).

#### 2.4.2. Cultivo das Células PK15 livres do CVS1

Foram utilizadas para propagação viral, células PK15 do laboratório ID-Lelystad-(ID-DLO) Holanda e passagem a partir do número 72. A célula foi previamente analisada pelo teste de PCR no Laboratório de Virologia Molecular Animal /BIOAGRO-(UFV) e mostrou-se negativa à presença do CVS1. O cultivo celular foi realizado em garrafas com área de 25 cm<sup>2</sup> (SARTEDT, InC NEWTON, nº: 28658) semeando-se 600.000 células/mL em MEM (Meio Mínimo Essencial-GIBCO BRL, cat. nº: 41500-083)

suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), inativado a 56°C por 30 minutos e antibióticos (200UI/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 100µg/mL de fungizona). O meio de manutenção das células foi o mesmo, exceto pela suplementação com 2% SFB.

#### 2.4.3. Infecção das células PK15 com CVS2

Para a produção das monocamadas de células PK15 infectadas pelo o CVS2 foram testados dois protocolos.

##### 2.4.3.1. Inoculação das células PK15 em suspensão

As células PK15, recém tripsinizadas foram ressuspensas em 9,5 ml de MEM, com 2% de SFB, na concentração de 80.000 células/cm<sup>2</sup> (500.000 células/mL) e inoculadas com 0,5 mL de vírus (10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub> /0,5µL). Foram dispensados 50 µL de células infectadas em cada uma das 96 cavidades da microplaca (SARTEDT, InC NEWTON, nº: 83.1835). As microplacas foram incubadas por 60 minutos, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Durante esse período cada microplaca foi cuidadosamente homogeneizada por quatro vezes com intervalo de 15 minutos. Após esse procedimento foi acrescentado em cada cavidade mais 50 µL de MEM com 10% de SFB e a microplaca foi incubada por 4 horas nas mesmas condições descritas anteriormente, quando atingiu 70% a 80% de confluência celular. Após esse período, o meio de cultura foi desprezado em um recipiente contendo hipoclorito de sódio a 3% e a monocamada de células foi lavada três vezes com solução salina tamponada (PBS) com 0,15 M, pH 7,2. Foram testados volumes de 60µL e 100µL solução de 300mM D-glucosamida - HCl diluída em solução de sais de Hank's contendo 2,5% do tampão HEPES (N-2-Hidroxetil piperazine-N-2-ácido etano sulfônico-GIBCO BRL, cat. nº: 11344-041), 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL estreptomicina e pH final de 5,7 por 30 e 60 minutos, em estufa de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C (Tischer et al., 1987). Posteriormente, a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS e

adicionado MEM com 10% de SFB. Finalmente, a microplaca foi novamente incubada nas mesmas condições descrita anteriormente, por um período de 48 horas.

#### 2.4.3.2. Inoculação das células PK15 em monocamada de células

As células PK15 cultivadas em MEM com 5% de SFB foram tripsinizadas e um volume de 50 µL com uma concentração de 50.000 células/cm<sup>2</sup> foi distribuído em toda a microplaca de 96 cavidades. As microplacas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e utilizadas para a inoculação viral quando observada uma confluência de 70%, o que ocorreu aproximadamente após 18 horas. A monocamada celular foi submetida a um processo de dupla lavagem com de PBS pH 7,2 e após este procedimento, foi inoculado 50µL do vírus (10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub> /50µL) em cada cavidade. Após 1 hora de incubação em estufa à temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> o inóculo foi desprezado em solução de hipoclorito a 3% e, em toda a microplaca foram adicionados 100 µL de MEM contendo 10% de SFB. As microplacas foram novamente mantidas em estufa à temperatura de 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Após esse período, o meio de cultura foi desprezado e a monocamada foi lavada novamente com PBS e tratada com volumes 50, 60 e 100µL de D-glucosamida-HCl, preparada e incubada conforme a descrição anterior por três diferentes períodos, 30, 45 e 60 minutos. Posteriormente, a monocamada de célula foi lavada três vezes com PBS, dispensado 100µL de MEM com 10% de SFB em toda a microplaca e incubada novamente conforme as condições descritas anteriormente por 48 horas.

#### 2.4.4. Fixação da monocamada de células

Após 48 horas de incubação, o meio de cultura foi removido das microplacas, descartado em solução de hipoclorito de sódio a 3% e a monocamada de células foi lavada três vezes com PBS com 0,15 M, pH 7,2 e fixada imediatamente com uma solução de acetona (p.a) e álcool etílico

absoluto, em diferentes proporções como descrita na tabela 1.

Tabela 1. Diferentes concentrações dos fixadores (álcool etílico e acetona) usadas sobre monocamada de células PK15

Álcool etílico	Acetona
80%	20%
70%	30%
60%	40%
50%	50%
40%	60%

Após 10 minutos, o fixador foi desprezado em recipiente adequado, e as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBS, pH 7,2, contendo 0,05% Tween 20 (PBS-Tw20) e secas. As microplacas foram armazenadas envolvidas por papel alumínio dentro de sacos plásticos, e mantidas à temperatura de 4°C até o momento da realização dos testes sorológicos.

#### 2.4.5. Bloqueio da monocamada de células

O bloqueio da monocamada de célula foi realizado com soroalbumina bovina a 4% diluída em PBS. O tempo de ação sobre a monocamada de célula foi de 1 hora, em temperatura ambiente. Após esse período, as microplacas foram lavadas e secas, conforme descrito na etapa anterior.

#### 2.4.6. Análise sorológica

Para a realização do teste de IPMC, as microplacas foram trazidas e mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos. Foram adicionados respectivamente nas cavidades pertencentes às fileiras G e H volumes de 70 µL de soro controles positivos (VMRD, Inc. cat. nº : 211-P-PCR) e negativo (VMRD, Inc. cat. nº : 211-N-PCR) respectivamente e nas demais fileiras o soro teste e suas respectivas diluições. Os soros testes foram testados em duplicata, acrescentando-se 70µL por cavidades em diluições duplas seriadas de

1:10 até 1:20240. As microplacas foram levadas e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 60 minutos e lavada cinco vezes com PBS-Tw20 e secas. A seguir adicionou-se 70 µL do conjugado coelho anti-IgG de suíno, conjugado com a enzima peroxidase (SIGMA IMMUNOCHEMICALS, A-9417) diluído em PBS. Para padronização do teste foram usadas em duplicata, cinco diferentes concentrações desse conjugado 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 e 1:5000. Repetiu-se o mesmo procedimento de incubação e lavagem, como descrito anteriormente.

#### 2.4.7. Revelação

A solução do substrato foi previamente preparada dissolvendo 20mg de AEC (3-amino-9-etilcarbazol - SIGMA CHEMICAL, nº: A-6926) em 5,0 ml de N.N-dimetilformamida (SIGMA-ALDRICH D-158550) A solução foi alíquotada e estocada à temperatura de 4°C. Antes de ser usada, foi acrescentado 100µL de AEC em 50 mL de tampão acetato de sódio a 0,05M (MERK-Lot. 51615) pH 5,0 e 0,2 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% de v/v (Nº 2836). Aplicou-se um volume de 70 µL em todas as cavidades da microplaca e deixou-se reagir.

#### 2.4.8. Leitura e Interpretação

O desenvolvimento da cor foi monitorado pelo o uso do microscópio óptico invertido no aumento de 10x. Quando foi observada a ocorrência da reação nuclear no controle positivo de células, a reação foi paralisada com o descarte do substrato em solução de hipoclorito de sódio a 3% e posterior lavagem da monocamada com PBS. Metade da microplaca foi preenchida com tampão acetato de sódio a 0,05 M e a outra metade com água de torneira. Para interpretação, os resultados sorológicos foram classificados como negativo ou reativos. Os positivos foram agrupados em títulos: **título baixo** (20 até 160); **título médio** (320 até 2560) e **título alto** (> de 5120) Rodríguez-Arriola et al. (2000).

### 3. RESULTADOS

Após a padronização da técnica, foi possível a discriminação entre amostras positivas e negativas. Os resultados mostraram que o teste de IPMC foi eficiente na identificação de anticorpos para CVS2, como verificado nos controles positivos, negativos e soros testes provenientes de granja com histórico clínico da SRM conforme mostram as figuras 1,2 e 3.

Os melhores resultados de inoculação viral foram obtidos usando células em suspensão e o volume de 60µL de D-glucosamina a 300mM com um tempo de 30 minutos de ação sobre a monocamada celular semi-confluyente. A morfologia original da célula PK15, caracterizada como uma estrutura epitelióide, foi monitorada durante o período de ação da glucosamina através de microscópio óptico invertido. Observou-se que as células banhadas pela solução de açúcar sofreram arredondamento nuclear e expansão do citoplasma. A recuperação da morfologia original ocorreu após a retirada da solução, lavagem da monocamada com PBS e adição imediata de MEM fresco com 10% de SFB.

O melhor resultado das diferentes concentrações dos fixadores (álcool etílico e acetona) foi à proporção de 1:1. No entanto, após a aplicação do fixador nesta concentração constatou-se as seguintes alterações: um ligeiro escurecimento do contorno celular, uma dilatação e arredondamento nuclear, seguindo por uma discreta retração do citoplasma. Nas concentrações mais altas de acetona foi verificado um intenso escurecimento nas bordas e alterações na morfologia celular. Além disso, a microplaca não suportou a ação dos fixadores tornando-se inicialmente esbranquiçada e depois totalmente opaca, impossibilitando a leitura dos testes ao microscópio.

O melhor resultado paralisação da reação foi obtido com o uso do tampão acetato de sódio a 0,05 M e não pela água corrente. O tampão acetato de sódio mostrou-se mais eficiente na paralisação da reação e uma preservação mais longa nas marcações das células infectadas.

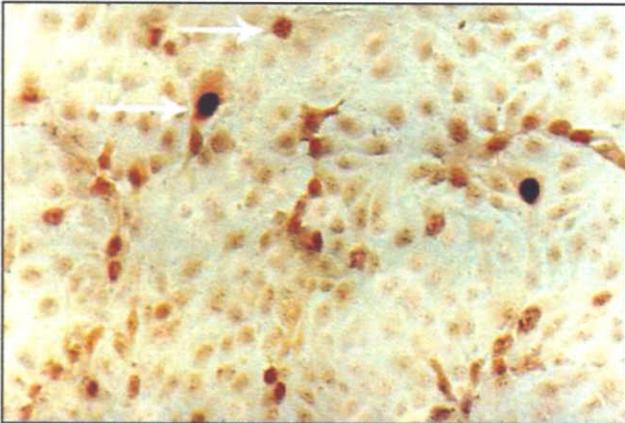


Figura 1- Teste Imunoperoxidase em Monocamada de Célula Pk15 para a detecção de anticorpos para o *Circovírus suíno* tipo 2. Em destaque células infectadas com marcação nuclear. Aumento 200 X.

Foto: André Almeida Fernandes



Figura 2- Fotomicrografia da célula Pk15 infectada pelo *Circovírus suíno* tipo 2. Aumento 400 X.  
Foto: André Almeida Fernandes

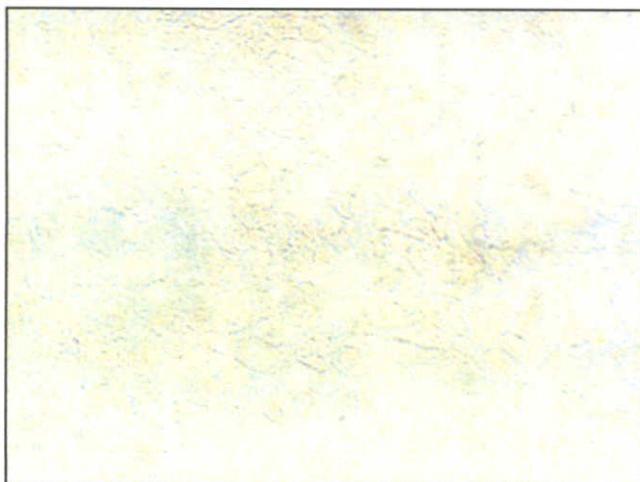


Figura 3 – Controle negativo do teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células PK15. Aumento 200 X.

Foto: André Almeida Fernandes

Após a revelação, nos controles negativos e também nas diluições mais altas do soro foi verificada ausência de marcação, prevalecendo uma cor rósea clara na monocamada celular (Fig.3). As células infectadas, distribuídas sobre a monocamada, exibiam tipicamente uma reação bastante evidente de cor marrom, compacta e concentrada predominantemente no núcleo celular, evidenciando a multiplicação viral nessas células. Ocasionalmente, no citoplasma, foram observadas discretas pigmentações também de cor marrom distribuídas de forma difusa. O título dos soros foi determinado como o inverso da mais alta diluição que apresentasse pelo menos 5% das células da monocamada infectada. As células não infectadas apresentavam uma leve coloração rósea, semelhante ao controle de células negativo.

Verificou-se que as diluições menores ou iguais a 1:10 dos soros testes apresentavam reação de coloração de fundo muita intensa, dificultando a leitura e a interpretação dos resultados. Portanto, adotou-se o uso das diluições dos soros a partir de 1:20. A melhor diluição do anti-soro conjugado com a enzima peroxidase foi de 1:2000 e o tempo de ação de substrato para revelação de 10 minutos.

