

Juliana Amália Fonte Bôa do Nascimento

Análise Filogenética do Circovírus Suíno Tipo 2 no Brasil

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

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia.

Orientador: Profa. Zélia Inês Portela Lobato

Belo Horizonte
Escola de Veterinária

2009

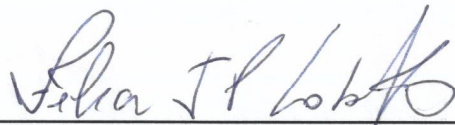
N244a Nascimento, Juliana Amália Fonte Bôa, 1971-
Análise filogenética do circovírus suíno do tipo 2 no Brasil / Juliana
Amália Fonte Bôa do Nascimento. –2009.
127 p. :il.

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

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

CDD – 636.408 96

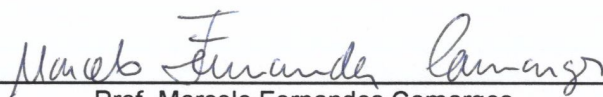
Tese defendida e aprovada em 31 de março de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Zélia Inês Portela lobato
Orientadora



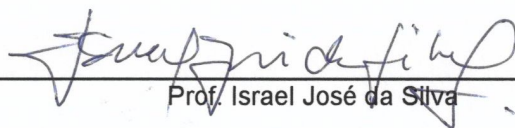
Profa. Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro



Prof. Marcelo Fernandes Camargos



Prof. Ernane Fagundes do Nascimento



Prof. Israel José da Silva

“Tudo no mundo começou com um sim. Uma molécula disse sim a outra molécula e nasceu a vida. Mas antes da pré-história havia a pré-história da pré-história e havia o nunca e havia o sim. Sempre houve. Não sei o quê, mas sei que o universo jamais começou.”

Clarice Lispector – A Hora da Estrela

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Leclerc, aos pesquisadores e funcionários do *Laboratoire de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, Institut Pasteur, Paris, France* por receberem-me como parte de sua equipe neste grande instituto de pesquisa. Em especial agradeço ao Dr. Pedro Berraondo López e à Dra. Catherine Fayolle pelo treinamento e acompanhamento diário no laboratório e pela agradabilíssima companhia.

À Dra Paola Minoprio agradeço pelo ser-humano forte, corajoso, caloroso, amigo, sincero, obstinado, confiante, prestimoso, leal, ético, de brilhante inteligência, diplomático, sagaz e clarividente que você é. E por compartilhar toda sua vivência e experiência me ensinando tanto sobre a vida em exíguo espaço de tempo.

Agradeço ao Dr. Pascal Boireau e Dra. Isabelle Vallé du *Laboratoire d'Études et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (LERPAZ), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Paris, France* pela oportunidade de integrar a equipe da BIPAR onde pude desfrutar de um ambiente científico saudável e estimulante. Sua generosidade e humanidade foram inspiradores.

Agradeço ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas Ltda. (IPEVE), pela fundamental colaboração com este trabalho e com o grupo de Estudos das Síndromes Associadas à Circovirose Suína da Escola de Veterinária da UFMG. Em especial agradeço a Dra. Adrienny Trindade Reis Costa pelo apoio e credibilidade na realização do trabalho.

Agradeço à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela minha formação acadêmica, e por me receber quando minhas pernas ainda eram pequenas demais para percorrê-la, ou meu vocabulário pequeno demais para contar toda a história que viveríamos.

Agradeço aos funcionários do departamento de Medicina Veterinária e Preventiva por terem me acolhido todos esses anos com o maior carinho, sorrisos abertos e comprometimento profissional. Em especial agradeço a querida Grazielle Cossenzo Florentino Galinari, ao Eduardo, a Doracy, ao Nelson e a Lúcia.

Aos professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva agradeço pelas oportunidades de crescimento profissional, troca de experiências e pelos muitos e valiosos conselhos.

Agradeço a todas as muitas pessoas queridas, colegas ainda da iniciação científica, do mestrado, do doutorado, e mesmo do pós doutoramento da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, do Institut Pasteur e do Laboratoire d'Études et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (LERPAZ), Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), Paris, France que foram cada uma delas pequeninas peças na engrenagem da minha construção diária como ser humano. Vocês foram e são incríveis além de darem graça ao ritmo

do dia-a-dia no laboratório e nos trabalhos. Foi uma honra trabalharmos juntos. Embora os caminhos da vida tendam a separar muitos de nós, as lembranças permanecerão sempre.

Com todo carinho, admiração, e respeito agradeço à Profa Zélia Inês Portela Lobato e ao Prof. Marcos Bryan Heinemann por me estenderem às mãos, me ensinarem a caminhar com meus próprios pés, a mostrarem todos os caminhos possíveis e com a sabedoria dos grandes mestres deixarem que eu elegesse o que melhor se encaixava não só aos meus sonhos e expectativas mas também à realidade, ao possível. Agradeço sua humanidade em sempre me acolherem calorosamente quando nas muitas vezes que as dúvidas e o temor vergaram meus joelhos. Sem sua amigável e agradabilíssima colaboração, a tese não teria metade de seu valor.

A Dr. Leonardo José Richtzenhain agradeço por sua disponibilidade em abrir as portas de seu laboratório e de seu conhecimento. A Dra. Adriana Cortez agradeço pelo indispensável acompanhamento nas análises moleculares e realização dos experimentos de sequenciamento.

Aos colegas Wagner Magalhães e Leandro Freitas doutorandos em Bioinformática do Laboratório em Diversidade Genética Humana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pelo interesse em compartilhar conhecimentos, pela paciência em me esclarecer as dúvidas, pelo comprometimento científico e pelo bom humor em todas as discussões. São exemplos como o de vocês que demonstram que a ciência é feita de “idéias-sementes” que não se fazem notar logo, mas crescem com raízes profundas e se transformam em realidade.

Agradeço aos meus amigos e amigas por compreenderem minha necessidade de dedicação, isolamento e pelas minha muitas ausências.

Agradeço aos meus sogros, D. Celeste e Sr. José Maria pelo carinho que sempre me devotaram e pelo apoio fundamental nessa etapa final.

Aos meus pais e irmãos agradeço pela honra de merecer sua credibilidade em meus acertos e sua compreensão nos meus erros. Sem vocês em minha vida eu não teria tido força, coragem e persistência em prosseguir adiante.

Agradeço, por fim, ao meu marido Pedro Henrique pelo seu amor incondicional, por sua dedicação e companheirismo, por acalantar minhas mãos dentro das suas fazendo-me sentir constantemente segura. Por estar ao meu lado em absolutamente todos os momentos, caminhando ao meu lado e protegendo me com sua sombra. E sobretudo por jamais deixar que eu desistisse dos meus sonhos.

Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades
(Luís Vaz de Camões)

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.
Continuamente vemos novidades,
Diferentes em tudo da esperança;
Do mal ficam as mágoas na lembrança,
E do bem (se algum houve...) as saudades.
O tempo cobre o chão de verde manto,
Que já coberto foi de neve fria,
E em mim coverte em choro o doce canto.
E, afora este mudar-se cada dia,
Outra mudança faz de mor espanto:
Que não se muda já como soía.”*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Quando sua pátria está tão distante que você não se reconhece no espelho.

Quando sua mente não reconhece a língua que entra pelos seus ouvidos e sai pela sua própria boca.

Quando os dias começam escuros e úmidos e o sol se põe antes do final do dia.

Quando as pessoas e os pássaros vestem-se de escuro e trancam seu sorriso atrás de uma máscara cinza.

Quando seus gestos e o mais simples ato de tocar no outro, tão natural para si, é considerado ofensivo.

Quando o outro se fecha, seus olhos se tornam vítreos e sem vida e te exige que apague sua própria luz.

Quando o mundo parece girar sob outro eixo, e você tropeça nas próprias pernas, palavras, gestos.

É uma dádiva de Deus encontrar no caminho seres humanos íntegros que não perderam o brilho, que ainda tem luz própria, que não esqueceram o significado da palavra compaixão e que com ética, sabedoria, experiência e simplicidade d'alma escolhem interromper por segundos suas próprias vidas para te escutar, para tentar te compreender, te ajudar, te guiar.

A vocês meu eterno e sincero agradecimento.

Dra. Paola Minoprio

Group leader du Laboratoire d'Immunobiologie des Infections à Trypanosoma, Département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France.

Dr. Pedro Berraondo López

Investigador en Terapia Gênica y Hepatología do Centro de Investigación Médica Aplicada da Universidad de Navarra – (CIMA), Pamplona, Espanha.

Dr. Pascal Boireau

Director du Laboratoire d'Études et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (LERPAZ), Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), Paris, France.

Dra. Isabelle Vallé

Chercheur du Laboratoire d'Études et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses (LERPAZ), Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), Paris, France.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
	RESUMO	17
	ABSTRACT	18
1.	INTRODUÇÃO	20
2.	OBJETIVOS	21
3.	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Características do Circovírus suíno tipo 2.....	22
3.2	Os principais genes do circovírus do tipo 2 e suas características	23
3.3	ORF1 e a proteína Rep.....	23
3.4	ORF2 e a proteína Cap.....	24
3.5	ORF3 e a proteína ORF3.....	25
3.6	Epidemiologia molecular e filogenia do CVS-2.....	26
3.7	Seleção genética.....	36
3.8	Filogeografia.....	37
3.9	Epidemiologia do Circovírus suíno do tipo 2.....	38
3.10	Sinais Clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas.....	39
3.11	Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos e Síndromes Associadas ao Circovírus tipo 2.....	41
3.11.1	Agentes Bacterianos Associados ao Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos	43
3.12	Diagnóstico das Síndromes Associadas à Circovirose Suína.....	48
4	PLANO DE TRABALHO.....	49
5	MATERIAL E MÉTODOS	50
5.1	Amostragem.....	50
5.2	Preparo do pool de extratos de tecidos das amostras.....	51
5.3	Avaliação das Lesões Macroscópicas e Microscópicas.....	51
5.4	Titulação dos homogeneizados de tecido em cultura de célula.....	52
5.5	Extração do DNA.....	52
5.6	A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	52
5.6.1	Oligonucleotídeos iniciadores	52
5.6.2	Condições de Amplificação.....	53
5.6.3	Detecção do produto amplificado.....	53
5.6.4	Purificação das Amostras.....	54
5.7	Sequenciamento.....	54
5.7.1	Reação de Sequenciamento e Purificação do produto com bases	54