Após a padronização, a técnica de IPMC foi utilizada para testar amostras de soros de campo provenientes de granja com suspeita da SRM. Os resultados dos soros testes correspondentes a 30 amostras coletadas em diferentes fases de produção mostraram resultados negativos e positivos com títulos até 10.240 (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos títulos sorológicos obtidos através do teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células em amostras de soros proveniente de uma granja comercial de ciclo completo com suspeita da Síndrome da Refugagem Multissistêmica em diferentes faixas etárias

Faixa etária (semanas)	Títulos	Faixa etária (semanas)	Títulos
<b>2-3</b>	640	<b>11 a 13</b>	160
	640		160
	320		160
	320		160
	320		320
<b>4-6</b>	320	<b>14 a 22</b>	5120
	320		5120
	160		5120
	160		10240
	80		10240
<b>7-10</b>	0	<b>&gt;24</b>	2560
	80		1280
	80		1280
	40		1280
	0		1280

#### 4 DISCUSSÃO

Diversos métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos para demonstrar a infecção pelo *Circovírus suíno* dentro de um plantel. Dentre eles, a IFI, o ELISA competitivo e a IPMC. Embora, essas técnicas sejam muito úteis para determinar a infecção pelo CVS2 e compreensão da dinâmica do nível de infecção viral dentro do rebanho, quando empregadas isoladamente são insuficientes para diagnosticar a SRM.

A importância do desenvolvimento e aplicação de técnicas sorológicas está relacionada à obtenção de resultados que nos auxiliam a entender o padrão de infecção dentro de um plantel, traçar estratégias de controle e realizar estudos soropidemiológicos.

Para a produção da monocamada infectada, a inoculação em suspensão é mais prática, rápida e necessita menor volume de inóculo viral e os resultados finais da técnica foram superiores quando comparados com a inoculação em monocamada de célula.

Neste trabalho, usando o tempo de 30 minutos e um volume de 60µL, a monocamada de células suportou a agressão da glucosamina, permanecendo aderida às cavidades da microplaca. A solução de glucosamina foi aplicada após 4 horas da inoculação viral, tempo necessário para a monocamada celular alcançar em torno de 70% a 80% de confluência celular. O tratamento com glucosamina em monocamada com baixa confluência celular pode resultar no desprendimento de toda a monocamada.

Tischer et al. (1987) relataram que cuidados devem ser tomados com relação ao período de tratamento, a concentração e volume desta solução sobre as monocamadas de células por causa de sua natureza tóxica. Além disso, em suas investigações verificaram que a replicação viral após o tratamento das culturas celulares com 300 mM de solução de D-glucosamina-HCl por 20 a 60 minutos resultaram num aumento

de até 30% nos números de células contendo o antígeno viral.

Registros na literatura mostram que para a replicação o CVS exige que as células alvos estejam em mitose. A síntese do DNA do CVS é dependente de enzimas celulares expressas durante a fase S do crescimento celular. A glucosamina facilita a entrada do genoma viral dentro do núcleo da célula hospedeira por desestabilizar a membrana do núcleo reproduzindo as condições naturais ocorridas no final da divisão celular (Tischer et al., 1987).

Neste estudo, as diluições dos soros testes adotadas foram a partir de 1:20. Constatou-se que empregando esse padrão a presença de coloração de fundo foi minimizada. Procedimentos similares foram feitos por outros pesquisadores. Mesu et al. (2000) iniciaram as diluições dos soros no teste de IPMC a partir da diluição 1:40. Dulac e Afshar (1989) usaram diluições dos soros nos testes de IF e IPMC a partir de 1:10 até 1:320, porém as células de linhagens PK15 utilizadas eram células persistentemente infectadas pelo CVS-1. Wellenberg et al. (2000) iniciaram as diluições dos soros a partir de 1:100.

A fixação da monocamada das células foi realizada após 48 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C, tempo suficiente para a monocamada celular alcançar 100% de confluência. Vários fixadores de células são descritos na literatura. Nesse estudo, o álcool etílico e a acetona foram usados nas proporções de 1:1 em virtude da qualidade dos resultados finais obtidos.

No presente estudo, utilizou-se o conjugado IgG de coelho ligado à peroxidase. Embora o conjugado convencional possua diluição recomendada pelo fabricante de 1:5000, foi necessário uma prévia avaliação do título atual e a padronização para 1:2.000. Esse fato pode ser devido à perda da atividade enzimática por armazenamento prolongado e a manipulação do produto.

A coloração padrão verificada nesta técnica foi marcada por intensa coloração nuclear

das células infectadas, conforme mostraram as figuras 1 e 2. Resultados similares foram encontrados por Allan e Ellis (2000).

O teste de IPMC aplicado nas 30 amostras de soros da granja em estudo (Tabela 1) apresentou os seguintes resultados: uma queda de anticorpos, provavelmente anticorpos passivos, desde 4 a 10 semanas, seguido de um aumento nos títulos de anticorpos até >24 semanas, provavelmente em consequência a uma resposta ativa. Os resultados indicaram uma provável infecção nas fases de 7 a 10 semanas com títulos aumentando a partir da 11<sup>a</sup> a 13 semanas. O perfil sorológico mostrado por essa granja está em concordância com os resultados de outras investigações sorológicas (Ladekjær-Mikkelsen et al., 2003).

Conclui-se como método sorológico, que o teste de IPMC não deve ser aplicado isoladamente para diagnosticar a síndrome no plantel e sim como auxílio para se conhecer o padrão da infecção pelo *Circovírus* no rebanho. O teste é sensível para a detecção dos anticorpos colostrais (passivos) e a demonstração de seu declínio até as 10 semanas de idade dos suínos, assim como resposta ativa à infecção natural, deve ter ocorrido entre 7 a 10 semanas de idade, com uma resposta ativa cujo pico se instalou entre 14 a 22 semanas de idade. Entretanto, falta a comparação com método sorológico "de ouro" já padronizado.

## Capítulo II

### ESTUDO DO PERFIL SOROLÓGICO PARA O *CIRCOVIRUS SUÍNO* TIPO 2 (CVS2) EM GRANJAS TECNIFICADAS PARA PRODUÇÃO COMERCIAL DE SUÍNOS.

#### RESUMO

Foi empregada a técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC) na demonstração de anticorpos para o *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2). A investigação sorológica foi conduzida em oito granjas de suínos destinadas à produção comercial de suínos. Na análise dos resultados foi constatado que a infecção pelo o CVS2 ocorreu em todas as granjas estudadas. Porém, os títulos de anticorpos e o número de animais positivos diferiram nas diferentes idades do sistema de produção revelando uma alta soropositividade nos animais amostrados.

**Palavras-chave:** Suíno (*Sus scrofa scrofa*), *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2), Sorologia, Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM), Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC)

#### ABSTRACT

The immunoperoxidase monolayer assay was used to detect type 2 porcine circovirus (PCV2) serum antibodies in pigs from eight commercial farms. The sera were diluted and incubated on monolayers of previously infected and fixed cells. Positive results were obtained in all tested farms indicating signs of PCV2 infection. However, seroconversion and serum titers differ depending on age and type of production system.

**Keywords:** Suine (*Sus scrofa scrofa*), Type 2 porcine *circovirus* (PCV2), Serology, Antibodies, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), Immunoperoxidase monolayer assay (IP)

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Refugagem Multissistêmica suína (SRM) associada ao *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2) tem sido reportada em vários países. O CVS2 não é um vírus novo nas criações de suínos, no entanto, é recente a sua caracterização (Magar et al., 2000; Rodríguez-Arriola et al., 2003). Foram identificados dois *Circovírus suínos* (CVSs), o *Circovírus suíno* tipo 1 (CVS-1) contaminante freqüente de culturas de células (Pig Kidney-PK15) que não causa sinais clínicos nos suínos e o CVS2, que tem sido associado a várias patologias suínas (Tischer et al., 1982; Segalés, 2004).

Desde 1991, quando a doença foi identificada pela primeira vez no Canadá, e durante os últimos oito anos, casos da SRM têm sido descritos em todo mundo. No Brasil, a doença foi identificada em 2000 e recentes comunicações mostram que ela já estava presente no país antes mesmo desta primeira descrição (Harding; Clark, 1997; Ciacci-Zanella et al., 2000).

A SRM afeta suínos principalmente entre 6 e 12 semanas de vida e raramente acomete os leitões em fase de aleitamento. A doença é caracterizada por emagrecimento progressivo, depressão, inapetência, dispnéia, taquipnéia, tosse, palidez da pele, diarreia, necrose de orelha, febre e morte (Harding, 1997; Segalés et al., 2002).

Estudos realizados em rebanhos afetados pela síndrome mostraram que a morbidade e a mortalidade variam dependendo do estágio do surto e o manejo dentro da unidade afetada. A taxa de morbidade é relativamente baixa entre 4 a 25%, enquanto a mortalidade pode alcançar índices de até 100% (Segalés et al., 2004).

O presente trabalho foi conduzido para investigar o perfil sorológico para o CVS2 em diferentes granjas tecnificadas destinadas à produção comercial de suínos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

As análises sorológicas foram realizadas nas dependências da Seção de Biologia do Laboratório Nacional Agropecuário/Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MG-MAPA), localizado em Pedro Leopoldo/MG.

### 2.2. GRANJAS E ANIMAIS

Foram estudadas oito granjas de sistema de produção confinado com ciclo completo sendo que quatro se encontravam localizadas nos Estados de Minas Gerais (MG), três em Santa Catarina (SC) e uma no Rio Grande do Sul (RS). Os reprodutores nas fases de gestação e lactação eram alojados em baias individuais. A ração oferecida aos animais era produzida na própria granja e a principal finalidade de todas era produzir animais para o abate. Os critérios adotados para realização da coleta do material sustentaram-se nos seguintes parâmetros:

A) Ter a permissão e o apoio do proprietário / veterinário / funcionário para a realização da coleta do material.

B) A granja ter no mínimo 300 matrizes e ciclo de produção completo.

C) Ser um rebanho de produção de suínos destinado ao abate.

O apoio técnico, em quatro das oito granjas caracterizava-se pelas visitas de médicos veterinários representantes de indústrias farmacêuticas, empresas ligadas a venda de reprodutores, de produtos de nutrição, ou seja, por profissionais não remunerados diretamente pelo proprietário da granja. Foram relatadas à presença de consultorias técnicas de caráter esporádico, efetuadas por médicos veterinários especialistas na área de suinocultura. Nas granjas estudadas que possuíam números de matrizes iguais ou superiores a 1.250 a assistência médica-veterinária era permanente.

### 2.3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS GRANJAS

As granjas foram identificadas de I até VIII. Nas granjas I, II, III, IV, VI e VII foram

realizadas necropsias e enviados materiais para IHQ. A Tabela 1 mostra as informações obtidas em cada granja e registradas em ficha de cadastro individual (ANEXO 01).

Tabela 1. Identificações e informações das oito granjas estudadas e dos animais necropsiados

Granja	Estado	Nº de matrizes	Índices de refugagem	Índices de mortalidade na granja	Outros sinais clínicos observados	Necropsia idade (dias)	Resultados da IHQ
I	SC	306	3 a 5%	1,5% a 2%	Diarréia na creche Distúrbios respiratórios.	NR/45	Neg.
II	SC	550	10 a 15%	>2,5%	Distúrbios respiratórios Diarréia na creche e terminação.	R/60 R/85	+ +
III	MG	470	2 a 5%	< 1%	Distúrbios respiratórios Diarréia na creche.	NR/78	+
IV	MG	4000	>10%	>2,5%	Distúrbios respiratórios;diarréia na terminação.	R/55 NR/62 †	+ +
* V	MG	340	2 a 5%	<1%	Distúrbios respiratórios	-	-
VI	SC	1250	>10%	> 2,5%	Distúrbios respiratórios, Diarréia, Alterações reprodutivas, necrose de orelha na fase de recria.	NR/66	+
#VII	RS	2200	10 a 15%	>2,5%	Distúrbios respiratórios, Diarréia, morte súbita em 22 animais na fase de recria	R/63	+
* VIII	MG	400	2 a 5%	< 1%	Diarréia na creche, Distúrbios respiratórios na creche e terminação Repetição de cio.	-	-

R = animal refugio

NR= animal não refugio

† = animal encontrado morto

\* = Não foi realizada a necropsia

# = casos esporádicos de epidermite exudativa

## 2.4. SOROS COLETADOS

A coleta de sangue foi realizada durante os meses de outubro de 2003 a julho de 2004. Foram coletadas 240 amostras de sangue sendo 30 de cada granja, provenientes de faixas etárias diferenciadas do ciclo de produção como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Idades dos animais e total de amostras de sangue coletadas em cada granja

Idade dos animais semanas	Números de amostras coletadas/granjas
2-3	5
4-6	5
7-10	5
11-13	5
14-22	5
>24	5
<b>Total</b>	<b>30</b>

## 2.5. ANÁLISE SOROLÓGICA

As 240 amostras de soros foram submetidas ao teste de IPMC como descrito no experimento da seção 2, capítulo I.