	marcadas.....	
5.8	Análise Filogenética.....	55
5.8.1	Montagem e validação das sequências nucleotídicas.....	55
5.8.2	Busca de sequências homólogas em bancos de dados.....	55
5.8.3	Análise filogenética do CVS-2 baseada nas sequências de <i>ORF2</i> e <i>ORF3</i>.....	55
5.8.4	Pressão de seleção baseada na sequência da <i>ORF3</i> do CVS-2.....	56
5.8.5	Filogeografia baseada na sequência da <i>ORF3</i> do CVS-2.....	56
6	Análise Estatística.....	56
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
7.1	PCR.....	56
7.2	Agentes coinfecciosos bacterianos isolados e sua distribuição nos estados brasileiros.....	56
7.3	Avaliação e frequência das lesões macroscópicas.....	60
7.4	Avaliação histopatológica e frequência das lesões microscópicas.....	61
7.4.1	Avaliação histopatológica de 83 extratos de pulmões e sua correlação com a presença ou ausência de coinfeccções bacterianas.....	63
7.5	Associações entre lesões microscópicas e título infeccioso.....	67
7.6	Sequenciamento.....	68
7.7	Análise filogenética da <i>ORF2</i> do CVS-2.....	68
7.8	Análise Filogenética da <i>ORF3</i> do CVS-2.....	78
7.9	Árvore Filogenética baseada na sequência da <i>ORF3</i> do CVS-2.....	82
7.10	Classificação das lesões segundo os genogrupos da <i>ORF3</i>.....	84
7.11	Filogeografia dos genogrupos SG1, SG2 e SG3 da <i>ORF3</i> do CVS-2 nas amostras.....	85
7.12	Pressão de Seleção das sequências da <i>ORF3</i> do CVS-2.....	87
8	CONCLUSÕES.....	89
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
10	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	91
11	ANEXOS.....	105
Anexo 1 -	Correlação entre genogrupos da <i>ORF3</i> e seus subtipos com a classificação das lesões microscópicas em 89 amostras do estudo.....	105
Anexo 2 -	Distribuição temporal de 89 amostras no período de coleta de setembro de 2006 a novembro de 2007.....	106
Anexo 3 -	Distribuição espaço temporal de 33 amostras coletadas em uma mesma propriedade em diferentes datas de coleta.....	107
Anexo 4 -	Alinhamento da sequência do gene <i>ORF3</i> do CVS-2 nas 89 amostras do estudo.....	108
Anexo 5 -	Árvore Filogenética baseada no método de Neighbor-joining (NJ) para sequência de nucleotídeos da <i>ORF3</i> do CVS-2 nas amostras analisadas.....	111
Anexo 6 -	Distribuição geográfica, identificação e número de acesso no GenBank das 89 amostras identificadas no estudo da <i>ORF3</i> do CVS-2.....	112
Anexo 7 -	Análise estatística realizada pelo Teste Exato de Fisher entre os grupos de	114

extratos de pulmões com isolamento bacteriano (n=37) e sem isolamento bacteriano (n=34)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação em discreta, moderada e severa da infecção pelo CVS-2 através dos achados microscópicos adaptado de Chianini <i>et al.</i> (2003).....	51
Tabela 2 -	Pares de oligonucleotídeos iniciadores da ORF3 do CVS-2.....	53
Tabela 3 -	Frequência das principais lesões macroscópicas à necropsia avaliadas em 205 extratos de tecidos do estudo.....	61
Tabela 4 -	Frequência e porcentagens das principais lesões microscópicas de tecidos linfóides e não linfóides em 83 amostras estudadas.....	62
Tabela 5 -	Análise de associação entre os títulos utilizados e os tipos de lesões encontradas nas amostras.....	67
Tabela 6 -	Relação entre o título infeccioso de CVS-2 classificado em alto (≥ 810), médio (90 a 270) e baixo (<10 a 30) em amostras de extratos de pulmões sem isolamento de agentes bacterianos (n = 37) e com isolamento de agentes bacterianos (n = 34) e a classificação das lesões histopatológicas em discretas, moderadas e graves.....	68
Tabela 7 -	Grupo 1 e subgrupos A e B do CVS-2 e sua relação com lesões microscópicas classificadas em discretas, moderadas e severas nas 22 das 83 amostras estudadas.....	77
Tabela 8 -	Diferenças dos aminoácidos (aa) da ORF3 do CVS-2 entre os três genogrupos SG1, SG2 e SG3 do CVS-2 em 89 das amostras dos animais clinicamente afetados.....	81
Tabela 9 -	Parâmetros Estimados e Valores de Verossimilhança sob Modelos de Taxas Variáveis de ω entre sítios para a ORF3 do CVS-2.....	87
Tabela 10 -	Taxa Estatística de Verossimilhança entre os sítios sobre pressão seletiva da ORF3 do CVS-2.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Comparação quanto a identidade dos resíduos de aminoácidos entre as sequências de referência do GenBank para os três genogrupos SG1, SG2 e SG3 do CVS-2 e as 89 amostras do estudo dos animais clinicamente afetados.....	79
Quadro 2 -	Média de distância entre os subtipos dos genogrupos da ORF3 do CVS-2.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama esquemático do genoma completo do CVS-2. A origem de replicação está localizada entre as ORFs 1 e 7.....	22
Figura 2 -	Esquema do mecanismo replicativo círculo rolante utilizado pelos vírus do gênero circovírus.....	23
Figura 3 -	Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa de isolados do CVS-2 e construída através do programa PAUP (Fenaux <i>et al.</i> , 2000).....	27
Figura 4 -	Árvore filogenética construída a partir das sequências CVS-2A-E do presente estudo e de 11 sequências disponibilizadas do Genbank e originárias do EUA, Canadá, França, e Taiwan (Hamel <i>et al.</i> , 2000).....	27

Figura 5 -	Árvore filogenética construída a partir de 34 isolados do CVS-2 do Canadá e de 36 sequências do vírus disponibilizadas no Genbank (Larochelle <i>et al.</i> , 2002).....	28
Figura 6 -	Árvore filogenética de 47 isolados do CVS-2: 23 sequências do presente estudo e 24 sequências disponibilizadas no Genbank (De Boisséson <i>et al.</i> , 2004).....	30
Figura 7 -	Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) dos 19 isolados brasileiros e 12 sequências disponibilizadas no Genbank originárias de diferentes países (EUA, Canadá, Reino Unido, Áustria, França, Hungria, África do Sul, Taiwan, China, Japão) (Castro <i>et al.</i> , 2007).....	32
Figura 8 -	Árvore filogenética baseada no método de <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) demonstrando o agrupamento de sequências do CVS-2 nos grupos 1 e 2 e seus respectivos subgrupos (Olvera <i>et al.</i> , 2007).....	32
Figura 9 -	Marcadores de posição <i>indel</i> nos genes da ORF2 e ORF1, localizados nas 1 ^a , 2 ^a , 3 ^a posições dos códons (Olvera <i>et al.</i> , 2007).....	33
Figura 10 -	Árvores filogenéticas baseadas na ORF2 (a) e ORF3 (b) do CVS-2 com as sequências genômicas representativas dos três genogrupos (SG1, SG2, SG3) (Timmusk <i>et al.</i> , 2008).....	34
Figura 11 -	Árvore filogenética construída com 30 isolados brasileiros e 301 sequências disponibilizadas no Genbank originárias de EUA, Canadá, Europa, Ásia e África (Chiarelli-Neto <i>et al.</i> , 2008).....	36
Figura 12 -	Representação esquemática dos pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene da ORF2 e ORF3.....	53
Figura 13 -	Distribuição dos agentes bacterianos coinfecciosos em amostras de suínos com sinais clínicos da SACS nos estados brasileiros (MT, MS, GO, MG, ES, SP, PR, SC, RS).....	58
Figura 14 -	Alinhamento dos fragmentos da ORF2 para agrupamento das sequências dentro dos grupos e subgrupos do CVS-2.....	74
Figura 15 -	Árvore Filogenética da ORF-2 do CVS-2 construída pelo método de distância <i>Neighbor-Joining</i>	75
Figura 16 -	Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo gene ORF3 do CVS-2 nas 89 amostras do estudo.....	80
Figura 17 -	Árvore Filogenética baseada no método de Neighbor-joining (NJ) para sequência de aminoácidos da ORF3 do CVS-2 nas amostras analisadas.....	83
Figura 18 -	Representação gráfica da filogeografia dos 14 haplótipos que compõem o presente trabalho, divididos dentro dos genogrupos SG1, SG2, SG3.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência dos agentes bacterianos isolados e identificados em coinfeção com o CVS-2 em 67 amostras analisadas de animais com sinais clínicos de CDRS e pneumonia.....	57
Gráfico 2 -	Distribuição das bactérias pulmonares associadas ao CVS-2 nas amostras estudadas nos Estados Brasileiros envolvidos no estudo.....	59
Gráfico 3 -	Distribuição das bactérias pulmonares associadas ao CVS-2 em 24 diferentes combinações nas amostras estudadas nos estados brasileiros envolvidos no estudo.....	60
Gráfico 4 -	Títulos infecciosos do CVS-2 categorizados em baixos e médios relacionados com a classificação das lesões (discreta, moderada e severa) de 83 amostras analisadas.....	67
Gráfico 5 -	Distribuição das 44 amostras estudadas de acordo com a classificação das lesões microscópicas e dos genogrupos/subtipos da ORF3 do CVS-2.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% por cento

< menor

> maior

± mais ou menos

≥ maior ou igual

® marca registrada

°C graus Celsius

ω Taxa de *acceptance*

μg micrograma

μL microlitro

aa aminoácido

BFDV Vírus da doença dos bicos e penas

BLASTN Basic Local Alignment Search Tool using a protein query

BLASTX Basic Local Alignment Search Tool using a translated nucleotide query

bp Pares de base

CaCV Circovírus dos canários

Cap Proteína estrutural

CAP3 Contig Assembly Program

CAV Vírus da anemia infecciosa das galinhas

CDRS Complexo de Doenças Respiratórias do Suíno

CoCV Circovírus dos columbídeos

CoGV Circovírus dos gansos

CVS Circovírus suíno

CVS-1 Circovírus suíno tipo 1

CVS-2 Circovírus suíno tipo 2

dN Taxa de substituições nucleotídicas não sinônimas

DNA ácido desoxirribonucléico

dNTP deoxinucleosídeo-trifosfato

dS Taxa de substituição sinônima de nucleotídeos

E. coli Escherichia coli

EDTA ácido etileno diamino tetracético

ELISA Ensaio Imunoenzimático

et al. e colaboradores
FDQ (Fenilalanina / Aspartato / Glutamina)
FHQ (Fenilalanina / Histidina / Glutamina)
FNK (Fenilalanina / Asparagina / Lisina)
FNQ (Fenilalanina / Asparagina / Glutamina)
g gramas
IPEVE Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas
Kb quilobases
kDa quilodalton
Kg quilo
LDQ (Leucina / Aspartato / Lisina).
LHQ (Leucina / Histidina / Glutamina)
LNK (Leucina / Asparagina / Lisina)
LPS Endotoxina lipopolissacarídeo
M molar
Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MG Minas Gerais
Mg²⁺ magnésio
MgCl₂ Cloreto de magnésio
min. minutos
ML *Maximum Likelihood Estimation*
mL mililitro
mM milimolar
Mn²⁺ manganês
NF-κB Fator nuclear kappa B
ng nanograma
NJ *neighbor joining*
NK *Natural Killer*
nm nanômetro
nt nucleotídeos
ORF Janela aberta de leitura
p/v peso/volume
PAML *phylogenetic analysis by maximum-likelihood*

pb pares de bases
PCR Reação em Cadeia pela Polimerase
pH concentração de hidrogênio iônico
PiCV Circovírus dos pombos
PK15 células de rim de suíno - 15
pmol picomol
pPirh2 Porcine p53-induced-RING-H2
PPV Parvovírus suíno
PRDC Complexo Respiratório suíno
PRRSV Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva
RCR *Rolling circle replication*
Rep Proteína replicativa
RNA ácido ribonucléico
RNAm ácido ribonucléico mensageiro
s segundos
SACS Síndromes Associadas a Circovirose Suína
SC Santa Catarina
SIV Vírus influenza suíno
SP São Paulo
SPF Suínos livres de patógenos específicos
SRRS Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína
TE Tampão TRIS-EDTA
TRIS hidroximetil-aminometano
U unidades
USP Universidade de São Paulo
V/cm Volt/centímetro
VDA Vírus da doença de Aujeszky
VPS Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo
x g aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s²)
x vezes

RESUMO

Foi realizado o estudo da diversidade genética do Circovírus Suíno do Tipo 2 (CVS-2), identificação e discriminação dos genogrupos baseados na sequência da *ORF3* do CVS-2 de animais com sintomas clínicos das Síndromes Associadas à Circovirose Suína (SACS). Além da correlação das lesões histopatológicas observadas em animais com sinais clínicos compatíveis com a SACS e o Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS). A amostragem do trabalho foi realizada com *pool* de extratos de tecidos linfóides e não linfóides de suínos oriundos de granjas dos estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As lesões macroscópicas foram descritas à necropsia e os fragmentos de órgãos linfóides e não linfóides foram submetidos ao isolamento e identificação de agentes coinfecciosos bacterianos, titulados para quantificação de vírus infeccioso além de processados e corados pela Hematoxilina e Eosina para avaliação histopatológica. Os principais achados histopatológicos foram folículos linfóides com depleção linfóide e infiltrado inflamatório histiocitário, pneumonia broncointersticial, nefrite intersticial linfocitocitária multifocal. As lesões microscópicas foram classificadas em discretas, moderadas e severas e comparadas com o título infeccioso obtido em pool destes tecidos, e associadas ao estudo filogenético da *ORF3* do Circovírus Suíno tipo 2 (CVS-2). As lesões macro e microscópicas e a frequência dos principais achados foram compatíveis com o descrito para animais com SACS. A avaliação microbiológica identificou 6% de *Bordetella bronchiseptica*, 7% de *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Pasteurella multocida* do tipo D, 10% de *Haemophilus parasuis*, 20% de *Streptococcus suis* e 23% de *Pasteurella multocida* do tipo A. A relação entre os achados histopatológicos e as coinfeccções sugeriram associação entre CVS-2 e o Complexo de Doenças Respiratórias indicando efeito sinérgico na imunossupressão do hospedeiro pelos microorganismos. Todas as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação das regiões da *ORF2* e *ORF3* do CVS-2; os produtos de PCR obtidos foram purificados e sequenciados visando o estudo filogenético do vírus. Para a avaliação filogenética, as amostras foram submetidas ao alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos e construção da árvore filogenética baseada no método de *Neighbor Joining*. Os resultados da avaliação filogenética da *ORF2* do CVS-2 demonstraram que em todas as amostras estudadas o CVS-2 circulante pertencia ao grupo 1 e subgrupos 1A e 1B. A frequência dos subgrupos foi marcada por uma grande diferença, pois, enquanto 88,5% das amostras foram classificadas no subgrupo 1A, apenas 11,5% foram classificadas no subgrupo 1B. O alinhamento

das sequências da ORF3 permitiu dividir as amostras em três genogrupos: SG1, SG2 e SG3. Para a ORF3 foi realizada, ainda, a análise de pressão seletiva e filogeografia sendo possível observar seleção positiva com $p \geq 0,95\%$ nas posições 41, 102 e 104 da ORF3. A filogeografia possibilitou distinguir a distribuição das amostras nos três genogrupos e suas correlações. Os genogrupos SG1, SG2, SG3, foram distribuídos em 14 haplótipos. Foi observado o predomínio de SG3, uma vez que este genogrupo está presente em todos os nove estados analisados, sendo considerado derivador devido a sua ampla dispersão. Além disso, foi possível determinar a presença de amostras pareadas dos genogrupos SG2 e SG3 num mesmo sítio de coleta, indicando a circulação de variantes diferentes na mesma propriedade em datas diferentes. A relação entre os genogrupos da *ORF3* e a classificação do CVS-2 demonstrou que o SG1 e SG2 pertenciam ao subgrupo 1B enquanto o SG3 foi agrupado em 1A.

Palavras Chave: CVS-2, SACS, CDRS, lesões macroscópicas, microscópicas, título infeccioso, filogenia, *ORF2*, *ORF3*, pressão de seleção e análise filogeográfica.

ABSTRACT

The aims of this work were to study the genetic diversity of the porcine circovirus type 2 (PCV-2) and to identify and discriminate genogroups based on the ORF3 sequence from PCV-2 from animals with clinical signs of the Porcine Circoviruses Associated Disease (PCVAD). And also the study of the correlation between histopatologic lesions observed in animals with a compatible clinical signs of PCVAD and Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). The sampling consisted of lymphoid and non lymphoid tissue pools from swines from farms of the following Brazilian states: Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The macroscopic lesions were described by the necropsy and lymphoid and non-lymphoid tissue fragments were submitted to isolation and identification of bacterial co-infections, virus titration as well as histopathological diagnosis was performed using hematoxylin-eosin stain. The main pathological findings were lymphoid follicles with lymphocyte depletion and histiocytic cell infiltration, bronco-interstitial pneumonia, interstitial nephritis with multifocal lymphohistiocytic inflammatory infiltrates. The microscopic lesions were classified in discrete, moderate and severe, evaluated with the viral

load on tissue pool and associated with the phylogenetic analysis of the PCV2 ORF3 gene. The macroscopic and microscopic lesions and the frequency of main pathological findings were compatible with the description of animals with PCVAD clinical signs. The microbiological evaluation of the tissues samples recognized 6% of *Bordetella bronchiseptica*, 7% of *Escherichia coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* type D, 10% of *Haemophilus parasuis*, 20% of *Streptococcus suis* and 23% of *Pasteurella multocida* type A. The relation between the histopathologic findings and the co-infections suggested association between the PCV-2 and PRDC, suggesting a synergic effect in the host immunosuppression by the microorganisms. All samples were submitted to the polymerase chain reaction (PCR) of ORF2 and ORF3 genes from PCV-2, PCR products were then purified and sequenced for phylogenetic analysis. A nucleotide and amino acid alignment was performed and the phylogenetic tree was constructed using the Neighbor Joining (NJ). The results showed that the circulating PCV-2 in all samples belonged to group 1, sub-groups 1A and 1B. The frequency of the subgroups was markedly different since 88.5% of the samples were classified as subgroup 1A, and only 11.5% belonged to subgroup 1B. The ORF3 sequence alignment enabled the divide of samples in three genogroups: SG1, SG2 and SG3. The selective pressure and phylogeographic analysis were also performed for ORF3. The selective pressure analysis showed positive selection in ORF3 gene at positions 41, 102 and 104 ($p \geq 0.95\%$). The phylogeographic study enabled the distribution of the samples on SG1, SG2 and SG3 genogroups and correlations. The SG1, SG2, SG3 genogroups were distributed within 14 haplotypes. The SG3 was grouped sequences from the nine states and was considered to be the ancestral haplotype due its wide dispersion. The possibility of different variants circulating in the same farm at distinct dates was also evaluated. The detection of SG1, SG2 and SG3 genogroups in samples collected at distinct times from the same farm indicates the presence of PCV-2 variants circulating in different management systems in the Brazilian swine farms. The relation of the ORF3 genogroups and the classification of the PCV-2 demonstrated that SG1 and SG2 belonged to the sub-group 1B while the SG3 was grouped in 1A.

Keywords: PCV-2, PCVAD, PRDC, macroscopic and microscopic lesions, viral load in tissues, phylogeny, ORF2, ORF3, selective pressure and phylogeographic analysis.

1 INTRODUÇÃO

A circovirose suína é uma doença emergente que acomete suínos nas principais áreas produtoras do mundo causando grandes prejuízos. A doença pode ocorrer em rebanhos que usualmente possuem alto padrão sanitário, sendo mais comumente encontrada em granjas de ciclo completo com fluxo contínuo e granjas de terminação de múltiplas origens (Steverink *et al.*, 2002). A mortalidade e a morbidade variam de acordo com a fase em que o surto aparece e o manejo empregado, porém a mortalidade pode chegar a 10% (Allan e Ellis, 2000). O custo da produção cresce em função da maior mortalidade, perda de peso, piora da conversão alimentar e necessidade do uso de medicamentos.

Macroscopicamente são encontradas lesões granulomatosas em vários órgãos como pulmão, coração, fígado, rins, baço, pâncreas, intestinos, testículos, cérebro, glândulas adrenais e tireóide. Além de marcada atrofia do timo em animais severamente afetados (Rosell *et al.*, 1999; Segalés *et al.*, 2004 a).

No exame histopatológico são freqüentemente observadas alterações significativas na maioria dos tecidos linfóides, muitos dos quais apresentam ampla depleção de linfócitos, especialmente nos folículos e nas zonas paracorticais dos linfonodos e também no baço. A depleção é acompanhada por infiltração histiocitária, que freqüentemente contém corpúsculos de inclusão citoplasmáticos basofílicos e que são vistos como grandes inclusões individuais (sincícios) ou como corpos pequenos múltiplos (Chianini *et al.*, 2003; Darwich *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2004 b).

Os pulmões apresentam pneumonia intersticial linfocitocitária, com destruição do epitélio bronquial e bronquiolar e

presença de células inflamatórias nos alvéolos. As infiltrações linfocitocitárias também ocorrem no fígado, rim e pâncreas. No fígado, também é visto com freqüência uma extensa necrose dos hepatócitos, em geral com colapso do parênquima, enquanto que no rim pode ocorrer nefrite intersticial multifocal. O estômago, colón, ceco e duodeno podem apresentar necrose das glândulas e das criptas, e infiltração de células mononucleares (Allan *et al.*, 1998a; Ellis *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998).

Na patogênese das infecções naturais da SACS alguns eventos podem ser discriminados como característicos dessa síndrome tais como, depleção linfóide e severa infiltração histiocitária. Embora o fundamental mecanismo pelo qual o infiltrado histiocitário ocorre nos tecidos (principalmente linfonodos) não esteja bem definido parecendo consistir em um dos eventos iniciais durante a infecção pelo CVS-2, e coincidir com a linfadenopatia macroscópica (Clark, 1996; Rosell *et al.*, 1999).

Os estudos moleculares (Hiscott *et al.*, 2001; Ameisen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008; Karuppanan *et al.*, 2008) têm incriminado a proteína ORF3 codificada pelo gene não estrutural ORF3, como responsável pela patogênese do CVS-2 pela indução de apoptose relacionando-a inclusive com a dispersão do CVS-2 *in vivo* através de macrófagos e células dendríticas.

A evolução da diversidade genética do CVS-2 e da existência de variantes vem sendo intensamente estudada para o melhor entendimento da patogênese da síndrome e do desenvolvimento de medidas profiláticas para a mesma. Estudos moleculares para determinar a extensão das variações genéticas do CVS-2 têm sido conduzidos de forma a identificar ramificações secundárias

associadas com origem geográfica mais do que diferenças no tropismo viral (Fenaux *et al.*, 2000; Hamel *et al.*, 2000; Meehan *et al.*, 2001).