## 2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância a partir da média geométrica dos títulos de anticorpos após a transformação logarítmica ( $\log_2(\text{Tit}+1)$ ). As médias foram comparadas pelo teste de DUNCAN considerando-se  $P < 0,05$  como significativo Sampaio (1998).

## 3. RESULTADOS

Das 240 amostras de soros testadas 229 (95,41%) foram positivas com títulos que variaram de 20 até 10.240. Os títulos dos anticorpos foram demonstrados em granjas com e sem sinais clínicos sugestivos da SRM.

Além disso, os títulos foram encontrados em todas as faixas etárias do ciclo de produção. Os resultados sorológicos obtidos nas oito granjas estão detalhados na Figura 1, Tabela 3 e ANEXO 02

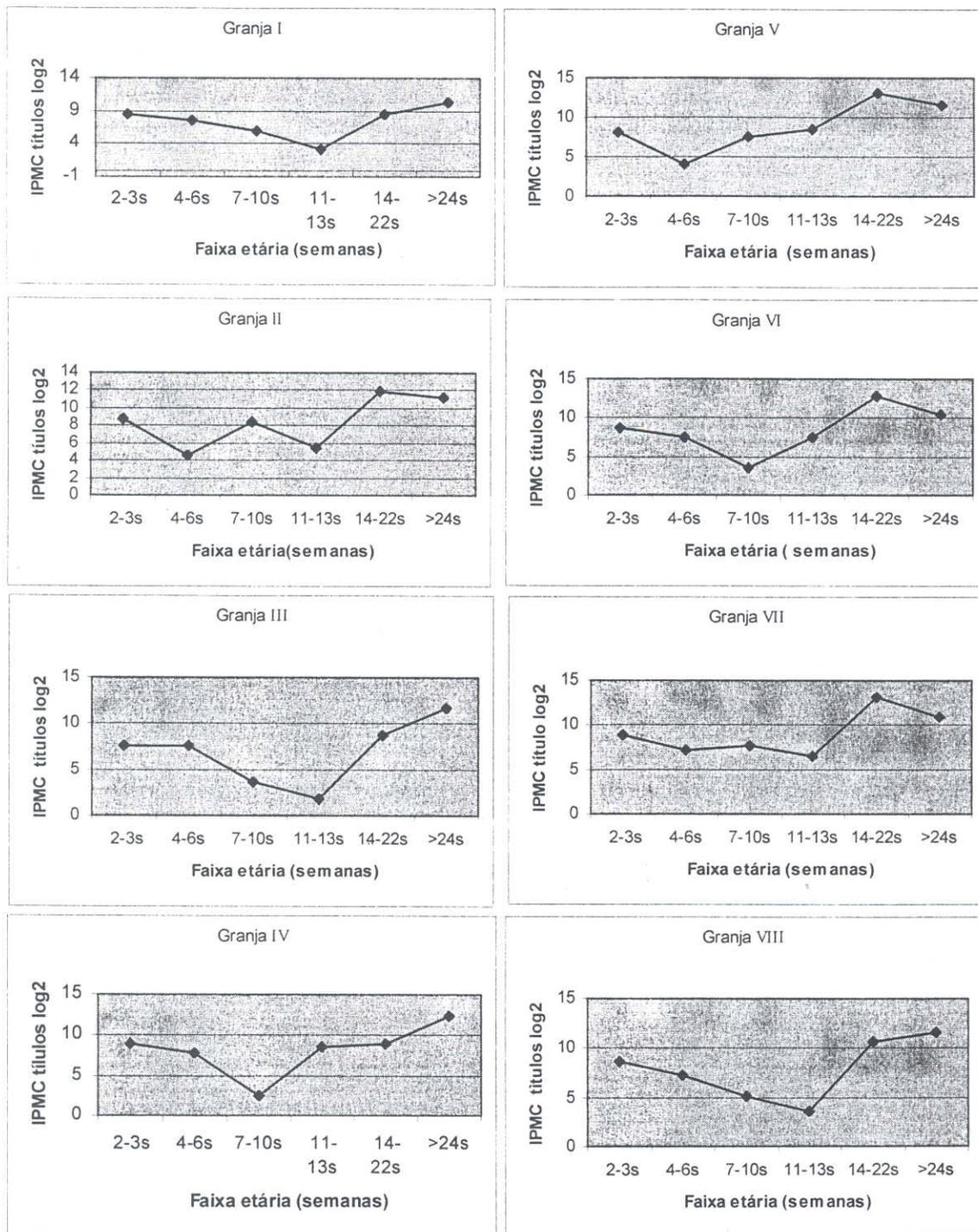


Figura 1. Perfil sorológico observado nas oito granjas estudadas mostrando a média geométrica dos títulos de anticorpos encontrados em cada faixa etária

Tabela 3. Percentagem de animais positivos para o *Circovirus suíno* tipo 2 usando o teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células em 240 amostras de soros de suínos provenientes de oito granjas comerciais de suínos

Identificação das granjas	% de positivos (Positivos/Total)
I	93,33% (28/30)
II	90,00% (27/30)
III	85,00% (25/30)
IV	100% (30/30)
V	100% (30/30)
VI	100% (30/30)
VII	100% (30/30)
VIII	96,66% (29/30)
Total	95,41% (229/240)

Na Tabela 4 estão os resultados da análise estatística que compara as médias de títulos obtidos em cada faixa etária. Não houve diferença estatística entre os títulos de anticorpos encontrados nos leitões com 2 a 3 semanas nas oito granjas estudadas. Nos animais com 4 a 6 semanas e acima de 24 semanas houve diferença estatística entre algumas granjas, porém os títulos foram mais homogêneos que os encontrados nos animais com 7 a 13 e 14 a 22 semanas.

Tabela 4. Média de títulos de anticorpos obtidos em cada faixa etária nas oito granjas estudadas

Faixa etária (semana)	Granjas estudadas							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
2 - 3	*8.53 <sup>A</sup>	8.73 <sup>A</sup>	7.53 <sup>A</sup>	8.93 <sup>A</sup>	8.13 <sup>A</sup>	8.73 <sup>A</sup>	8.96 <sup>A</sup>	8.73 <sup>A</sup>
4 - 6	▲7.53 <sup>A</sup>	4.60 <sup>B</sup>	7.53 <sup>A</sup>	7.53 <sup>A</sup>	4.00 <sup>B</sup>	7.53 <sup>A</sup>	7.14 <sup>A</sup>	7.71 <sup>A</sup>
7 - 10	5.95 <sup>ABC</sup>	4.60 <sup>BC</sup> IHQ +	3.61 <sup>BC</sup>	2.54 <sup>C</sup> IHQ +	7.53 <sup>AB</sup>	3.61 <sup>BC</sup> IHQ +	7.73 <sup>AB</sup> IHQ +	5.07 <sup>BC</sup>
11 - 13	3.21 <sup>CD</sup>	5.47 <sup>BCD</sup> IHQ +	1.76 <sup>DC</sup> IHQ +	8.53 <sup>ABC</sup>	8.53 <sup>AB</sup>	7.53 <sup>ABC</sup>	6.47 <sup>ABC</sup>	3.61 <sup>CD</sup>
14 - 22	8.53 <sup>BD</sup>	11.92 <sup>ABC</sup>	8.73 <sup>BBC</sup>	8.93 <sup>BBC</sup>	13.12 <sup>AB</sup>	12.92 <sup>AB</sup>	13.12 <sup>ABC</sup>	10.72 <sup>AB</sup>
>24	10.45 <sup>AB</sup>	11.12 <sup>AB</sup>	11.52 <sup>ABC</sup>	12.32 <sup>AD</sup>	11.52 <sup>ABC</sup>	10.52 <sup>ABC</sup>	10.92 <sup>AB</sup>	11.52 <sup>ABC</sup>

\* Média geométrica dos títulos de anticorpos após a transformação logarítmica ( $\log_2(\text{Tit} + 1)$ )

▲ Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas

IHQ+ Imunoistoquímica positiva

A definição da ocorrência da SRM em uma granja é tarefa difícil e deve conjugar pelo menos três fatores: o histórico clínico do plantel, presença de achados de necropsia e lesões histopatológicas com a demonstração do antígeno viral dentro das lesões. Em função do exposto, na Tabela 1, que descreve algumas características das granjas estudadas, observamos que as

granjas II, IV, VI e VII reúnem evidências de ocorrência da síndrome a saber: altos índices de refugagem (>10%), altos índices de mortalidade (>2,5%) e diagnóstico positivo para a IHQ em animais necropsiados juntamente com a presença de outros sinais clínicos compatíveis com a doença. Já as granjas I, III, V e VIII não

apresentaram o somatório dos três fatores citados anteriormente.

Baseado nestas observações as oito granjas estudadas foram agrupadas em suspeitas (II, IV, VI e VII) e não suspeitas (I, III, V, VIII) de possuírem a SRM. As médias dos títulos de anticorpos desses dois grupos

de granjas foram calculadas e os resultados estão representados na Figura 2 e Tabela 5.

Observa-se que apenas as médias dos títulos de anticorpos encontradas nas faixas etárias de 11 a 13 e 14 a 22 semanas foram estatisticamente diferentes.

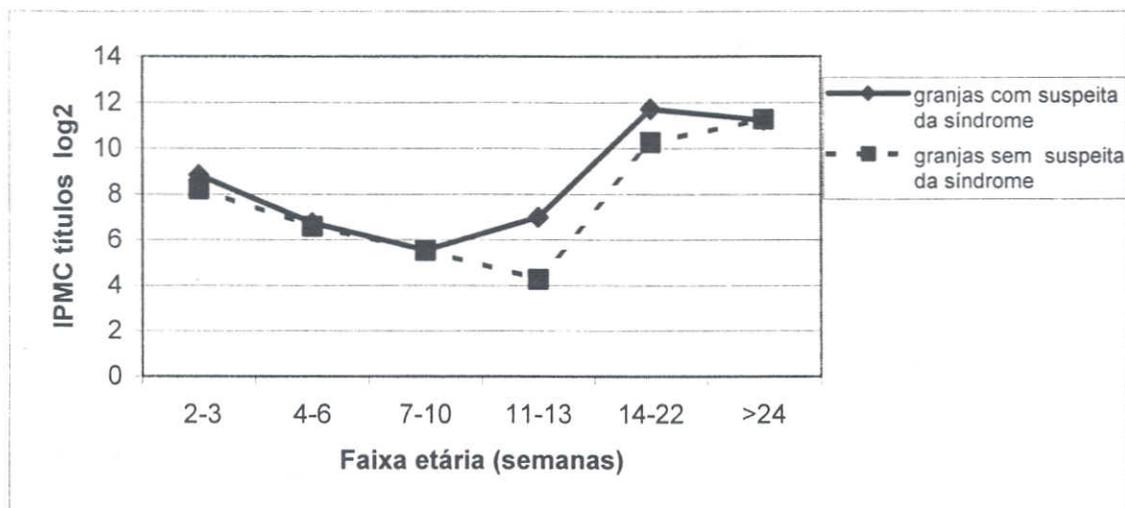


Figura 2 Representação das médias dos títulos de anticorpos nas granjas com e sem suspeita da Síndrome da Refugagem Multissistêmica

Tabela 5. Representação das médias geométricas dos títulos de anticorpos entre granjas suspeitas e não suspeitas da Síndrome da Refugagem Multissistêmica

Faixa etária (semanas)	Granjas com suspeita da síndrome de acordo com a tabela 1	Granjas sem suspeitada síndrome de acordo com a tabela 1
2-3	▲ 8,23 <sup>A</sup>	8,83 <sup>A</sup>
4-6	6,69 <sup>A</sup>	6,75 <sup>A</sup>
7-10	5,54 <sup>A</sup>	4,62 <sup>A</sup>
11-13	4,28 <sup>B</sup>	7,00 <sup>A</sup>
14-22	10,27 <sup>B</sup>	11,72 <sup>A</sup>
>24	11,25 <sup>A</sup>	11,22 <sup>A</sup>

▲ Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas.

#### 4. DISCUSSÃO

Em um sistema de produção de suínos existem formas variadas de manejo ao qual os animais são submetidos. Essas variações são nítidas principalmente na fase de recria. Embora os títulos de anticorpos nos leitões com 2 a 3 semanas sejam estatisticamente iguais nas oito granjas estudadas, observa-se que a queda destes anticorpos, provavelmente de origem materna e a nova elevação, ocorreu pelo contato com o vírus no ambiente e diferiu bastante entre as oito granjas (Fig.1).

Nas granjas identificadas como II, V, IV e VI os títulos de anticorpos atingiram o mínimo em leitões de 4 a 6 e de 7 a 10 semanas respectivamente. Porém, em mais de 50% das granjas estudadas, o título mínimo foi atingido na faixa de 11 a 13 semanas. Esta diferenciação na velocidade da queda de anticorpos passivos, provavelmente está relacionada com o nível de "desafio" viral no ambiente que, por sua vez, está associado às diferentes medidas de manejo adotadas pelas granjas.

Em sete das granjas analisadas seguiu-se ao título mínimo um aumento da resposta de anticorpos que cresceu de forma linear atingindo o máximo na faixa de 14 a 22 e animais com mais de 24 semanas. A fase em que ocorreu a soroconversão variou de granja para granja e este fato pode ter relação com a fase de aparecimento dos sinais clínicos. O perfil encontrado sugere que a exposição ao CVS2 ocorra por transmissão horizontal logo após a queda dos anticorpos passivos. Acredita-se que a manifestação da doença possa ocorrer com maior frequência na fase de crescimento, com a presença do animal refugio, que é a principal manifestação clínica da doença. Segalés e Domingo (2002) descreveram que a manifestação clínica da SRM ocorre principalmente por volta de oito semanas. É importante ressaltar que o leitão não vem refugio das outras fases de produção (maternidade e/ou creche), mas torna-se um refugio na fase de recria.

A soroconversão verificada pode estar relacionada com a transferência dos animais para uma nova unidade, exposição ao agente que circula na granja e falhas de manejo. Os títulos máximos foram observados em animais nas faixas de 14 a 22 e > de 24 semanas. Deve-se ressaltar, que a homogeneidade dos títulos na faixa de acima de 24 semanas pode estar relacionada a múltiplas exposições ao vírus durante o ciclo de produção, pois os títulos aumentaram proporcionalmente à idade.

As fases de crescimento e terminação, também chamadas respectivamente de recria e acabamento, são normalmente realizadas em instalações relativamente simples e com menor número de equipamentos destinados ao manejo dos leitões. Nessas fases, os animais já apresentam uma maior resistência aos microorganismos patogênicos, uma melhor digestibilidade aos alimentos, enfim, necessitam de menos cuidados, quando comparados com os leitões nas fases anteriores (creche e maternidade).

Muitas das práticas de manejo são realizadas de forma inadequada juntamente com a falta de programa de higiene, privações alimentares e desconforto ambiental. É importante garantir, nessa fase de criação, a implantação do vazio sanitário, instalações adequadas com salas arejadas, proteção dos leitões contra o calor e números de animais por baia compatível com a área disponível. Ressalta-se que não deve ocorrer mistura dos animais de diferentes origens, o manejo dos dejetos seja facilitado e que os leitões tenham um ambiente de conforto sem *stress*, obtendo-se um maior ganho de peso e melhor conversão alimentar.

Em virtude da fase de recria apresentar falhas de manejo a manifestação da doença e ou uma nova infecção tornam-se mais facilitadas. Acredita-se que possa ocorrer uma infecção ou mesmo uma reinfeção, nessa fase, com tendência a elevar os títulos de anticorpos que permanecem médios a altos até a fase adulta, conforme mostram a Figura 1.

Madec et al. (2000) sugeriram a participação de três fatores básicos que poderiam explicar a grande variabilidade nos números de animais acometidos pela SRM, dentro de um mesmo lote onde o vírus pode circular: efeito individual do suíno, efeito leitegada e manejo adotado na granja. Os fatores de riscos ligados a SRM desempenham papel fundamental na ocorrência e na severidade dessa enfermidade. Dentre eles o principal é a ausência do vazio sanitário entre as fases de produção. O CVS é um vírus pequeno, não envelopado e muito resistente à inativação por detergentes e desinfetantes, dificultando sua eliminação das instalações. Royer (2001) descreveu que o CVS2 é um vírus que sobrevive por muito tempo na matéria orgânica e as boas práticas de higiene e desinfecção seguida pelo vazio sanitário são prioritárias

Segundo Mesu et al. (2000) os fatores de manejo, alojamento e as interações de infecção concorrentes por vírus ou bactéria provavelmente são necessários para induzir aparecimento da SRM. Sabe-se que o desenvolvimento de uma doença multifatorial dentro de uma granja e o seu nível de intensidade não depende somente das características de virulência do agente em evidência, mas principalmente dos fatores de risco como fluxo de produção contínuo nas instalações e privações alimentares pós-desmame.

Neste trabalho demonstrou-se pela técnica de IPMC que a infecção pelo CVS2 ocorre sistematicamente em suínos. Os resultados encontrados foram próximos aos encontrados por Quintana et al. (2001) nos quais observaram que, mesmo a granja não apresentando a doença na forma clínica, a maioria dos animais se infecta com CVS2 ocorrendo soroconversão. Esse fato se consolida com as afirmações feitas por Madec et al. (2000); Rose et al. (2002); Larochelle et al. (2003); Harding (2004) em que a infecção pelo CVS2 não implica necessariamente no aparecimento da SRM no plantel e que o CVS2 está presente em plantéis afetados ou não pela síndrome. No entanto, Ladekjær et al. (2003) verificaram que em granjas com a SRM a

soroconversão ocorreu mais cedo quando comparado com granjas sem SRM.

Estudos realizados na França por Labarque et al. em 2001 constataram-se que 80% das granjas não apresentavam sinais clínicos para a SRM e eram sorologicamente positivas para o CVS2. Diversos estudos já relataram a elevada prevalência de anticorpos para o CVS2, em granjas de suínos sem histórico da SRM.

As pesquisas realizadas por Allan (1996), demonstraram que os anticorpos maternos contra o CVS desapareciam 8-9 semanas pós-nascimento e reapareciam 13 a 15 semanas indicando uma exposição ao agente entre 11 a 13 semanas de vida, indicando que a infecção pode ocorrer também nas fases de recria/terminação. A probabilidade de infecção pelo CVS na fase de recria é reforçada por Tischer et al. (1986) que verificaram a presença de anticorpos pra o CVS em 60% dos soros de animais de abatedouro pelo teste de IFI. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados em 3 a 6 semanas pós-infecção experimental pelo o CVS. Os autores concluíram que a infecção parece ocorrer na fase de recria e ou terminação, apesar de não terem sido observadas diferenças no padrão sorológico entre os animais que adoeceram e aqueles que apresentam a doença na forma subclínica.

Nos rebanhos estudados os resultados encontrados mostraram uma maior homogeneidade nos títulos de anticorpos nas faixas de 2 a 3 e > de 24 semanas. Acredita-se que nas granjas estudadas a infecção viral ocorra endemicamente e o contato do vírus com os animais pode ocorrer desde o nascimento, já que o vírus circula em toda a granja e possui uma alta resistência ao meio ambiente. No final da creche e recria associou-se à queda dos anticorpos passivos a situações estressantes acarretadas por falhas de manejo, que normalmente são diferenciados entre as granjas.

Larochelle et al. (2003) realizaram um estudo sorológico e virológico comparando cinco granjas com SRM e duas granjas sem

a SRM. Os autores concluíram que os títulos de anticorpos não influenciaram na ocorrência da doença uma vez que estes foram similares nos rebanhos com ou sem a síndrome. Embora tenha ocorrido, variações nos perfis sorológicos encontrados, observou-se que o título mínimo de anticorpos apresentou-se em animais de 11 a 13 e 19 a 23 semanas. Resultado este semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Porém, ao contrário dos autores acima citados, quando comparamos a média de títulos de anticorpos nas diferentes faixas etárias das granjas com e sem suspeita da SRM, observamos diferenças estatísticas nas idades de 11 a 13 e 14 a 22 semanas (Tab. 4 e Fig. 2). Observa-se que o perfil dos títulos de anticorpos se comporta de maneira muito similar até a faixa de 7 a 10 semanas, voltando-se a se igualar nos animais adultos acima de 24 semanas. Porém, nas granjas com suspeita da síndrome os títulos de anticorpos começaram a aumentar acerca de 11 semanas enquanto nas outras, sem suspeita da síndrome, este fato ocorreu a partir da 14<sup>a</sup> semana, indicando infecção precoce nas primeiras granjas. Ladekjær et al. (2003) também verificaram que em granjas com a SRM, a soroconversão ocorreu mais cedo quando comparado com granjas sem a SRM.

Os perfis das granjas com suspeita da SRM indicam que os animais provavelmente, se infectaram entre 8 a 10 semanas enquanto que as granjas sem suspeita os animais se infectaram entre 11 a 13.

Os animais necropsiados nas granjas I, II, III, IV, VI e VII apresentaram títulos de anticorpos que variaram de baixo a médio. Foi observado que os títulos baixos e médios relacionaram-se com ausência (-) ou fraca (+) marcação à presença de antígeno viral demonstrado pelo teste de IHQ dentro das lesões características da síndrome. Os animais necropsiados que apresentaram títulos altos portavam grande quantidade do antígeno viral demonstrado pelo teste de IHQ. Mesmo sendo um número pequeno de animais necropsiados, infere-se que os

valores de títulos médios a altos para o CVS2 podem coexistir com a presença dos sinais clínicos, lesões histopatológicas características e a presença do antígeno viral nos tecidos. Resultados similares foram encontrados por Rodríguez-Arriola et al. (2000) que compararam títulos de anticorpos para o CVS-1 e CVS2 em animais necropsiados com e sem sinais clínicos da SRM e verificaram que 64% das amostras de tecidos linfóides apresentavam altos títulos >5120 para o CVS2 além de terem sinais clínicos da SRM mostrando alta quantidade de ácido nucléico viral através do teste de HIS.

McNeilly et al. (1999) mostraram também uma relação entre a presença de lesões histopatológicas compatíveis à doença e uma grande quantidade de antígeno viral (CVS2) nas lesões, caracterizando-a na sua forma clínica. Meerts et al. (2003) verificaram uma correlação entre altos títulos de anticorpos para o CVS2, lesões histopatológicas características, alterações macroscópicas e sinais clínicos compatíveis a síndrome. Baixos títulos de anticorpos para o CVS2 não foram associados com a presença de lesões histopatológicas características da SRM.

Alguns trabalhos têm relatado estudos de vacinas contra o CVS2 para aplicação em granjas com a SRM. Observando a Figura 1 é importante salientar que a queda de anticorpos passivos variaram de granja para granja e por isto o estabelecimento da época ideal para se aplicar uma vacina contra o CVS2 poderia ser auxiliado pela análise do perfil sorológico da granja.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que existe um grande número de granjas apresentando infecção para o CVS2. Porém, somente o uso de técnica sorológica na demonstração do agente não pode ser o único instrumento para a confirmação da síndrome no rebanho. Os resultados refletem bem a variabilidade da circulação do vírus nas granjas estudadas. Isso reforça o fato de que a unidade de observação é o rebanho e não o animal individualmente. E a existência de diferentes perfis sorológicos e, provavelmente a

disseminação variada da infecção nos rebanhos avaliados, pode estar associada às características de imunidade, às condições ambientais e de manejo, que favorecem ou dificultam a eliminação do agente entre diferentes faixas etária dentro de um sistema de produção.

Este é o primeiro trabalho realizado no Brasil para indicar os perfis sorológicos em

diferentes rebanhos de suínos. A enfermidade permanece ainda como um grande desafio para os veterinários, produtores e técnicos do Brasil e do mundo inteiro. Ainda são registradas, com grande frequência, perdas econômicas bastantes significativas nos plantéis afetados pelo CVS2.

### Capítulo III

## DISTRIBUIÇÃO DE ANTICORPOS PARA *CIRCOVIRUS SUÍNO* TIPO 2 (CVS2) EM GRANJAS COMERCIAIS DE SUÍNOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

### RESUMO

Um levantamento sorológico foi conduzido objetivando estudar a presença de anticorpos para o *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2) em granjas de suínos localizadas no estado de Minas Gerais. O vírus parece ser comum nas populações de suínos do estado como indicado pela presença de anticorpos contra o CVS2 em 100% das granjas testadas através do teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC). Dos 955 soros analisados provenientes de 35 granjas comerciais, 935 (96,49%) reagiram para a presença do CVS2. Os valores dos títulos variavam entre 320 e 2560. Estudos realizados em vários países têm documentado uma alta prevalência de anticorpos para o CVS2.

**Palavras-chave:** Suíno (*Sus scrofa scrofa*), *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2), Sorologia, Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM), Minas Gerais, Brasil

### ABSTRACT

A serological survey was conducted aiming to the study the prevalence of type 2 porcine circovirus (PCV2) antibodies against in pig from farms in the Minas Gerais State. The infection seems to be widespread in swine populations in the State as indicated by the presence of antibodies detected immunoperoxidase assay in PK-15. Out of 955 analysed sera from the 35 commercial farms, 935 (96.39%) of animals had PCV2 specific antibodies reacted for the presence of PCV2. Titres ranged between 320 and 2560. Studies carried out in many countries have documented a high prevalence of antibodies for the PCV2 in finishing pigs, suggesting that this infection may be also widespread in Brazil.

**Keywords:** Swine (*Sus scrofa scrofa*), Type 2 porcine circovirus (PCV2), Serology, Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS), Minas Gerais, Brasil

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) é atualmente descrita como uma condição clínica que afeta suínos principalmente com idades de seis a 12 semanas. A enfermidade está associada ao *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2) Allan e Ellis (2000); Segalés e Mariano (2002).

O CVS é classificado pelo Comitê Internacional sobre Taxonomia Viral (ICTV) dentro da família *Circoviridae* que atualmente é composta por dois gêneros. O primeiro é o gênero *Circovírus* que inclui o *Circovírus suíno* tipo 1 (CVS1); *Circovírus suíno* tipo 2 (CVS2), o *Circovírus* do pombo (CoCV), *Circovírus* de gaivota, *Circovírus* de canário, *Circovírus* de ganso e o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (PBFDV). O outro é o vírus da anemia das galinhas e está incluído no gênero *Gyrovírus*. Uma característica comum dos vírus que pertencem à família *Circoviridae* é a associação com doenças que causam lesões em tecidos linfóides.