Diversos estudos de genotipagem do CVS-2 (De Boissésou *et al.*, 2004; Grierson *et al.*, 2004a, 2004b; Larochelle *et al.*, 2002, Olvera *et al.*, 2007) culminaram por definir a divisão do CVS-2 em dois grupos (1 e 2) e 8 subgrupos (1A a 1C e 2A a 2E). Wen *et al.* (2005) estabeleceram correlação entre amostras de tecidos de animais positivos para o CVS-2 coletadas em 10 diferentes regiões geográficas da China com doença clínica e doenças associadas com o CVS-2.

Atualmente é sabido que em diversos países produtores de suínos no mundo o estudo filogenético do CVS-2 já se encontra bem definido como na Holanda (1A, 1B e 1C), Japão (2A e 2 E), Canadá (2A, 2D e 2E), Espanha (2C), e Taiwan (2B e 2 D). Os subgrupos 2A, 2B, e 2E não têm sido identificados na Europa e o subgrupo 2 C foi identificado somente em restritas regiões da Europa (Dupont *et al.*, 2008; Grau-Roma *et al.*, 2008).

No Brasil Ciacci-Zanella e Mores (2000) diagnosticaram a doença pela primeira vez no ano de 2000, sendo os responsáveis pela identificação do CVS-2 em materiais arquivados desde 1988. Castro *et al.* (2007), Castro *et al.* (2008), Chiarelli-Neto *et al.* (2008), Ciacci-Zanella *et al.* (2009) têm pesquisado sobre a diversidade genética e distribuição geográfica do CVS-2 no Brasil, tendo estabelecido a presença dos grupos 1 e 2, e subgrupos respectivos A e B, D e E.

Timmusk *et al.* (2008) identificaram na Suécia três genogrupos (SG1, SG2 e SG3) com base nas sequências gênicas da ORF2 e ORF3 e co-relacionaram a manifestação destes genogrupos com a SACS. Foi possível definir que o SG1 apresentava grande estabilidade genética e estava associado com propriedades livres da

síndrome, o SG2 estava relacionado com o aparecimento recente da SACS na propriedade, enquanto o SG3 estava correlacionado com granjas que apresentavam histórico da doença.

No Brasil o CVS-2 é endêmico e devido à diversidade de manejo e estruturas de produção características de cada estado produtor é de grande relevância a definição dos grupos e subgrupos do CVS-2 circulantes nos estados brasileiros. No entanto, a maioria dos trabalhos realizados estabeleceu o estudo filogenético através da sequência da ORF2. No presente trabalho, realizamos, além do estudo dos grupos e subgrupos do CVS-2, o estudo filogenético baseado na ORF3, um gene pouco estudado até o momento. Buscou-se investigar a possibilidade de pressão seletiva sobre a ORF3 e demonstrar a distribuição filogeográfica das amostras nos diferentes estados envolvidos com a suinocultura brasileira.

2 OBJETIVOS

Estudo filogenético das ORF2 e ORF3 do CVS-2 em amostras de suínos com sinais clínicos das Síndromes Associadas à Circovirose Suína (SACS) em granjas de nove estados brasileiros.

Avaliação de pressão de seleção baseada na sequência da ORF3 do CVS-2.

Estudo da distribuição geográfica espaço-temporal das amostras.

Correlação dos genogrupos da ORF3 com as lesões macro e microscópicas e o título infeccioso do CVS-2 nas amostras estudadas.

Avaliação da relação entre as lesões histopatológicas observadas em animais com sinais clínicos compatíveis com a SACS e o Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características do Circovírus suíno tipo 2

O circovírus suíno (CVS) é um vírus pequeno de aproximadamente 1.76 kb, com 17 nm de diâmetro, não-envelopado, icosaédrico e com genoma circular de fita única (McIntosh *et al.*, 2006; McIntosh *et al.*, 2008).

Pertencente a família *Circoviridae*, composta atualmente de três membros, o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), o vírus da doença das penas e bicos dos psitacídeos (BFDV) e o circovírus suíno (CVS). Dois circovírus suínos (CVS) já foram identificados, o circovírus suíno tipo 1 (CVS-1), contaminante de células PK-15, e que não causa sintomatologia clínica em suínos e o circovírus suíno tipo 2 (CVS-2), o qual tem sido associado com a ocorrência das Síndromes Associadas a Circovirose Suína (SACS). Caracterizações físico-químicas têm descrito diferenças entre CAV e CVS quanto a sua organização genômica e estratégias de expressão de proteínas e revelaram pequena similaridade nucleotídica e protéica. Sinais de poliadenilação (AATAAA) estão presentes em dois sítios de nucleotídeos (314-315, 973-978) e na fita complementar num agrupamento de três posições (incluindo 730-745, e um único sítio na posição 571-576). Este arranjo de sinais de poliadenilação é consistente com a observação que no genoma do CVS ambas as fitas transcrevem e geram três distintos RNA transcritos e codificam proteínas específicas para o CVS (Meehan *et al.*, 1997).

A organização genômica do CVS e a posição de 11 janelas abertas de leitura (*Open Reading frames* ou ORFs) já foram determinadas (**Figura 1**). Os valores da massa molecular de sete dessas proteínas são em ordem descendente: ORF1, 35-37 kDa

(nt 47-983); ORF2, 27,8 kDa (nt 1723-1024); ORF3, 23,2 kDa (nt 685-40); ORF4, 13,3 kDa (nt 552-207); ORF5, 9,8 kDa (nt 1163-1448); ORF6, 6,7 kDa (nt 1518-1332); ORF7, 6,0 kDa (nt 1670-79). As janelas abertas de leitura 1, 2, 4, 5, 6 contêm sequências de glicosilação (também chamadas sequências de asparaginas NXS ou NXT, onde o X representa qualquer aminoácido) (Hamel *et al.*, 1998).

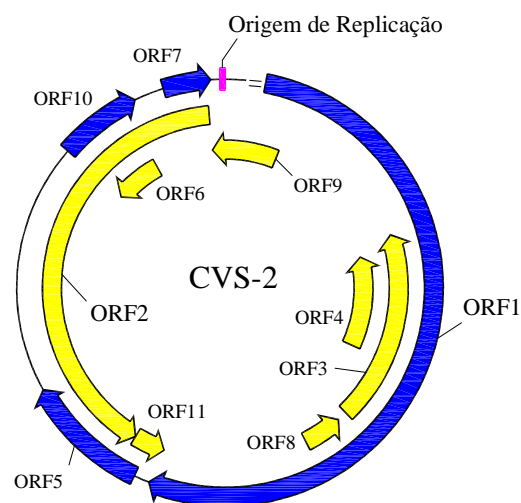


Figura 1 Diagrama esquemático do genoma completo do CVS-2. A origem de replicação está localizada entre as ORFs 1 e 7 (Kim e Lyoo, 2002)

Na ORF2 do CVS-1 e do CVS-2 (Hamel *et al.*, 1998) existem sítios de glicosilação responsáveis pela codificação de proteínas que permitem modificações pós traducionais (fosforilação, sulfatação, metilação, acetilação e hidroxilação) responsáveis pelos diferentes tamanhos das proteínas.

Os circovírus são os menores vírus capazes de replicação autônoma em células de mamíferos. Devido à sua simplicidade genômica e estrutural, a replicação requer a participação de várias proteínas das células hospedeiras e ocorre durante a fase S do ciclo celular. A replicação do genoma ocorre no núcleo das células e envolve a síntese de uma molécula de DNA de fita dupla

(replicativo intermediário). Após a síntese do replicativo intermediário, o genoma é, provavelmente, replicado pelo mecanismo de círculo rolante (**Figura 2**). A replicação do genoma se inicia logo após a penetração do vírus na célula, pela síntese da fita complementar de DNA. Sítios de ligação de fatores de transcrição possuem papel importante na regulação da transcrição do genoma (região do promotor) e constituem a parte não-transcrita do genoma. Após sua síntese, o DNA replicativo intermediário é transcrito em RNA_{mensageiro} (RNA_m). A partir do DNA replicativo intermediário, são produzidas moléculas de DNA de fita simples circulares, correspondentes ao DNA genômico. Essas moléculas são encapsidadas por múltiplas cópias da proteína do capsídeo. A morfogênese ocorre no núcleo por mecanismos ainda não esclarecidos (Flores, 2007).

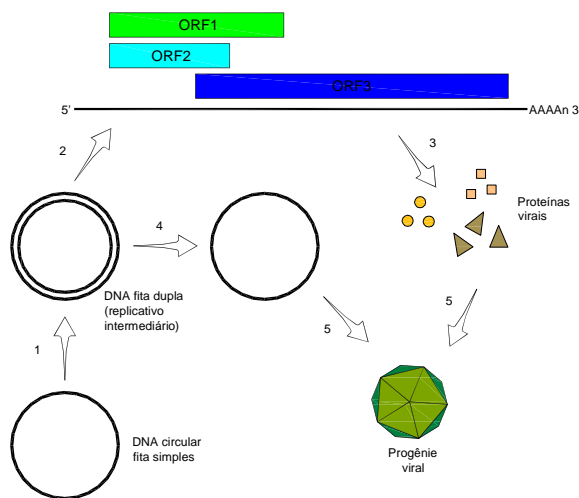


Figura 2 Esquema do mecanismo replicativo círculo rolante utilizado pelos vírus do gênero circovírus (adaptado de Flores, 2007)

3.2 Os principais genes do circovírus do tipo 2 e suas características

Os principais genes codificados pelo genoma viral são: na fita positiva, o gene replicase (Rep) de 942 bp codificador da proteína *Rep* responsável pela replicação do

CVS-2, o gene ORF3 de 315 bp relacionado a patogenicidade, e na fita negativa o gene capsídeo (*Cap*) de 702 bp que codifica a proteína do capsídeo de aproximadamente 30kDa (Hamel *et al.*, 1998).

3.3 ORF1 e a proteína Rep

O gene ORF1 é altamente conservado entre CVS1 e CVS2, com identidade na sequência de nucleotídeos de aproximadamente 83%, enquanto que a ORF2 tem identidade de 67-70% exibindo uma alta taxa de variação comparada com a ORF1 (Olvera *et al.*, 2007). A ORF1, através do processamento alternativo, produz diferentes transcritos primários que resultam em proteínas diferentes: Rep e Rep'. Ambas são essenciais para a replicação do CVS, estando associadas com a estrutura em grampo na origem de replicação (Hamel *et al.*, 1998).

Na origem de replicação, ligadas com Rep e Rep', estão sequências e estruturas secundárias críticas para o início da replicação, incluindo uma bem conservada nonomérica na porção proximal (nucleotídeos na posição 1753-2), seguida por quatro repetições de uma sequência hexamérica (Meehan *et al.*, 1997).

A proteína Rep tem ainda a capacidade de interagir fortemente com uma proteína filamentos intermediária do citoesqueleto cuja sequência de aminoácidos é altamente similar a proteína intermediária sincoilina. Este tipo de filamentos está distribuído através de todo o citoplasma, mas se localizam empacotados adjacentes ao núcleo. Além disso, filamentos intermediários estão em íntima associação com o núcleo na maioria das células, e seus componentes podem até mesmo afetar o formato do núcleo (Timmusk *et al.*, 2006).