Na análise filogenética os CVS-1 e o CVS2 representam dois vírus diferentes. Após o seqüenciamento foi mostrando uma homologia de nucleotídeos de aproximadamente 75%. O tamanho do genoma do CVS-1 é de 1759 nucleotídeos enquanto que as diversas amostras isoladas do CVS2 mostram um genoma com 1767 ou 1768 nucleotídeos (Meehan et al., 1998; Mankertz et al., 2000).

A doença foi descrita pela primeira vez no Canadá em 1991 e os estudos sorológicos, usando os testes de imunofluorescência indireta (IFI), imunoperoxidase indireta em monocamada de células (IPMC) e ensaio imunoenzimático (Enzime Linked Immunosorbent Assay-ELISA) indicaram que os anticorpos para o CVS são muito comuns nas populações de suínos do mundo inteiro. Estima-se que eles estejam presentes em 80% dos soros investigados em granjas comerciais de todos os continentes. Registros mostram que a prevalência

sorológica pode alcançar índices de até 100% em animais de terminação (Tischer et al., 1995; Harding; Clark, 1997; Rodríguez-Arrijo et al., 2003).

No Brasil a doença foi primeiramente identificada no Estado de Santa Catarina e está sendo considerada emergente. No entanto, não existem estudos que indicam a real situação da doença no país, mas acredita-se que o CVS2 possa estar disseminada nas criações nacionais de suínos (Ciacci-Zanella et al., 2000).

O Brasil possui, atualmente, um rebanho de 32.304.905 milhões de suínos, o que lhe confere o 4º lugar na produção mundial. Em relação à produção de carnes posiciona-se em 5º lugar. O Estado de Minas Gerais contribui significativamente com essa produção, albergando granjas comerciais de animais destinadas ao abate e também granjas multiplicadoras de genética que abastecem uma grande parte do mercado brasileiro (ABIPECS). Em virtude de sua significativa participação no cenário da situação sanitária dos plantéis de Minas Gerais e traçar estratégias de controle.

Em função do exposto a proposta da pesquisa é de obter uma avaliação preliminar da distribuição de anticorpos para o CVS2 em granjas comerciais de suínos do Estado de Minas Gerais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ÁREA ESTUDADA

O estudo foi conduzido no estado de Minas Gerais e envolveu as principais regiões produtoras de suínos. A seleção da coleta de soros foi orientada por critérios de tecnologia e produção. Dentro de cada região a escolha das granjas foi realizada aleatoriamente compreendendo animais de 13 a 22 semanas de ambos os sexos. A Figura 1 mostra a distribuição das amostras de soros por municípios amostrados no estado de Minas Gerais.

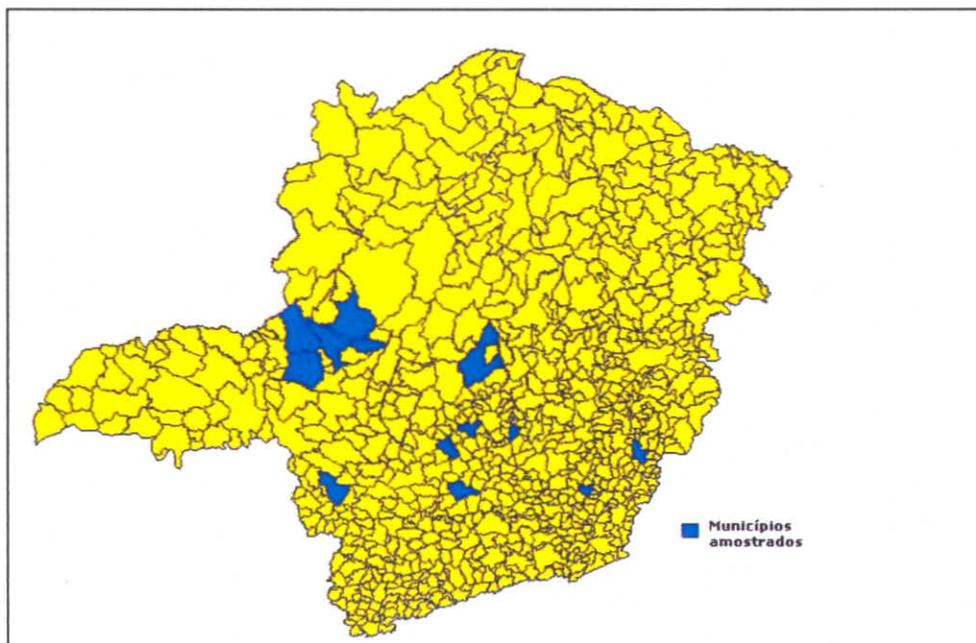


Figura 1. Estado de Minas Gerais destacando os municípios amostrados

## 2.2. REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

As análises sorológicas foram realizadas nas dependências da Seção de Biologia do Laboratório Nacional Agropecuário/Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MG-MAPA), localizado em Pedro Leopoldo/MG.

## 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência e o intervalo de confiança dos animais sorologicamente positivos foram calculados segundo Bennett et al. (1991). O intervalo de confiança da frequência das granjas soropositivas foi calculado pelo teste binominal exato (Sampaio, 1998).

## 2.4. SOROS ESTUDADOS

As amostras de soros foram provenientes de 955 suínos distribuídas em 35 granjas comerciais localizadas nos principais pólos representativos da produção suinícola do estado de Minas Gerais. A coleta dos soros foi realizada entre os períodos de novembro

de 2003 a dezembro de 2004. Todas as amostras de soros utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo o laboratório TECSA laboratórios.

## 2.5. ANÁLISE SOROLÓGICA

As 955 amostras de soros foram submetidas ao teste de IPMC como descrito no experimento da seção 2 do capítulo I.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados revelou uma frequência de 96,6% com intervalo de confiança de 95% de 94,7% a 98,6%. A frequência das granjas soropositivas foi de 100% com intervalo de confiança de 90% a 100%. Os títulos dos soros positivos variavam de 320 a 2560 que é considerado por Rodríguez-Arriola et al. (2000) um título médio. Os resultados das análises sorológicas nas 955 amostras de soros de suínos estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1 Títulos de anticorpos para o *Circovírus suíno* tipo 2 obtidos através do teste de Imunopexidase em Monocamada de Células em 955 amostras de soros de suínos provenientes de 35 granjas do estado de Minas Gerais

Municípios	N.º de Granjas	Total soros	Título						Frequência (%)	
			Neg.	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120		1/10240
Oliveira	3	29		3	10	12	4			100
		31			14	16	1			
		48		1	12	24	11			
Divinópolis	3	12			3	8	1			97
		11			9		2			
		13	1			3	9			
Patos de Minas	9	30			12	16	2			97
		32			11	14	7			
		30	4		13	7	6			
		29			4	16	9			
		27	1		6	9	11			
		30			14	16				
		47	2	4	21	13	7			
		14				6	8			
		32			10	16	6			
Patrocínio	6	22			5	11	6			95
		30			12	15	3			
		12	3	7		2				
		26			14	9	3			
		15			3	12				
		14	2	1	5	6				
Pará de Minas	4	30			9	21	0			97
		12	1			3	8			
		29	2		14	11	2			
		26		3	4	13	6			
Passos	1	13			3	10			100	
Curvelo	1	11			2	7	2		100	
Belo Horizonte	3	79	5	4	24	34	12			94
		41	3	8	6	17	7			
		39	1	5	3	21	9			
Presidente Olegário	1	30		1	11	18			100	
Manhuaçu	1	24			16	8			100	
Viçosa	2	30			4	7	19			87
		25	7	11	3		4			
Coromandel	1	32		2	17	12	1		100	
	35	955	32	50	294	413	166		97	

Os resultados mostram uma ampla distribuição da infecção pelo CVS2 no estado. Os números de amostras testadas foram muito superiores aos descritos nos outros países, confirmando que o agente encontra-se disseminado e a presença do vírus em 100% das granjas estudadas concorda com alta prevalência encontrada em granjas de outros países.

Vários trabalhos sorológicos realizados em países como Alemanha, Canadá, Estados Unidos, Espanha, Inglaterra e Irlanda do Norte, tem-se verificado uma alta prevalência para o CVS. No entanto, observa-se nessas comunicações, que o tamanho da amostra trabalhada muitas vezes é pequeno e os testes sorológicos empregados são diferentes. Soma-se ao fato de que a amostra viral empregada às vezes, não está bem definida. Além disso, os critérios de interpretação dos títulos de anticorpos encontrados também são variados. No entanto, com todas essas diferenças, os trabalhos têm em comum resultados mostrando alta prevalência para o agente viral nas populações de suínos analisadas.

No Canadá, Dulac e Afshar (1989) evidenciaram a presença de anticorpos para o *Circovirus* através dos testes de IFI e IPMC e concluíram que o *Circovirus* é comum em população de suínos com uma porcentagem de 80% de animais soropositivos. Hines e Lukert (1994), nos Estados Unidos, investigaram amostras de soros de suínos e verificaram que 53% das amostras estudadas apresentavam anticorpos para o CVS. No mesmo ano Alan (1996), na Irlanda identificou uma positividade para o CVS em 92% nas amostras de soros coletadas aleatoriamente. Edwards et al., 1994 na Inglaterra verificaram que 86% dos soros testados foram reagentes para o vírus, sendo que todos os rebanhos apresentavam pelo menos um animal positivo. Horner (1995), na Nova Zelândia, analisou 30 soros pelo o teste de IF e verificou que 22 foram positivos. Tischer et al. (1995), na Alemanha, evidenciaram a presença de anticorpos para o CVS em 75% dos soros de suínos provenientes de abatedouros.

Algumas pesquisas citam a existência de reação cruzada entre o CVS1 e o CVS2. Nos estudos de seqüenciamento os vírus mostraram uma homologia de nucleotídeos em torno de 76% (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998), justificando este fato.

Neste estudo acredita-se que os anticorpos demonstrados sejam contra o CVS2, pois no teste de IPMC empregado a monocamada de célula PK15, sabidamente livre de CVS1 foi previamente infectada pelo o CVS2. Além disso, a freqüência de animais e granjas positivas foi muito alta 96,6% e 100% respectivamente iguais aos encontrados em outros países. Resultados similares foram obtidos por Calsamiglia et al. (2002). Eles reportaram que o CVS2 circula mais em granjas de suínos (>50%) quando comparado com o CVS1 (<3%). Além disso, em casos da síndrome o CVS1 não tem sido identificado sozinho, e o CVS2, tem sido encontrado numa prevalência muito maior que do CVS1. No entanto, a sua participação em casos de campo não está ainda bem esclarecida. Os autores acreditam que como muitos testes sorológicos foram realizados utilizando monocamadas infectadas com o CVS1, a prevalência do CVS2 pode ter sido subestimada no passado.

Por outro lado, Mesu et al. (2000) na Bélgica, determinaram a soroprevalência através do teste de IPMC para o CVS1 e CVS2 em populações de suínos. Concluíram que as infecções pelo CVS1 levaram ao aparecimento de reações cruzadas para o CVS2. Porém, os títulos para o CVS2 foram quatro vezes maiores quando comparados com o CVS1. Foi constatado que a infecção com o CVS2 resultou em anticorpos que reagiram somente para o CVS2 e não houve reação para o CVS1. Nesses estudos, os anticorpos para o CVS1 e o CSV2 foram demonstrados respectivamente em 95% e 100% dos rebanhos afetados.

Rodríguez-Arroja et al. (2003) verificaram que dos 388 (72,7%) soros analisados através do teste de IPMC, 282 foram positivos para a presença de anticorpos

contra o CVS2. Em 2004, Barbosa et al., conduziram um estudo para a demonstração de anticorpos para o CVS2 pelo teste de IPMC em animais de abatedouros provenientes de municípios localizados no Estado de Minas Gerais. Dos 298 soros analisados, os anticorpos para o CVS2 foram encontrados em 157 (52,68%).

A presença do CVS2 em granjas do estado de Minas Gerais é reforçada pelas prévias descrições do agente em várias pesquisas já realizados em Minas Gerais e em outros estados brasileiros.

O primeiro registro da SRM e identificação do CVS2 foi feito por Ciacci-Zanella e colaboradores em 2000 na Embrapa Suínos e Aves. A partir daí a doença e a identificação do agente tem sido feita em vários locais do Brasil. Em Goiás já foram realizados diagnósticos confirmativos da SRM e identificação do agente viral por PCR (Sobestiansky et al., 2002). Em Minas Gerais realizaram-se isolamentos e identificação do agente viral por IPMC, PCR e IHQ (Pinto et al., 2003; Almeida, et al., 2004; Barbosa et al., 2004). Em São Paulo, Moreno et al. (2003) e reportaram associação entre o CVS2 e as doenças respiratórias no Brasil, além disso, foram

realizadas diferenciações entre amostras dos CVS1 e CVS2. No Rio Grande do Sul foram descritas lesões histopatológicas associadas a circovirose em suínos nas fases de crescimento e terminação por Pescador et al. (2003).

As granjas envolvidas neste estudo são comerciais, tecnificadas isto é, possuem um manejo em escala de produção, emprega uma genética melhorada, utiliza nutrição balanceada e cuidados especiais com programas sanitários. Elas são representativas da realidade nacional em termos de técnica e resultados zootécnico.

Através deste trabalho pode-se demonstrar, por meio do teste de IPMC a presença de anticorpos para o CVS2 em granjas comerciais de suínos nas diferentes mesorregiões do Estado de Minas Gerais como Triângulo Mineiro, Zona da Mata e Central Mineira. Os dados encontrados mostram que a infecção pelo CVS2 pode afetar a suinocultura comercial nos locais de produção mais intensa do Estado. Acredita-se que a infecção pode estar amplamente distribuída entre as populações de suínos de todo o estado confirmando os resultados encontrados em outros países.

## Capítulo IV

### PREVALÊNCIA DO *CIRCOVÍRUS SUÍNO* TIPO 2 (CVS2) EM JAVALIS (*SUS SCROFA SCROFA*) NO BRASIL EMPREGANDO A TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA DE CÉLULAS (IPMC)

#### RESUMO

O *Circovirus suíno tipo 2* (CVS2) é considerado o agente causador da Síndrome da Refugagem Multissistêmica (SRM) em suínos domésticos. A exposição ao vírus tem sido evidenciada através de pesquisas sorológicas em vários países. O presente trabalho mostra o primeiro estudo sorológico desenvolvido no Brasil para o CVS2 em javalis. Os soros de 1322 javalis provenientes de 119 criatórios, localizados em seis estados brasileiros foram testados através da técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC). Os resultados mostraram que 84,64% dos soros analisados foram positivos, estando o vírus presente em todas as granjas e em todos os estados analisados.

**Palavras-chave:** Javali (*Sus scrofa scrofa*), *Circovirus suíno* tipo 2 (CVS2), Sorologia; Brasil

#### ABSTRACT

The Type 2 porcine circovirus (PCV2) is the etiology of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in domestic pigs. Serological of PCV2 has been determined evidence through serological researches in various countries. This study presents the first serological study in Brazil of the PCV2 in wild boars. Sera of 1322 wild boars from 119 farms from 6 Brazilian states were tested using the immunoperoxidase monolayer assay on cells (IP). The results showed that 84,64% of the analyzed sera were positive. The virus was demonstrated by IP being found in all the farms and in all the analyzed states.

**Keywords:** Wild Boar (*Sus scrofa scrofa*), Type 2 porcine circovirus (PCV2), Serology, Brazil

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento na criação de animais silvestres com organização de criatórios específicos. A criação de javali (*Sus scrofa scrofa*), em especial, tem despertado grande interesse como alternativa para diversificação da atividade agropecuária, visando atingir o segmento do mercado de carnes de sabores exóticos.

No Brasil, as primeiras criações comerciais de javalis ocorreram no Estado do Rio Grande do Sul, em meados da década de 1980. No entanto, alguns criadores do Estado de São Paulo, descontentes com a qualidade do produto, importaram animais da França e do Canadá, proporcionando um grande avanço no melhoramento genético da espécie. A ocorrência de híbridos entre javalis e suínos é bastante comum, tanto na natureza como em cativeiro uma vez que o cruzamento entre estas subespécies gera indivíduos férteis.

Os javalis são criados em condições especiais, controladas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), através da portaria 102/98. Estão incluídos no Plano Nacional de Sanidade Suídea (PNSS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por serem importantes reservatórios de Peste Suína Clássica (PSC) sendo resistentes à doença clínica, mas podendo transmitir o vírus.

Pesquisas realizadas na Espanha mostraram uma soroprevalência de  $47,89 \pm 1,9\%$  para o CVS2 em javalis de diferentes regiões do país. E o primeiro caso da SRM em javalis de vida livre foi descrito na Alemanha, o que indica claramente que o animal é susceptível não somente a infecção pelo CVS2, mas também ao desenvolvimento da SRM (Sánchez et al., 2001; Vicente et al., 2004; Schulze et al., 2005).

A produção de javalis vem crescendo e está ganhando espaço no cenário da pecuária

brasileira. Em razão do aumento dos criatórios comerciais é necessário o conhecimento dos aspectos sanitários das criações de javalis nacionais.

O presente trabalho tem como objetivo pesquisar a presença de anticorpos para o CVS2 em soros de javalis provenientes de criatórios localizados em vários estados brasileiros.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS

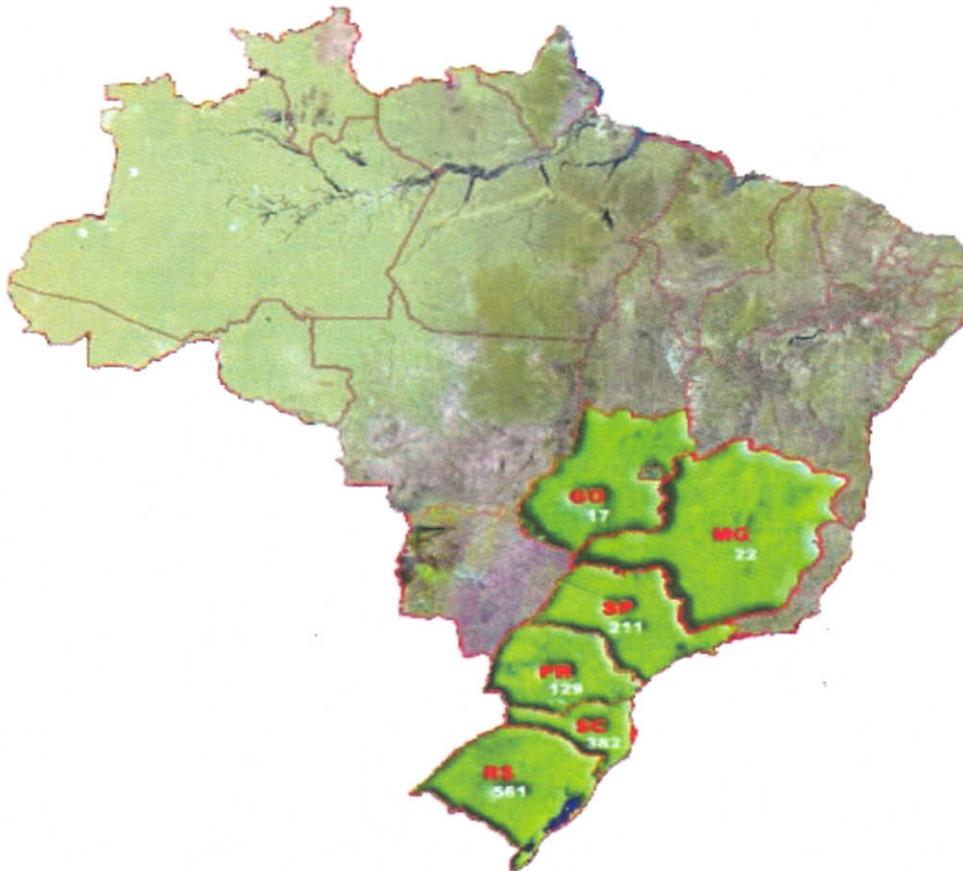
As amostras de soros de javalis foram cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário/Minas Gerais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MG-MAPA). Elas representam parte da amostragem do Inquérito Soroepidemiológico na Zona Livre de Peste Suína Clássica realizado em 2003 que foram amostradas segundo a Tabela 1. As informações obtidas por ocasião da coleta dos soros foram registradas em fichas conforme o mostra o ANEXO 02. A idade dos animais, em estudo, variou entre 30 a 56 meses.

Tabela 1. Total de matrizes amostradas por granjas ou criatórios de suídeos de acordo com o Inquérito Soroepidemiológico na Zona Livre de Peste Suína Clássica realizado em 2003.

Nº de matrizes Existentes na granja ou criatório	Nº de matrizes amostradas
Até 15	Todas
16-20	16
21-30	21
31-50	23
51-100	27
> 100	30

No caso específico dos criatórios de javalis, em função do número existente e do pouco conhecimento sobre os mesmos planejou-se no inquérito que todos os criatórios cadastrados fossem investigados. Porém, em virtude das dificuldades de contenções dos animais e pequenos números de animais existentes, vários criatórios

cadastrados não foram amostrados como observado na Tabela 2. Em relação aos animais estudados, especialmente por facilidade de manejo, as matrizes puderam ser substituídas por animais com mais de 80 dias de idade criados nas mesmas condições.



Fonte: IBGE/ 2003 com modificações

Figura 1. Mapa do Brasil mostrando a origem e os números de amostras de soros de javalis (*Sus scrofa scrofa*) analisadas pelo teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células

## 2.2. ANÁLISE SOROLÓGICA

As 1322 amostras de soros foram submetidas ao teste de IPMC como descrito no experimento do capítulo I, seção 2.

## 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência e o intervalo de confiança dos animais sorologicamente positivos foram calculados segundo Bennetti et al. 1991. O intervalo de confiança da prevalência dos criatórios soropositivos foi calculado pelo teste binominal segundo Sampaio (1998).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A criação de javalis no Brasil é uma prática que vem crescendo no cenário da pecuária nacional. A produção tem aumentado significativamente, mas poucos estudos relacionados à situação sanitária dos

criatórios nacionais têm sido realizados. A literatura relata vários trabalhos realizados em outros países envolvendo javalis confinados, semiconfinados e de vida livre. Esta investigação mostra o primeiro estudo realizado no Brasil, sobre circovirose em javalis.

Fernandez-de-Mera et al. (2003) descreveram que o CVS2 está presente em granjas de suínos afetadas e não afetadas pela SRM com uma prevalência de 100% em todo o mundo. Além disso, é conhecido que o *Sus scrofa* também é susceptível à infecção por agentes patogênicos entre eles o CVS2 (Laddomada et al., 2000; Albina et al., 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho estão descritos na Tabela 2. Observa-se que todos os criatórios estudados foram positivos para o CVS2.

Tabela 2. Resultados das análises sorológicas realizadas pelo teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células em 1322 soros de javalis (*Sus scrofa scrofa*) provenientes de 119 criatórios no ano de 2003

Estados	Criatórios cadastrados no Brasil	Total de Criatórios amostrados	Nº de soros analisados	Nº de animais positivo/negativo	Nº de soros positivos/total	% de animais positivos por estado
RS	45	45	561	486 /75	486 /561	(87%)
SC	49	43	382	382/ 41	382/ 382	(89%)
SP	45	14	211	174/ 37	174/ 211	(79%)
PR	17	11	129	110/19	110/129	(85%)
MG	7	5	22	18/ 4	18/ 22	(82%)
GO	1	1	17	17/ 0	17/ 17	(100%)
<b>Total</b>	<b>164</b>	<b>119</b>	<b>1322</b>	<b>1146/176</b>	<b>1146/1322</b>	<b>84,64 %</b>

A prevalência calculada de animais positivos foi de 84,9% com uma variação de 82,1% a 87,8% e intervalo de confiança de 95% A prevalência de granjas de javalis foi de 100,0% com intervalo de confiança de 96,95% a 100,00 %. A alta prevalência

encontrada nos diferentes estados envolvidos no estudo, sugere que a infecção pelo CVS2 em javalis do Brasil é endêmica. A Tabela 3 mostra a prevalência encontrada para os diferentes estados analisados.

Tabela 3. Prevalência e intervalo de confiança encontrados para os soros de javalis (*Sus scrofa scrofa*) analisados pelo teste de Imunoperoxidase em Monocamada de Células

Local	Prevalência	*IC 95%	
		mínimo	máximo
RS	86,45	82,09	90,81
SP	82,46	75,99	88,94
PR	68,22	59,73	76,71
SC	89,53	84,14	94,92
MG	81,82	54,09	100,00

\* Intervalo de confiança

Vicente et al.(2004), realizaram um estudo epidemiológico empregando o teste de IPMC, em 656 amostras de soros de javalis provenientes de 45 localidades da Espanha e em 22 amostras de soros de animais importados. A soropositividade foi demonstrada em animais de todos os locais analisados. A prevalência para os títulos que variavam de médios a altos foi de  $47,89 \pm 1,9\%$ . Além disso, o ácido nucléico foi demonstrado pelo teste de HIS em amostras de tecidos provenientes de três javalis, sendo que um animal foi diagnosticado positivo a SRM. Eles concluíram que a prevalência e os altos títulos estavam relacionados com o manejo das populações de javalis. Animais criados intensivamente deram títulos maiores que os animais criados em condições naturais. Segalés et al. (2002) descreveram que considerando a distribuição comum do CVS2 entre a população de suínos domésticos e os conhecidos fatores de riscos para a SRM nestes animais, como precárias condições de higiene, superlotação e mistura de animais de diferentes idades e origens, podem interferir na soroprevalência do agente no rebanho.

Neste trabalho as informações relacionadas com prática de manejo, sanidade e instalações não estavam disponíveis para os criatórios de javalis estudados. Porém a alta prevalência encontrada tanto com relação aos animais e aos números de criatórios positivos sugere que o sistema de criação adotado permite a manutenção, transmissão e circulação do agente de

forma semelhante às condições encontradas nas granjas de suínos.