Através dessa interação o CVS-2 utiliza filamentos do citoesqueleto para o transporte de proteínas virais ou partículas para locais subcelulares. E por meio deste mecanismo

pode transportar a proteína Rep para o citoplasma a fim de regular algumas fases do ciclo de vida do vírus assim como, ser transportada para o núcleo ligando-se ao DNA viral e transportá-lo ou mesmo sequestrá-lo. O que explicaria a presença de DNA viral inativo no interior de células dendríticas (Vincent *et al.*, 2003; Timmusk *et al.*, 2006).

As proteínas não-estruturais podem desempenhar importante papel na replicação viral assim como na patogênese através de sua atividade apoptótica (Liu *et al.*, 2005). Stevenson *et al.* (2007) determinaram que a proteína Rep (aa 81-100 e aa 201-220) e a proteína codificada pela ORF3 são proteínas não estruturais codificantes de epitopes imunodominantes para linfócitos T.

3.4 ORF2 e a proteína Cap

A proteína Cap codificada pela ORF2 é considerada o principal imunógeno para linfócitos B, induzindo anticorpos neutralizantes após infecção com o CVS-2 (Olvera *et al.* 2007; Stevenson *et al.*, 2007).

Larochelle *et al.* (2002) num estudo de caracterização genética e análise filogenética do CVS-2 observaram a ocorrência mutações nucleotídicas no gene Cap que induziram substituições de aminoácidos, algumas das quais não-conservativas. De Boissésou *et al.* (2004) identificaram 5 principais regiões de heterogeneidade de aminoácidos (59-91, 121-134, 185-191, 206-215 e 232-234) entre os isolados de CVS-2 e determinaram que em todas as sequências de aminoácidos da ORF2 usadas em seu estudo o aminoácido (aa) 110 é prolina, e o aa 191 é glicina, arginina ou alanina.

Lohse *et al.* (2008) estudando dois grupos de suínos com e sem a SACS, identificaram uma deleção na sequência nucleotídica do gene Cap de CVS-2 isolado de animais com a SACS. A perda de um único nucleotídico na terminação 3' da sequência codificadora

da proteína Cap, embora não tenha influenciado no tamanho da proteína do capsídeo, resultou na incorporação da asparagina no penúltimo aminoácido na proteína ao invés de lisina. Entretanto, mesmo com ambos os aminoácidos polares, e tendo como única diferença sua carga elétrica, não foi possível determinar se suas diferentes propriedades poderiam influenciar a função da proteína cap.

Kim e Lyoo (2002) especularam que alterações na ORF2 poderiam ser responsáveis pela variação na proteína do capsídeo e na patogenicidade do CVS-2 através da alteração de determinantes envolvidos no tropismo tissular ou nas interações vírus e hospedeiro.

Truong (2001) determinou que os primeiros 46 aminoácidos de sua porção N-terminal parecem não estar envolvidos na formação dos epitopes conformacionais e contêm resíduos ricos em aminoácidos básicos, podendo estar envolvidos com a formação da superfície interna do vírion e interagir com cargas negativas do DNA genômico durante a montagem do vírus. Os aminoácidos localizados do resíduo 47 até sua porção C-terminal possivelmente constituem a superfície externa do vírion, uma vez que contêm sequências essenciais para o reconhecimento por anticorpos mono e policlonais. As sequências de aminoácidos a partir dos resíduos 47 a 62, 165 a 200, assim como os quatro últimos aminoácidos de sua porção C-terminal se dispõem bem próximos formando um grupo de epitopes conformacionais na superfície do vírion.

Estes achados corroboram aqueles de Hamel *et al.* (1998), Kim e Lyoo (2002), De Boissésou *et al.* (2004) e Olvera *et al.* (2007) que identificaram como domínios antigênicos da proteína Cap os peptídeos localizados entre os aminoácidos 65-87, 113-147, e 193-207, e sugeriram que expostos a pressão seletiva imune poderiam

estar envolvidas na emergência de variantes do CVS-2.

As subunidades da proteína Cap mantêm formação dimérica e interação com outras proteínas, como a própria Rep, através de resíduo de cisteína, circundado por uma bem conservada região de 12 a 16 aminoácidos (Timmusk *et al.*, 2006). Gilpin *et al.* (2003) demonstraram que a proteína Rep do CVS-2 está localizada no núcleo de células infectadas PK15, enquanto a Cap pôde ser detectada no núcleo e citoplasma, havendo uma correlação entre ambas as proteínas.

A multiplicação do DNA do circovírus ocorre essencialmente através da replicação ciclo rolante (*Rolling circle replication ou RCR*) de forma semelhante aos geminivírus de DNA fita simples. A proteína do capsídeo pode desempenhar importante papel no controle do número de cópias de DNA viral, uma vez que sua redução ou inativação pode resultar em drástica redução no acúmulo de DNAs e aumento de três a cinco vezes no DNAs (Bridson *et al.*, 1989). Esta interferência na verdade, não é surpreendente, uma vez que proteínas do capsídeo são expressas tardiamente no ciclo de infecção, 72 a 96 horas pós-infecção e podem influenciar os estágios iniciais, incluindo a síntese de DNA (Padidam *et al.*, 1999; Fintersbusch *et al.*, 2005).

Assim o fato de Cap localizar-se no nucléolo e Rep no nucleoplasma durante a fase inicial da infecção, com a posterior co-localização de ambas as proteínas no nucleoplasma parece indicar que o RCR do CVS é controlado e interrompido pela interação entre Cap-Rep (Timmusk *et al.*, 2006).

3.5 ORF3 e a proteína ORF3

Liu *et al.* (2005) estudando a possibilidade de uma das janelas abertas de leitura do CVS-2 ser a responsável pela codificação de proteína envolvida na apoptose induzida pelo vírus, avaliaram a ORF3, de 315 pares

de base (pb) de comprimento, como candidata. A comparação com o CVS-1, mostrou que a ORF3 do vírus tipo 1, não patogênico, possui um comprimento de 612 pb, além do fato de que entre as ORF3 dos dois tipos de vírus havia uma similaridade de aminoácidos de apenas 61,5%. Tal estudo indicou que a diferença entre esses fragmentos poderia estar relacionada com a patogenicidade do CVS-2. O estudo da infecção de células PK15 com o CVS-2 permitiu definir que a proteína ORF3 é expressa e predominantemente localiza-se no núcleo das células infectadas. A partir dessas informações procurou-se determinar como o CVS-2 induziria apoptose em células PK15 e se a proteína ORF3 estaria envolvida. Os resultados demonstraram que CVS-2 induz apoptose em células PK15 via proteína ORF3 através da ativação do iniciador da caspase 8 seguido pela ativação do efetor da caspase 3 e que na ausência desta proteína a atividade apoptótica pôde ser significativamente reduzida.

Wei *et al.* (2008) demonstraram que a proteína ORF3 tem analogia funcional à proteína não-estrutural VP3 (apoptina) do vírus da Anemia Infecciosa das Aves (CAV), responsável pela apoptose em células T linfoblásticas e implicada na patogênese do vírus.

Hiscott *et al.* (2001); Ameisen, (2002) e muitos outros autores determinaram que a habilidade de ativar a cascata de sinalização dos fatores de transcrição da família NF- κ B/I κ B, e a ativação de seus mais de 100 genes alvo, dos quais a maioria faz parte da resposta imunológica (inata e adaptativa), deveria ser considerado um fator relevante na infecção e propagação viral. O NF- κ B apresenta tanto propriedades antiapoptóticas que permitem o microorganismo evadir os mecanismos de defesa que limitam a replicação viral, como apoptóticas que facilitam a disseminação da progênie viral pela limitação da indução de respostas inflamatórias e imunológicas, protegendo os

virions do contato com anticorpos neutralizantes. Devido ao seu extenso papel na resposta imunológica, o NF- κ B tem sido chamado de mediador central da resposta imune. E consiste num atraente alvo para patógenos virais como o Circovírus Suíno do Tipo 2, Retrovírus, Adenovírus, Herpes Vírus (De Bosscher *et al.*, 2006). Wei *et al.* (2008) definiram que a proteína proapoptótica p53 deveria ser considerada responsiva ao NF- κ B, sendo sua expressão aumentada em células infectadas pelo CVS-2.

Dentro deste contexto, Karuppanan *et al.* (2008) determinaram que após o uso de um inibidor da ativação do NF- κ B foi possível reduzir a ativação da cascata apoptótica induzida pelo CVS-2. E estudando a atuação do CVS-2 sobre a cascata de sinalização da família NF- κ B/I κ B determinaram que em cultivo de células PK15 o vírus seria capaz de promover a degradação e fosforilação da I κ B α e ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, pelo aumento da atividade da proteína P65, com conseqüente translocação para o núcleo e ativação de genes.

Stevenson *et al.* (2007) demonstraram em cultivos celulares que a proteína ORF3 do CVS-2 pode interagir com pPirh2, uma proteína homóloga a ligase E3, promovendo o acúmulo da proteína pró-apoptótica p53 e modulando sua função. Foram dois os mecanismos observados: i) a interação da ORF3 com a pPirh2 pode mediar a auto-degradação da pPirh2 e subsequentemente reduzir sua habilidade para ubiquitinar a p53, ii) através da interação com o domínio da p53 sobre pPirh2 (resíduos 120-137), a ORF3 pode bloquear a interação da p53 com a pPirh2 e a subseqüente ubiquitinação e degradação da p53.

Liu *et al.* (2007) observaram que CVS-2 mutantes que perderam a capacidade de expressar a proteína ORF3 ou tiveram sua ORF3 truncada, impedindo sua interação com a pPirh2, não foram capazes de

promover o acúmulo de p53 em células infectadas, não causando portanto apoptose em células PK-15. Através deste trabalho os autores hipotetizaram que a apoptose induzida pela ORF3 pode ser um fator que auxiliaria na dispersão do CVS-2 *in vivo* pela indução da apoptose em macrófagos e células dendríticas.

3.6 Epidemiologia molecular e filogenia do CVS-2

Estudos moleculares a fim de determinar a filogenia molecular do CVS-2, sua diversidade genética, sua distribuição geográfica e a existência de variantes têm se multiplicado em todos os países produtores de suínos, na tentativa de relacioná-los com a presença de mutações, pressão de seleção, virulência e patogenicidade.

Entre os primeiros trabalhos de filogenia destaca-se o de Fenaux e colaboradores (2000) que buscaram determinar a extensão da heterogeneidade genética de isolados do CVS-2 através do estudo do genoma completo de seis isolados originários de diferentes regiões da América do Norte comparando suas sequências com outras do Canadá, França, Alemanha, Irlanda e Taiwan disponibilizadas no Genbank. Os resultados indicaram que o genoma do CVS-2 era geralmente estável entre diferentes isolados embora pudessem haver diferenças nas sequências genômicas a partir de diferentes regiões geográficas. Os resultados obtidos permitiram a construção de árvore filogenética que possibilitou diferenciar sequências homólogas em ramos distintos (**Figura 3**) (Fenaux *et al.*, 2000).

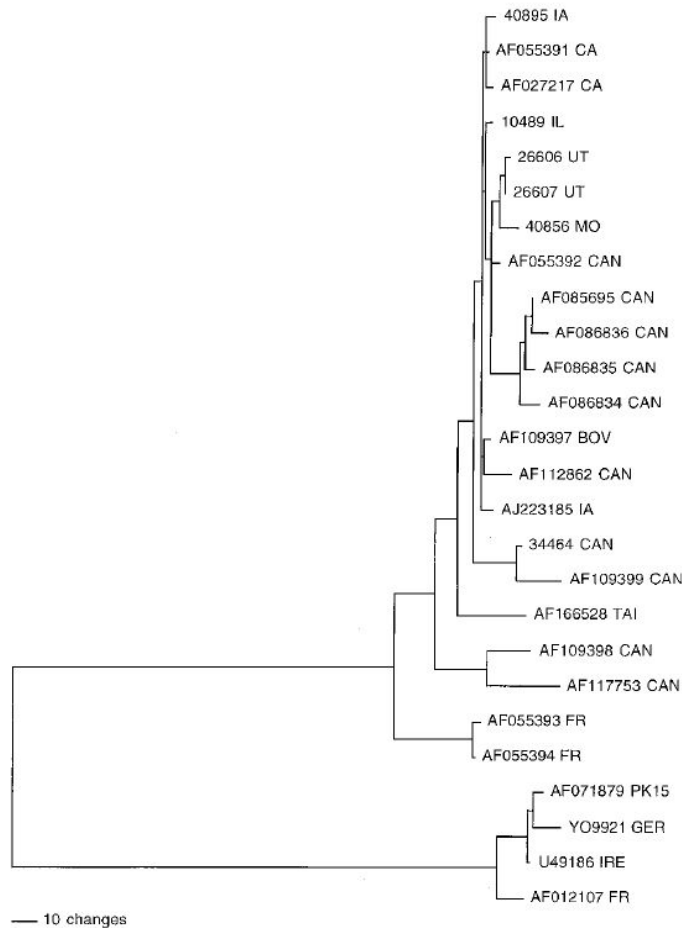


Figura 3 Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica completa de isolados do CVS-2 e construída através do programa PAUP (Fenaux *et al.*, 2000).

Hamel e colaboradores (2000) identificaram e caracterizaram sequências de CVS-2 originárias do Canadá em cinco categorias chamadas de CVS-2A-E. A comparação dessas com as sequências de isolados do CVS-2 até então disponibilizadas no Genbank e a observação da árvore filogenética construída permitiu inferir que: todas as sequências estudadas tinham proximidade filogenética correspondendo a um grupo distinto em relação ao CVS-1; que os isolados dos EUA pareciam estar relacionados com as sequências nomeadas de CVS-2A, B e E (**Figura 4**); que os isolados de Taiwan pareciam estar próximos daqueles dos EUA; que os isolados do Canadá mostravam maior proximidade com a sequência nomeada CVS-2B e que as sequências nomeadas de CVS-2 C e D mostravam maior similaridade com isolados da França.

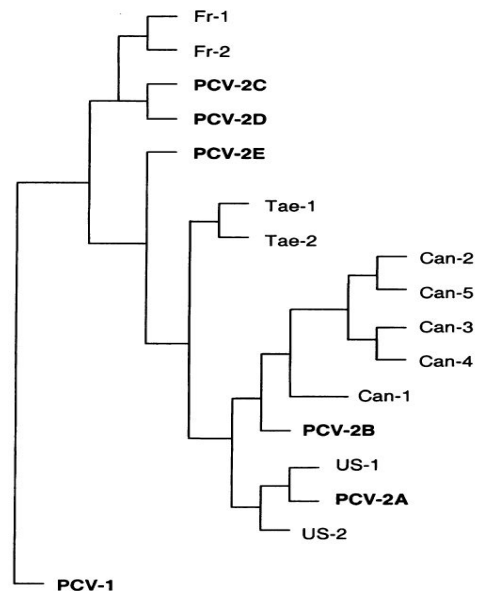


Figura 4 Árvore filogenética construída a partir das sequências CVS-2A-E do presente estudo e de 11 sequências disponibilizadas do Genbank e originárias do EUA, Canadá, França, e Taiwan (Hamel *et al.*, 2000).

Ainda no ano 2000, Mankertz e colaboradores estudaram a relação entre CVS-2 isolado de animais afetados com SACS na Alemanha, Espanha e França com sequências disponíveis no Genbank de isolados do Canadá, Taiwan e, EUA. A partir dos resultados obtidos os autores hipotetizaram que poderia haver uma rota de transmissão ou re-transmissão do CVS-2 entre os continentes e que os isolados da Europa, Canadá e Taiwan estariam relacionados enquanto aqueles dos EUA seriam filogeneticamente diferentes e, portanto agrupados separadamente em outro ramo.

Larochelle e colaboradores (2002) estudaram isolados do Oeste do Canadá identificados em surtos de infecção nos anos 1990 a 2001 de casos apresentando variedade de condições clínicas, e os compararam filogeneticamente com outros

disponibilizados no Genbank e originários de USA, França, Alemanha, Espanha, Holanda, Reino Unido, Taiwan, China. As análises filogenéticas de todas as sequências revelaram um grande grupo ou genótipo bem distinto e composto de isolados da Europa, Taiwan, China e Canadá (3 sequências do Genbank e 13 sequências do presente estudo), dividido em vários pequenos subgrupos, em dois dos quais os isolados do Canadá do presente estudo foram filogeneticamente mais próximos de isolados da Alemanha. Enquanto que as demais sequências a partir do EUA e do Canadá (8 sequências do Genbank e 21 do presente estudo) foram observadas num outro grupo ou genótipo, dispersas em pequenos agrupamentos (**Figura 5**).

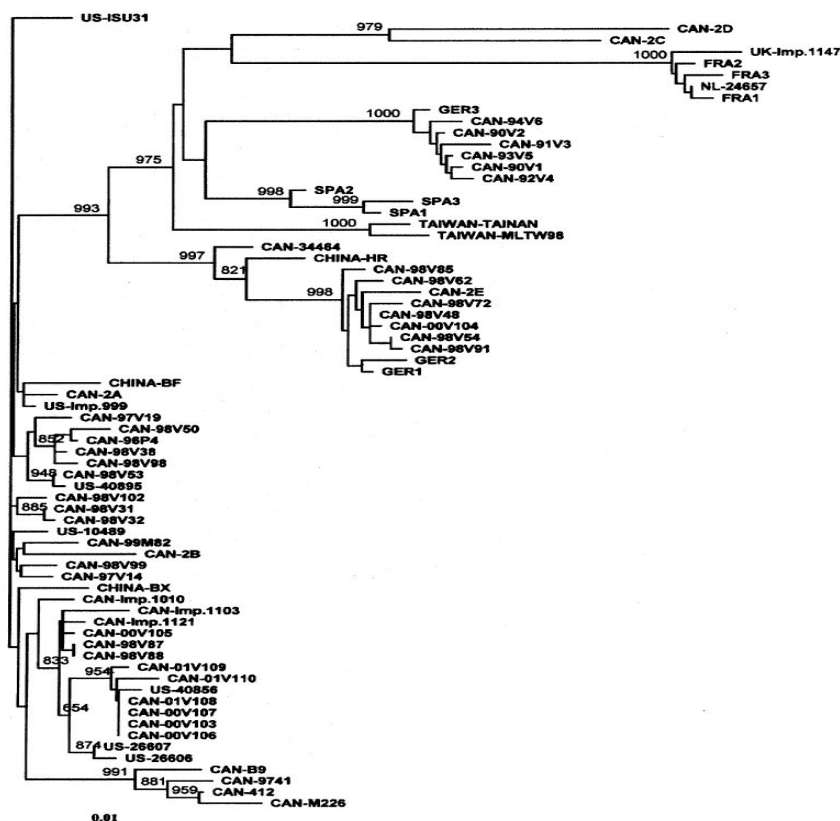


Figura 5 Árvore filogenética construída a partir de 34 isolados do CVS-2 do Canadá e de 36 sequências do vírus disponibilizadas no Genbank (Larochelle *et al.*, 2002).

O alinhamento de aminoácidos da proteína codificada pela ORF2 nas sequências do presente trabalho permitiu a identificação de três regiões de heterogeneidade de aminoácidos consideradas principais entre os isolados do CVS-2: posições 59-80, 121-136, e 180-191, sendo que duas dessas regiões (59-80, 121-136) correspondiam a duas áreas imunoreativas dominantes (65-87 e 113-147) identificadas previamente por Mahé *et al.* (2000). Os autores discutiram a possibilidade de exposição dessas regiões imunodominantes da proteína do capsídeo à pressão imune seletiva e conseqüente envolvimento na emergência de variantes do CVS-2. Entretanto, não foi possível relacionar dentre as sequências observadas nenhum aminoácido *motif* para estas duas regiões da proteína do capsídeo que pudessem ser associados com os isolados identificados a partir de casos clínicos da doença ou de outras condições clínicas. Os autores apoiaram sua hipótese na argumentação de que determinantes da virulência viral são geralmente multigênicos enquanto que os determinantes da resistência e/ou suscetibilidade do hospedeiro são multifatoriais e dessa forma a existência ou papel de outros genes ou mesmo de regiões gênicas na virulência dos isolados do CVS-2 não poderiam ser excluídos. Assim apesar dos esforços, mais uma vez, não foi possível estabelecer quais e se regiões imunodominantes poderiam estar realmente incriminadas com marcadores moleculares da doença.

Os surtos de infecção pelo CVS-2 em suínos continuaram sendo relatados e confirmados por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo, independente das condições de manejo, sanitárias e de saúde dos plantéis. Pesquisas visando à caracterização genética do vírus assim como a identificação de novos variantes prosseguiram e um grande número de isolados de diferentes países com alta similaridade de nucleotídeos (95 a 100%) foi identificado e suas sequências disponibilizadas no Genbank. Estudos

moleculares foram conduzidos na tentativa de relacionar as variações genéticas do CVS-2 com mutações, pressão seletiva, alterações na patogenicidade, e origem geográfica, entretanto, apesar de todos os esforços conduzidos não foi identificado qualquer marcador molecular que pudesse ser associado com alguma característica particular da doença (Fenaux *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002; Larochelle *et al.*, 2002; Pogradichny *et al.*, 2002; De Boisséson *et al.*, 2004).

Após os primeiros relatos o CVS-2 tornou-se quiescente no Canadá, exceto por casos esporádicos, e somente em 2004 foi observado evidente aumento na incidência e severidade da SACS no Oeste do Canadá (Delay *et al.*, 2005), difundindo-se nos Estados Unidos, paralelamente, através da Carolina do Norte e nos estados do Meio-Oeste, com relatos sobre uma possível introdução de uma nova amostra dentro da América do Norte, uma variante mais virulenta.

De Boisséson e colaboradores (2004) estudaram filogeneticamente 47 isolados do CVS-2, 24 sequências disponibilizadas no Genbank (França, Espanha, Holanda, Reino Unido, Alemanha, USA, Canadá, Taiwan, China, Japão, Coreia) e 23 sequências do presente estudo, pertencentes a plantéis livres da SACS e com sinais clínicos da doença. Neste estudo os autores sugeriram a partir da construção da árvore filogenética que as sequências fossem distribuídas em dois diferentes genótipos (**Figura 6**).