Conhecimentos sobre a epidemiologia do CVS2, em particular a importância da síndrome como fator de mortalidade nos javalis, devem levar ao desenvolvimento de estudos futuros para se conhecer a real importância da SRM nos animais e os prejuízos que ela possa trazer aos criatórios nacionais.

## CONCLUSÕES DA SEÇÃO 2

O teste de IPMC específico para o CVS2 pode ser aplicado para avaliação sorológica em rebanhos de suídeos.

A IPMC permite conhecer a dinâmica da infecção viral por CVS2, embora para o diagnóstico definitivo seja necessária a demonstração do CVS2 com técnicas para detecção do antígeno ou genoma como IHQ ou PCR, HIS respectivamente.

As investigações sorológicas para o CVS2 em suínos indicaram presença de anticorpos em diferentes fases de produção em rebanhos suspeitos e não suspeitos da SRM.

O CVS2 está presente em granjas de suínos do estado de Minas Gerais.

A infecção pelo CVS2 é comum nos criatórios de javalis do Brasil.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

ALBINA, E.; MESPLEDE, A.; CHENUT, G.; LE POTIER, M.F.; BOURBAO, G.; LE GAL, S.; LEFORBAN, Y. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. **Vet. Microbiol.**, v.77, p.43-57, 2000.

ALMEIDA, M. R. S.; JUNIOR, A.; CASTRO, L.A.; ALMEIDA, S. R.; MONNERAT, F.S.; OLIVEIRA, F.S.; MORAES, M. P. Porcine circoviruses vírus. **Rev. Res.**, v.9, p.32-42, 2004.

ALLAN, G. M.; MCNULTY, M. S.; BRYSON, D. Demonstration of bovine virus diarrhea virus antigen in formalin fixed paraffin embedded tissue using a streptavidin/ biotin technique. **Res. Vet. Sci.**, v.46, p. 416-418, 1989.

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Some biological and physicochemical properties of porcine circovirus. **J. Vet.**, v. 41(Med. B), p.17-26, 1994.

ALLAN, G.M. Porcine Circovirus: epidemiology and patogenesis. **Pig J.**, v.37, p.14-19, 1996.

ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: A review. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.12, p.3-14, 2000.

BALALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSSEL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs affected with post-weaning multisystemic wasting Syndrome. **J. Comp. Pathol.**, v.121, p.139-148, 1999.

BARBOSA, C.N.; LOBATO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; NAKAJIMA, M.; GUEDES, R. M. Padronização da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para detecção do *Circovirus suíno 2* (CVS-2) em cortes histológicos. In CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 4º CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO MERCOSUL. In. Foz do Iguaçu-PR-Brasil. 2004.p.447.

BARBOSA, C.N.; LOBATO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; NAKAJIMA, M.; CAVALCANTI, J.E. Evidência de anticorpos contra *Circovirus suíno 2* em animais de abatedouros do Estado de Minas Gerais. Congresso Latino Americano de Suinocultura, 4º congresso de suinocultura do mercosul. Foz do Iguaçu - PR - Brasil. 2004.p.444.

BENNET, S.; WOODS, T.; LIYANAGE, W.M. et al. A simplified general method for cluster surveys of health in developing countries. **Rapp. Trimest. Statist.Sanit. Mond.**, v.44, p.98-106, 1991.

CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; QUINTANA, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; Detection of Porcine Circovirus Type 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. **J. Comp. Pathol.**, v. 40, p.1848-1850. 2002.

CLARK, E. G. Post weaning multisystemic wasting syndrome. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners, v. 28, p. 499-501, 1997.

CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J.; DOMÍNGUEZ, J.; DOMINGO, M. Immunohistochemical characterisation of PCV2 associated lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 82, p.245-255, 2001.

- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: Congreso Mercosur De Producción Porcina, Buenos Aires, 2000.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N. Diagnosis of post weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brasil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 522-527, 2003.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; ASCOLI, K.; SIMON, N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S.R.; KRAMER, B. Porcine circovirus type 2 (PCV): A pathogenic emerging disease virus identified in archived tissues from Brazilian Swine herds. CONGRESSO DE VIROLOGIA, 2004, São Paulo, SP. p.99.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. post weaning multisystemic wasting syndrome in syndrome caused *Porcine circovirus 2*: an immune riddle. **Arch Virol.**, v. 149, p. 857-874, 2004.
- DULAC, G.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC-CCL 33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v. 53, p.431-433, 1989.
- ELLIS, J. A.; HASSARD, L.; CLARK, E. G. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Can. Vet. J.**, v.39, p.44-51, 1998.
- ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANISCH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 11, p. 3-14, 1999.
- ELLIS, J.; HAINES, D. M.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Virol. Meth.**, v.80, p.123-128, 1999.
- EDWARDS, S.; SANDS, J. J. Evidence of circovirus infection in British pigs. **Vet. Rec.**, v.134, p. 680-681, 1994.
- FERNANDEZ-DE-MERA, I.; GORTÁZAR, C.; VICENTE, J.; HÖFLE, U.; FIRRO, Y. Wild boar helminths: risks in animal translocations. **Vet. Parasitol.**, v.115, p.335-441, 2003.
- GILPIN D.F.; McCULLOUGH K.; MEEHAN, B. M.; McNEILLY F.; McNAIR I. STEVENSON, I.S.; FOSTER J. C.; ELLIS, J. A., KRAKOWKA, S., ADAIR, B. M., ALLAN, G. M. Presense of porcine circovirus type 2 antigen monocytic cells is not indicative of productive infection. **Immunol Immunopathol.**, (in press) 2003.
- GIMENO, E.J. Fundamentos de imunoistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: Encontros Nacional de Patologia Veterinária, 7, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG/UFV/CBP Ap., 17-51, 1995.
- HAINES, D. M.; CLARK, E. G.; DUBOVI, E. J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Vet. Pathol.**, v. 29, p.27-32, 1992.
- HAMEL, A.L.; LIHUA, L.L.; NAYAR, G.P.S. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **J. Virol.**, v.72, p.5262-5267, 1998.

- HARDING, J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings, in: Proceedings of the Annual Meeting of the Western Canadian Association of Swine Practitioners. p. 21, 1996.
- HARDING, J. C.; CLARK, E. G. Recognizing and diagnosing Postweaning Multisystemic Wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, v. 5, p.201-203, 1997.
- HARDING, J.C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Vet. Microbiol.** v.98(2), p.131-5, 2004.
- HINES, R.K., LUKERT P.D. Porcine circoviruses as a cause of congenital tremors in newborn pigs. In: Proceedings American Association Swine Practitioners: v.28, p.344-345, 1994.
- HORNER, G.W. Pig antibodies present in New Zealand pigs. **Surveillance.** v.18, p.32,1995.
- KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **J. Comp Pathol.** v. 128, p.52-59, 2003.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; MCNEILLY, F.; GILPIN, D.; MEEHAN, B.; McCULLOUGH, K.; ALLAN, G. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infections. **Viral Immunol.**, v. 15, p. 567-582, 2002.
- LABARQUE, G.G.; NAUWYNCK, H.J.; MESU, A. P.; PENSAERT, M. B. Seroprevalence of porcine circovirus type 1 and 2 the Belgian pig population. **Vet. Q.**, v. 22, p.234-236, 2001.
- LADEKJÆR-MIKKELSEN, A-S.; BØTNER, A.; NIELSEN, J.; HASSING, A-G.; BAEKBO, P. Serological profiles in Danish PMWS case and control herds. 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases—Rome June 2003 p. 184-185.
- LADOMADA, A., Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. **vet. Microbiol.**, v.73 p.121-130, 2000.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. comparative serological and virological study of herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases—Rome June 2003 p. 336.
- LIU, Q.; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L. A. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.3474–3477, 2000.
- LUKERT, P. D.; DE BOER, G. F.; DALE, J. L.; KEESE, P.; MCNULTY, M. S.; RANDLES, J. W.; TISCHER, I. Family Circoviridae. In: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. New York : Sixth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses, p. 166-168, 1995.
- LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institutes of Pathology. 3 ed., New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1968, 260p.
- MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C.; MABÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs France: Clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Prod.Sci.** v.63, p.223-233, 2000.
- MAGAR, R; MÜLLER, P; LAROCHELLE, R. Retrospective serologic a survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. **Can J Vet Res.**, v.64, p.184–186, 2000.

- MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. **J. Comp. Pathol.**, v.123, p.258-26, 2000.
- MANKERTZ, A.; DOMINGO, M.; FOLCH, J. M.; LeCann, P.; JESTIN, A.; SEGALÉS, J.; CHMIELEWIEZ, B.; PLANA-DURÁN, J.; SOIKE, D. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. **Virus Res.**, v.66, p.65-77, 2000.
- McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.M.; FOSTER, J. C.; CALRKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Virol. Meth.**, v.80, p.123-128, 1999.
- MEERTS, P.; SANCHEZ JR, R.; MATEUSEN, B.; NAUWYNCK, H.; PENSAERT, M. Prevalence of PMWS in suspected and non-suspected Belgian farms. 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases – Rome June, 2003 p. 232.
- MEEHAN, B.M.; MCNEILLY, F.; TODD, D. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **J. Gen. Virol.**, v.79, p.2171-2179, 1998.
- MESU, A.P.; LABARQUE, G.G.; NAUWYNCK, H.J.; PENSAERT, M.B. Seroprevalence of porcine circovirus type 1 and 2 in the Belgian pig population. **Vet. Q.**, v.22, p.243-236. 2000.
- MORENO, A. M.; CASTRO, A. M. M. G.; PAIXÃO, R.; CORTEZ, A. et al. Associação entre *Circovirus suíno* tipo 2 e as doenças respiratórias no Brasil. In: X1 CONGRESSO ABRAVES, 2003, Goiânia, GO. Anais... ABRAVES, 2003. p.101.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.; HALBUR, P.; MORGAN, M.; YOON, K.; PAUL, P. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.2535-2541, 1999.
- NOTEBORN, M.H. M. Chicken anemia virus induced apoptosis: Underlying molecular mechanism. Proc ssDNA Viruses of Plants, Bird, Pigs and Primatas. **St. Malo, Fr.**, v.24, p.20-22, 2001.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; et al. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Vet. Pathol.**, v.37, p.254-263, 2000.
- KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **J. comp. Pathol.**, v. 128, p.52-59, 2003.
- PASICK, J. Porcine circovirus and Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome – Possible New Links. **The veterinary journal**, v.164, p. 171-172, 2002.
- PESCADOR, C. A.; RÖZZA, D. B.; ZŁOWSKI, P.; BOWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.; DRIEMEIER, D. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (ABRAVES) X1, 2003, Goiânia. Anais. Goiânia, 2003 p.105.
- PINTO, F.F.; LOBATO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; ROCHA, M.A.; BARBOSA, CN. Detecção do Circovirus suíno tipo 2 ( PCV) em tecidos coletados de suínos do Estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (ABRAVES) X1, 2003, Goiânia. Anais. Goiânia, 2003. p.109

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; CHIANNI, F.; FOLCH, J. M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Vet. Rec.**, v.149, p.357-361, 2001.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALÉS, J.; BALASCH, M.; ROSELL, C.; QUINTANA, J.; FOLCH, J. M.; PLANA-DURÁN, J.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 (PCV1) and type 2 (PCV2) in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Rec.**, v.146, p.762-764, 2000.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; ROVIRA, A.; PUJOLS, J.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. **J. Vet. Med. B Infect Dis Vet Public Health**, v50, p.99-101, 2003.

ROYER, R.L. Susceptibility of Porcine Circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. **J. swine Health Prod.**, v.9 (5), p.281-284, 2001.

ROSE, N.; BLANCHARD, P.; LAUROUR, G.; LE DIGUERHER G.; EVENO, E.; JOLLY, J.P.; OGER, A.; LE, DIMMA, M.; JESTIN, A.; MADEC, F. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in France: serological profiles of affected versus non-affected herds and preliminary analytical epidemiology, **Pig J.**, v.50, p.124-134, 2002.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; LATIMER, K.S.; DOMINGO, M. Pathological, Immunohistochemical, and In-situ Hybridization Studies of Natural cases of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in Pigs. **J. Comp. Path.**, v.120, p.59-78, 1999.

SAMPAIO, IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SÁNCHEZ R., NAUWYNCK H., PENSAERT M., Serological survey of porcine circovirus 2 antibodies in domestic and feral pig populations in Belgium, in: Proceedings of the European Society of Veterinary Virology, **St. Malo, France**. p. 122, 2001.

Schulze C.; Segalés J.; Neumann G.; Hlinak A.; Calsamiglia M.; Domingo M. Postweaning multisystemic wasting syndrome in the European wild boar (*Sus scrofa*) in Germany, **vet. Rec.** (in press).

SEGALÉS, J.; DOMINGO M., Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Vet. Q.**, v .24 ,p.109-124, 2002.

SEGALÉS, J. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics, **J. Swine Health Prod.**, v. 10, p.277-281, 2002.

SEGALÉS, J., MARCO I., CALSAMIGLIA M., RODRÍGUEZ-ARRIOJA G.M., LAVIN S., PLANA-DURÁN J., DOMINGO M., Evidence of porcine circovirus type 2 infection in wild boar (*Sus scrofa*) in Spain, in: Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Ames, USA, 2002, p. 397.