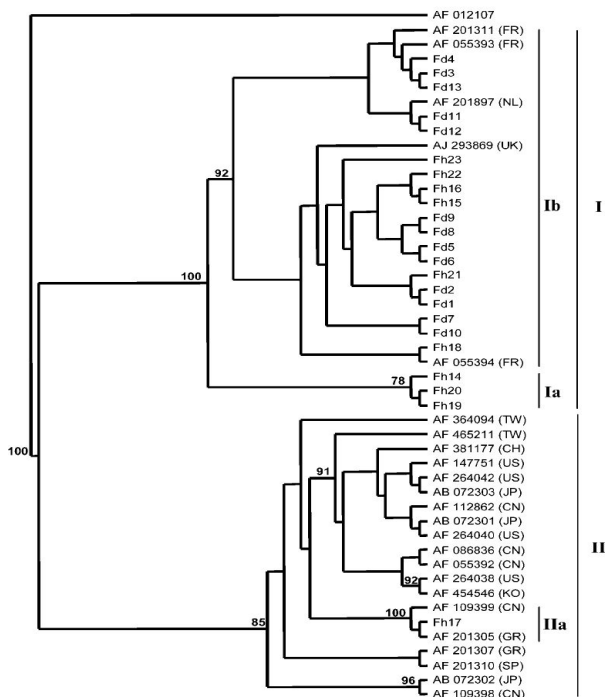


Figura 6 Árvore filogenética de 47 isolados do CVS-2: 23 sequências do presente estudo e 24 sequências disponibilizadas no Genbank (De Boissésou *et al.*, 2004).

No primeiro, denominado *cluster I*, foram agrupadas as sequências da França, Reino Unido e Holanda, enquanto no segundo grupo ou *cluster II*, foram reunidas todas as demais sequências a partir dos EUA, Ásia, Alemanha e Espanha. Foi observado pelos autores que as sequências agrupadas no grupo I (*cluster I*) apresentavam uma deleção de nucleotídeo localizado na parte C terminal da ORF2 resultando em uma alteração de aminoácido previamente descrita por Mankertz *et al.* (2000). Neste grupo foram detectados dois subgrupos (Ia e Ib) enquanto no grupo II (*cluster II*) foi identificado um subgrupo denominado de IIa. Um fato relevante neste trabalho foi a observação do alto grau de conservação entre as sequências, considerando a grande diversidade geográfica e a prevalência do vírus. Os autores sugeriram que este fato poderia ser o produto de diversos “gargalos” genéticos pelos quais o CVS-2 tenha sido submetido, ou ainda, ser relacionado com a

história do hospedeiro, uma vez que, evidências moleculares sugeriam que a domesticação de suínos ocorreu à aproximadamente 9000 anos atrás, tendo havido uma enorme introdução de suínos na Europa nos séculos 18 e 19 a partir da Ásia. Diante dessas afirmações os autores concluíram que os surtos de infecção pelo CVS-2 não estariam relacionados com a introdução de novas variantes, que o CVS-2 deveria ser considerado bem adaptado ao hospedeiro devido a sua alta prevalência entre animais saudáveis (sem sinais clínicos da doença) e, que como apenas um clone do vírus foi identificado em cada animal provavelmente a taxa de mutação do genoma do CVS-2 poderia ser considerada de maneira geral como baixa. Entretanto os autores ressaltaram que possivelmente a capacidade de evolução do CVS-2 até micro regiões geográficas poderia ser considerada evidente, desde que diferentes clones do vírus foram identificados em todas as propriedades avaliadas.

Opriessnig e colaboradores (2006) buscaram estabelecer correlação entre variantes originários de animais com e sem lesões da SACS e a patogenicidade do CVS-2 em estudo experimental com suínos SPF. Foi estudada a identidade de nucleotídeos, o número de cópias do vírus no soro e ainda, as lesões microscópicas induzidas com a detecção do antígeno viral. Foi determinado que os isolados estudados, originários dos EUA, além de geneticamente diferentes, tinham distinta virulência, possivelmente devido às diferenças observadas nos aminoácidos da ORF2, uma vez que mutações na proteína do capsídeo poderiam afetar a montagem da partícula vírica, a replicação viral, e a capacidade de ligação aos receptores do hospedeiro.

O aumento na incidência da SACS nos plantéis do Canadá impeliram o grupo de Gagnon (2007) a desenvolver um estudo envolvendo 13 casos de SACS isolados da província do Quebec no ano de 2005, e mais

57 sequências disponibilizadas no Genbank previamente utilizadas por Larochele *et al.* (2002). As análises filogenéticas determinaram a mesma divisão em dois genótipos, descrita por Larochele *et al.* (2002), detectaram alta similaridade de aminoácidos (99 a 100%), e identificaram isolados do CVS-2 no genótipo 2b que nunca tinha detectado no Canadá. Diante destes resultados inusitados os autores avaliaram outras 83 sequências de casos positivos de infecção pelo CVS-2 no Canadá, nos anos de 2005 e 2006, e determinaram que 79,5% destas sequências pertenciam ao genótipo 2b, confirmando definitivamente a presença do genótipo 2b do CVS-2 no Canadá assim como na Europa e Ásia.

Nessa mesma época, vários outros grupos de pesquisa identificaram o genótipo CVS-2b relacionado com casos severos da doença nos EUA e Europa (Carman *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2007; Horlen *et al.*, 2007; Dupont *et al.*, 2008; Grau-Roma *et al.*, 2008).

Castro *et al.* (2007) avaliou 870 animais durante o período de abril de 2001 a outubro de 2004, detectando o CVS-2 em 20 (2,3%) suínos, sendo nove animais da categoria maternidade (≤ 60 dias), seis animais do crescimento (>60 dias) e cinco animais de abate, sendo três refugo (95Kg e 150 dias de idade) e dois normais (95Kg e idade ± 150 dias). Apenas 19 isolados tiveram 699 nucleotídeos sequenciados correspondente a ORF-2. As sequências nucleotídicas dos isolados foram alinhadas, tendo sido utilizado 12 sequências do GenBank como referência originárias Estados Unidos Canadá, Reino Unido, África do Sul, Taiwan, China, Japão, Coreia, Áustria, Hungria, França. A identidade entre as 19 amostras brasileiras foi de 91,9-100%, com 64 sítios polimórficos, tendo sido considerada bastante alta e relevante por envolver amostras de origens geográficas tão distintas. Os autores correlacionam com este

fato à baixa pressão de seleção e a ausência de introdução de novas variantes, possivelmente devido a mesma origem genética dos plantéis nas diferentes regiões. Dentre as amostras com 100% de identidade, uma era originária do estado de Minas Gerais enquanto outra de Santa Catarina. O alinhamento das sequências brasileiras com de outros países demonstrou uma identidade de nucleotídeos variando de 91,2-100%. Foi observada 100% de identidade entre a amostra 10 (Minas Gerais) e as amostras FRA2 e UK, possivelmente devido a importação de suínos da Europa com introdução em plantéis de Santa Catarina e Minas Gerais. A árvore genealógica construída pelo algoritmo Neighbor-Joining demonstra a divisão das 19 amostras brasileiras em dois grandes grupos, CVS-2A e CVS-2B, tendo sido o grupo denominado de CVS-2B subdividido em dois subgrupos. Através da análise filogenética neste trabalho foi demonstrado a presença dos subtipos CVS-2A e B no Brasil e sua relação com isolados de outros países (**Figura 7**).

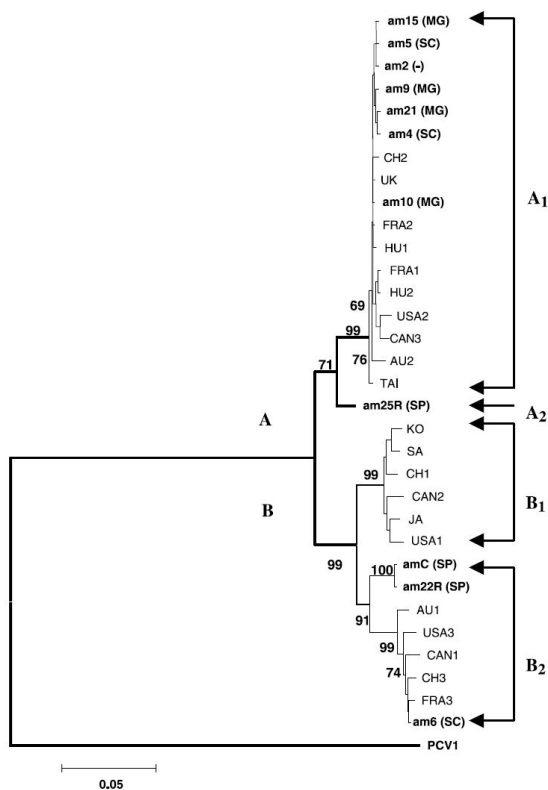


Figura 7 Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) dos 19 isolados brasileiros e 12 seqüências disponibilizadas no Genbank originárias de diferentes países (EUA, Canadá, Reino Unido, Áustria, França, Hungria, África do Sul, Taiwan, China, Japão) (Castro *et al.*, 2007).

Ainda em 2007, Olvera e colaboradores utilizando marcadores de posição *indel* (mutação causada pela inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos) no genoma dos genes ORF2 (gene *cap*) e ORF1 (gene *rep*) sugeriram o agrupamento dos isolados do CVS-2 em dois grupos (ou genótipos): grupo 1 (1767 nucleotídeos) subdividido nos subgrupos 1A a 1C, e grupo 2 (1768 nucleotídeos) subdividido nos subgrupos 2A a 2E (**Figura 8 e 9**), e, também, a possibilidade de diferenciação dos dois genótipos baseado em uma posição *indel*, localizada logo após o códon de parada do gene da ORF2 na posição 1033 no genoma do CVS-2.

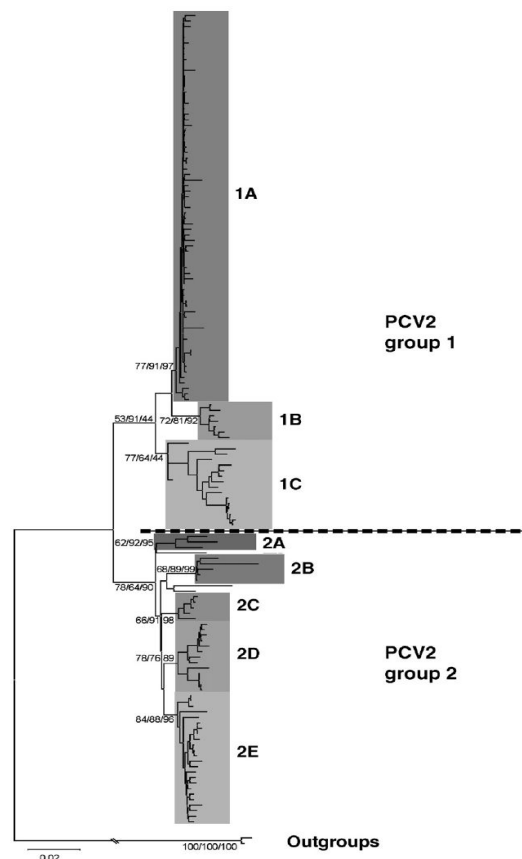


Figura 8 Árvore filogenética baseada no método de *Neighbor-Joining* (NJ) demonstrando o agrupamento de seqüências do CVS-2 nos grupos 1 e 2 e seus respectivos subgrupos (Olvera *et al.*, 2007).