SEGALÉS, J., ROSELL, C AND DOMINGO M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet. Microbial.**, v:98, p.137-149, 2004.

SOBESTIANSKY, Y.; BARBARINO JR. P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. Circovirose Suína e Circovírus suínos. Sanidade em Foco.Goiânia. Pfizer. 2002.

- SORDEN, S. D.; HARMS, P.A.; NAWAGITGUL, P.; CAVANAUGH, D.; PAUL P.S. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 circovirus in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. **J.vet. diagn. Invest.**, v.11, p. 528-530, 1999.
- SORDEN, S. D., Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. **Swine Health Prod.**, v.8, p.133-136, 2000.
- TISCHER, I., GALDERBLUM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**. v. 295, p. 64-65, 1982.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Arch. Virol.**, v.91, p.271-276, 1986.
- TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Arch Virol.**, v. 96, p. 39-57, 1987.
- TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D.; POCIULI, S.; GERMANN, B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. **Arch. Virol.**, v.140, p.737-743, 1995.
- TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Path.**, v. 29, p.373-394, 2000.
- WALKER, I.W.; KONOBY, C.A.; JEWHRST, V.A. Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.12 p.400-405, 2000.
- WATTRANG, E.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF herd. **Vet Microbiol.**, v. 86, p.281-284, 2002.
- WELLENBERG, G. J.; PESCH, S.; BERNDSEN, F.W.; STEVERINK, P.J.G.M.; HUNNEMAN, W. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of postweaning multisystemic wasting syndrome in Netherlands. **Vet Q.**, v. 22, p.167-172, 2000.
- WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALLAN, G.M.; HAINES, D.M.; CLARK, E.G. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 11, p.530-532, 1999.
- VINCENT, I., CARRASCO, C., HERRMANN, B. Dendritic cells harbour porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. **J.Virol.**, v. 77, p.13288-13300, 2003.
- VICENTE, J., SEGALÉS, J., HOFLE, U., BALSCH, M., PLANA-DURAN, J., DOMINGO, M., GORTÁZAR, C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PVC 2) infection in the wild boar (*Sus scrofa*). **Vet. Res.**, v.35, p.243-253, 2004.

ANEXO 01

FICHA DE CADASTRO DAS GRANJAS DE SUÍNOS

1. Produtor \_\_\_\_\_ Fone \_\_\_\_\_  
2. Nome da propriedade \_\_\_\_\_  
Município \_\_\_\_\_ Localidade \_\_\_\_\_  
3. End. (corresp.) \_\_\_\_\_ Município \_\_\_\_\_

4. Perfil da criação:

4.a- Rebanho: tipo carne  tipo banha (caipira)   
4.b- Nº de animais: matrizes \_\_\_\_\_ varrões \_\_\_\_\_ total \_\_\_\_\_  
4.c- Sistema: confinado  solto   
4.d- Ciclo: completo  só leitões  recria/terminação   
4.e- Manejo: tudo dentro tudo fora  contínuo   
4.f- Destino dos dejetos: rio/córrego  lagoa de decantação  outros   
4.g- Suinocultura vizinha: sim  não  caipira  tecnicada   
4.h- Controla a entrada de pessoas: sim  não   
4.i- Vendas: no município  outro município \_\_\_\_\_ outro estado \_\_\_\_\_  
4.j- Compra de reprodutor(as): Município: \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

**5. Índices de mortalidade:** (os índices serão obtidos pela divisão do número de leitões mortos de cada item sobre o número de nascidos vivos, desmamados, transferidos da creche e etc... x 100)

**5.a- Leitões mumificados-** Até 1%  entre 1 e 2%  maior que 2%

**5.b- Leitões natimortos-** Até 5%  entre 5 e 7%  maior que 7%

**5.c- Mortes até a desmama-** Até 5%  entre 5 e 10%  maior que 10%

**5.d- Mortalidade na creche-** Até 1,5%  entre 1,5 e 2,5%  maior que 2,5%

**5.e- Mortes na recria/terminação-** Até 1,5%  entre 1,5 e 2,5%  maior que 2,5%

**5.f- Mortalidade de matrizes-** Menor que 5%  maior que 5%

**6. Índices de produção:**

**6.a- Intervalo médio entre desmama e cio-** Até 7 dias  maior que 7 dias

O dia do desmame será o dia zero. O valor será tomado pela média de dias entre a desmama e a cobertura de todas as fêmeas em reprodução.

**6.b- Percentual de repetição de cio-** Até 6%  entre 6-12%  maior que 12%

Será o produto do número de fêmeas confirmadas sobre o número de fêmeas cobertas multiplicado por 100.

**6.c- Percentual de abortos-** Até 1,5%  de 1,5 a 2,5%  maior que 2,5%

Será o produto do número de porcas que produziram fetos não viáveis até 24h após a parição (da cobertura ao 109º dia de gestação) multiplicado por 100.

**6.d- Média de leitões nascidos vivos / porca / ano-** até 18  de 18 a 20   
mais de 20

Será dado pelo número total de leitões nascidos no ano sobre o número total de fêmeas do plantel reprodutivo.

**6.e- Média de leitões desmamados / porca / ano-** até 16  de 16 a 18   
mais de 18

Será calculado como o item anterior utilizando-se os valores de leitões desmamados.

**6.f- Nº de partos / porca / ano-** Maior que 2,2  entre 2 e 2,2  menor que 2

Será dado pela resultante do número total de partos, divididos pelo número de porcas do plantel reprodutivo.

**6.g- Idade média ao desmame-** Até 21 dias  entre 21 e 28 dias  acima de 28 dias

Será dado pelo número médio de dias que a leitegada é desmamada.

**6.h- Idade média de abate-** Até 145  entre 145 e 155  maior que 155

É a idade média em dias que os suínos são comercializados.

**6.i- Peso médio de abate-** Até 90Kg  entre 90 e 100Kg  mais de 100 Kg

Será dado pelo peso médio na comercialização em Kg.

**6.j- Taxa de desfrute do plantel- (=taxa de abate + taxa de crescimento) \_\_\_\_\_ %**

(Nos rebanhos estabilizados a taxa de desfrute é a taxa de abate)

**EXEMPLO:** Uma granja tem hoje 200 animais, no ano anterior possuía 180 animais. Se neste ano, ela abateu 300 animais, a sua taxa de crescimento foi =  $200 - 180 / 180 \times 100 = 11,10\%$  e sua taxa de abate foi =  $300/200 \times 100 = 150\%$ . Portanto seu desfrute foi =  $150 + 11,10 = 161,10\%$

	Sinais Clínicos	Observações
Emagrecimento progressivo		
Taquipnéia		
Dispnéia		
Palidez da pele		
Icterícia		
Outros		

Material coletado na necrópsia	Alterações macroscópicas	Observações
Linfonodo inguinal		
Linfonodo submandibular		
Pulmão		
Linfonodo mediastino		
Coração		
Fígado		
Baço		
Rim		
Glândula adrenal		
Estômago		
Intestino		
➤ colo		
➤ jejuno		
➤ íleo		
Linfonodo mesentérico		

Material coletado para histologia	Resultados histopatológicos	Imunoistoquímica
Linfonodo inguinal		
Linfonodo submandibular		
Linfonodo mediastino		
Pulmão		
Coração		
Fígado		
Baço		
Rim		
Intestino		
➤ colo		
➤ jejuno		
➤ íleo		

Material coletado para sorologia
Sangue

<b>Responsável pelo preenchimento:</b> Nome _____ Função: _____ Data ____/____/____ Assinatura _____
--

**ANEXO 02**  
**TÍTULOS DE ANTICORPOS ENCONTRADOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DO CICLO DE PRODUÇÃO NAS OITO GRANJAS DE SUÍNOS ESTUDADAS**

G-I		G-II		G-III		G-IV		G-V		G-VI		G-VII		G-VIII			
Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.	Soro	Idade/sem.		
1	2-3	320	1	2-3	640	1	2-3	640	1	2-3	320	1	2-3	340	1	2-3	640
2	2-3	640	2	2-3	320	2	2-3	640	2	2-3	640	2	2-3	340	2	2-3	640
3	2-3	640	3	2-3	640	3	2-3	320	3	2-3	320	3	2-3	640	3	2-3	320
4	2-3	160	4	2-3	320	4	2-3	320	4	2-3	160	4	2-3	640	4	2-3	320
5	2-3	320	5	2-3	320	5	2-3	640	5	2-3	320	5	2-3	640	5	2-3	320
<hr/>																	
1	>3-6	320	1	>3-6	320	1	>3-6	320	1	>3-6	80	1	>3-6	160	1	>3-6	160
2	>3-6	320	2	>3-6	320	2	>3-6	640	2	>3-6	80	2	>3-6	320	2	>3-6	160
3	>3-6	160	3	>3-6	80	3	>3-6	160	3	>3-6	160	3	>3-6	320	3	>3-6	600
4	>3-6	160	4	>3-6	0	4	>3-6	160	4	>3-6	0	4	>3-6	40	4	>3-6	160
5	>3-6	80	5	>3-6	0	5	>3-6	80	5	>3-6	0	5	>3-6	80	5	>3-6	160
<hr/>																	
1	>6-10	80	1	>6-10	320	1	>6-10	80	1	>6-10	160	1	>6-10	160	1	>6-10	160
2	>6-10	80	2	>6-10	320	2	>6-10	80	2	>6-10	160	2	>6-10	320	2	>6-10	80
3	>6-10	80	3	>6-10	80	3	>6-10	0	3	>6-10	160	3	>6-10	160	3	>6-10	80
4	>6-10	40	4	>6-10	0	4	>6-10	80	4	>6-10	320	4	>6-10	160	4	>6-10	0
5	>6-10	40	5	>6-10	0	5	>6-10	80	5	>6-10	160	5	>6-10	320	5	>6-10	40
<hr/>																	
1	>10-13	0	1	>10-13	80	1	>10-13	0	1	>10-13	320	1	>10-13	20	1	>10-13	40
2	>10-13	40	2	>10-13	0	2	>10-13	640	2	>10-13	320	2	>10-13	0	2	>10-13	0
3	>10-13	40	3	>10-13	160	3	>10-13	320	3	>10-13	640	3	>10-13	640	3	>10-13	0
4	>10-13	40	4	>10-13	80	4	>10-13	320	4	>10-13	320	4	>10-13	640	4	>10-13	80
5	>10-13	0	5	>10-13	160	5	>10-13	320	5	>10-13	320	5	>10-13	640	5	>10-13	80
<hr/>																	
1	>13-21	320	1	13-17	1280	1	>13-21	320	1	>13-21	10240	1	>13-21	5120	1	>13-21	2560
2	>13-21	320	2	13-17	10240	2	>13-21	640	2	>13-21	10240	2	>13-21	5120	2	>13-21	1280
3	>13-21	160	3	13-17	10240	3	>13-21	320	3	>13-21	20480	3	>13-21	10240	3	>13-21	2560
4	>13-21	640	4	13-17	1280	4	>13-21	320	4	>13-21	5120	4	>13-21	10240	4	>13-21	1280
5	>13-21	640	5	13-17	5120	5	>13-21	640	5	>13-21	5120	5	>13-21	20480	5	>13-21	1280
<hr/>																	
1	>24	1280	1	>24	5120	1	>24	2560	1	>24	2560	1	>24	1280	1	>24	2560
2	>24	1280	2	>24	5120	2	>24	1280	2	>24	2560	2	>24	2560	2	>24	2560
3	>24	1280	3	>24	1280	3	>24	20480	3	>24	1280	3	>24	5120	3	>24	1280
4	>24	1280	4	>24	1280	4	>24	10240	4	>24	2560	4	>24	1280	4	>24	10240
5	>24	2000	5	>24	1280	5	>24	5120	5	>24	2560	5	>24	1280	5	>24	2560

### ANEXO 03

#### INQUÉRITO SOROEPIDEMIOLÓGICO NA ZONA LIVRE DE PSC – 2003 FORMULÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA PARA REBANHOS SUÍDEOS COM SOROLOGIA POSITIVA PARA PSC

##### 1. Veterinário responsável pelo preenchimento do questionário

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

##### 2. Identificação da propriedade:

Nº de Identificação no Inquérito (UF + Nº seqüencial): \_\_\_\_\_

Nome da propriedade: \_\_\_\_\_ Nº do cadastro: \_\_\_\_\_

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Localização com GPS: Sul: \_\_\_\_\_ Oeste: \_\_\_\_\_

Coordenadas: H: \_\_\_\_\_ V: \_\_\_\_\_

##### 3. Qual o tipo de criação de suídeos?

- Granja comercial de suínos
- Granja de Javali
- Javaporco (cruza javali X suínos)
- Criatório de suídeos sem fins comerciais (consumo próprio)

##### 4. Plantel de suídeos

Quantidade de suídeos, atualmente existente na propriedade, por categoria:

CATEGORIA	SUÍNOS	JAVALIS	OUTROS
Cachaços			
Matrizes			
Fêmeas de reposição (marrãs)			
Leitões mamando			
Leitões na creche			
Leitões em crescimento-terminação			