CVS-2 em amostras coletadas a partir de suínos saudáveis e afetados pela SACS, no período pré e pós reconhecimento da SACS na Suécia. Através de alinhamentos múltiplos das sequências da ORF2 amplificadas nas amostras do estudo, foram identificados três principais genótipos (SG1, SG2, SG3), que comparados com isolados previamente classificados segundo Olvera *et al.* (2007) demonstraram similaridade gênica. Diferenças nas sequências de aminoácidos dentro da proteína codificada pela ORF2 nos três genótipos foram estudadas. Os resultados demonstraram que nas posições 57-91 houve substituição de K e I em SG1 e SG2 e P e R

em SG3, refletindo modificação nucleotídica de AAAATC em SG1 e SG2 para CCCCCG em SG3. A comparação desses resultados com Cheung *et al.* (2007) permitiu reconhecer os genótipos SG1 e SG2 dentro do CVS-2 do grupo 2 e SG3 em CVS-2 do grupo 1. A fim de estudar a possibilidade de uma correlação entre os genótipos e a doença foram amplificadas sequências do gene da ORF3 nas amostras. Através do alinhamento múltiplo das sequências da ORF3 e daquelas da ORF2 foi possível estabelecer correspondência entre genótipos (SG1 a SG3) de ambas as ORFs (Figura 10).

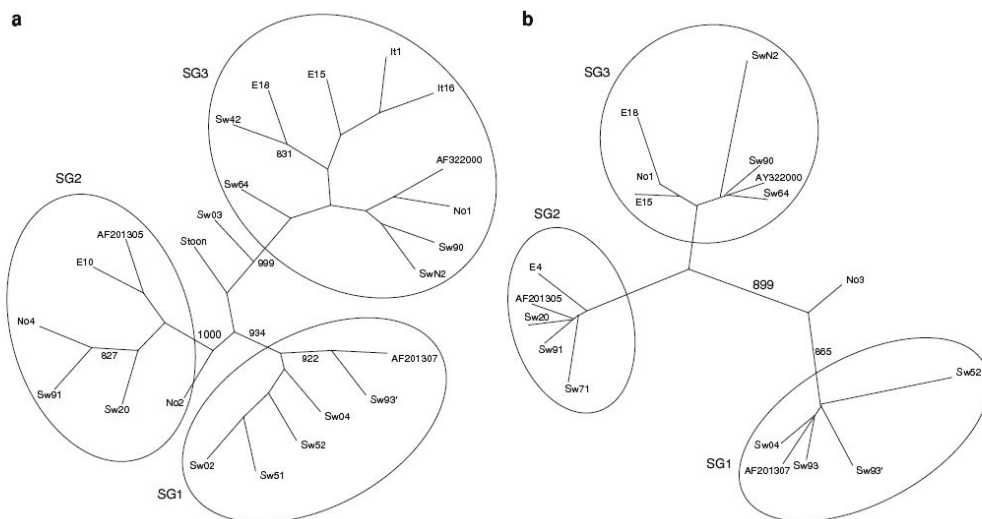


Figura 10 Árvores filogenéticas baseadas na ORF2 (a) e ORF3 (b) do CVS-2 com as sequências genômicas representativas dos três genótipos (SG1, SG2, SG3) (Timmusk *et al.*, 2008).

Uma vez que havia na literatura a presunção de envolvimento da ORF3 com a patogenicidade do CVS-2 (Liu *et al.*, 2006) os autores procuraram estabelecer uma correlação entre os genótipos da ORF3 e os sinais clínicos, lesões patológicas e imunohistoquímica dos isolados. Tendo sido possível observar que os isolados agrupados em SG1, detectados apenas em criatórios livres da doença, exibiam alta estabilidade genética e pareciam estar relacionados à cepa menos patogênica do CVS-2 circulante

na Suécia; os isolados agrupados em SG2, localizados em fazendas com detecção recente da SACS foram sugeridos como moderadamente patogênicos enquanto que isolados de SG3 predominaram em criatórios com histórico da SACS e foram considerados como de maior virulência, e incriminados com o desenvolvimento dos sinais clínicos da doença nos plantéis da Suécia. Estes resultados indicaram a possibilidade de correlacionar os genótipos da ORF3 do CVS-2 com a manifestação

clínica da doença e a ORF3 como marcador de epizootia nos plantéis.

O uso corrente de diferentes classificações que variavam segundo os grupos de pesquisa conduziram a busca por uma nomenclatura concordante que facilitasse as comparações interlaboratoriais. O Consórcio sobre Doenças pelo Circovírus da União Européia propôs a padronização desta nomenclatura em três grupos como CVS-2a, CVS-2b e CVS-2c, baseado em estudos que demonstraram o CVS-2a predominante em fazendas com e sem a SACS nos anos de 1997 até 2003, o CVS-2b em casos de SACS a partir de 2004 na América do Norte e em alguns países da Europa e o CVS-2c em apenas três sequências originárias da Dinamarca, nos anos 80, quando a SACS ainda não estava presente ou pelo menos detectada (Segalés *et al.*, 2008). Entretanto o consenso somente foi estabelecido quando foi aceita a proposição dos genótipos classificados em 1 e 2 por Grau Roma *et al.* (2008) correspondendo, respectivamente, aos grupos “I e II” de De Boisséson *et al.* (2004), “1 e 2” de Olvera *et al.* (2007) e de Cheung *et al.* (2007), “A e B” de Castro *et al.* (2007), “a e b” de Gagnon *et al.* (2007), “SG1; SG2, SG3” de Timmusk *et al.* (2008), com os respectivos subgrupos 1A a C e 2A a E sugeridos por Olvera *et al.* (2007).

Uma vez estabelecido os genótipos do CVS-2 e seus subgrupos e sua distribuição geográfica, ainda permanecia obscuro a correlação dos grupos 1 e 2 com a patogenicidade do CVS-2 e a possibilidade de existência de variantes. Hesse *et al.* (2008) afirmaram que o grupo 1 subgrupo A do CVS-2 está normalmente associado a casos das Síndromes Associadas à Circovirose Suína tendo sugerido que a recombinação no gene *Rep* pudesse ocorrer entre variantes coexistentes.

Grau-Roma *et al.* (2008) estudando diferenças na patogenicidade entre os grupos 1 e 2, conseguiram confirmar os resultados

alcançados por Cheung *et al.* (2007) sobre diferenças na patogenicidade entre os genótipos do CVS-2 através de diferenças observadas em sequências da ORF2 de propriedades com a SACS (com predomínio do grupo 1) e sem a SACS (todos apresentando o genótipo 2) e estabelecer que o genótipo 1 pudesse ser potencialmente mais patogênico do que o genótipo 2. Adicionalmente analisando sequências disponibilizadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) até setembro de 2005 detectaram que a principal variabilidade era encontrada nas sequências do genótipo 2 sugeriam que este fosse mais antigo do que o genótipo 1. Além disso, confirmaram os resultados obtidos por Laroche *et al.* (2002) e Pogranichniy *et al.* (2002) de que dentro das propriedades afetadas não há associação entre as sequências do CVS-2 encontradas em um animal e seu estado clínico possivelmente devido ao fato de que mesmo com a presença de múltiplas sequências de CVS-2 num mesmo animal o sequenciamento pode detectar apenas um dos vírus presentes.

Chiarelli-Neto e colaboradores (2008) estudaram a distribuição segundo Olvera *et al.* (2007) de isolados brasileiros, avaliaram a diversidade genética do vírus no Brasil e procuraram estabelecer se o CVS-2 foi introduzido no Brasil através de importação de suínos da Europa. Foram utilizados neste estudo 30 isolados brasileiros originários da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, sendo 17/30 identificados por Castro *et al.* (2007) e 301 sequências oriundas de USA, Canadá, Reino Unido, Suécia, Espanha, Romênia, Holanda, Hungria, Alemanha, França, Dinamarca, Áustria, China, Taiwan, Japão, Coreia, Coreia do Sul e África do Sul, disponibilizadas no Genbank. Dentre os 30 isolados brasileiros, 28 foram agrupados no grupo 1, subgrupo AB e 2 no grupo 2, tendo sido uma sequência agrupada no subgrupo 2D enquanto outra apresentou proximidade com os subgrupos 2A e 2D embora não

tenha sido incluída em qualquer subgrupo (Figura 11). Os resultados indicaram que a diversidade genética dos isolados brasileiros concentrou-se dentro do subgrupo 1AB.

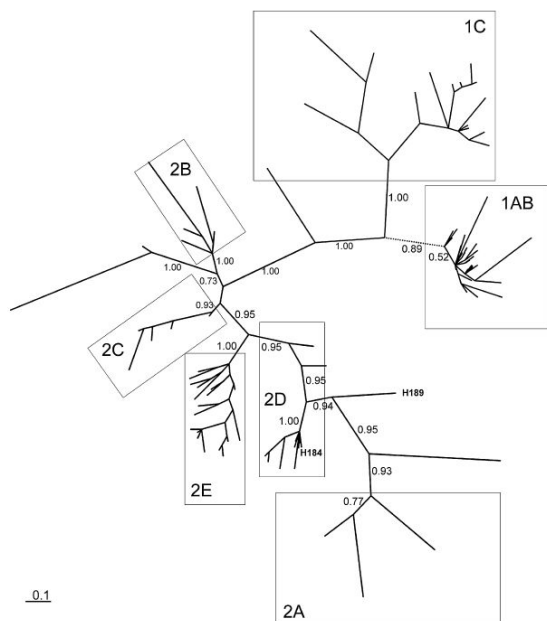


Figura 11 Árvore filogenética construída com 30 isolados brasileiros e 301 sequências disponibilizadas no Genbank originárias de EUA, Canadá, Europa, Ásia e África (Chiarelli-Neto *et al.*, 2008).

Além da árvore filogenética, foi construída rede filogeográfica com todas as sequências, a fim de se observar a frequência de cada haplótipo em relação a sua origem geográfica. Essas observações sugeriram que provavelmente a maioria dos isolados brasileiros seriam derivados ou descendentes da Europa e Ásia, devido à importação de sêmen ou de suínos, possivelmente através de eventos singulares capazes de disseminar a SACS no Brasil.

Em 2009 o grupo de Ciacci-Zanella estudou 6 isolados brasileiros originários de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais e comparou com outras 35 sequências originárias de USA, Canadá, França, Áustria, Holanda, Alemanha, Hungria, Espanha, China, Taiwan, Japão e África do Sul e Brasil disponibilizadas no

Genbank. A análise filogenética do genoma completo de 6/17 isolados brasileiros demonstrou que apenas um apresentava 1767 nucleotídeos correspondendo ao grupo 1 do CVS-2 conforme sugerido por Olvera *et al.* (2007), enquanto os demais foram agrupados no grupo 2 (subgrupos D e E). Os resultados encontrados pelos autores confirmaram os achados de Castro *et al.* (2007) e Chiarelli-Neto *et al.* (2008) de que ambos os grupos 1 e 2 do CVS-2 podem atualmente ser encontrados em plantéis brasileiros.

3.7 Seleção genética

Através da pressão de seleção positiva, mudanças particulares que alteram as sequências encontradas em sítios selecionados dentro do genoma dão ao organismo vantagem sobre outros organismos. A pressão seletiva pode ser determinada pela taxa de *acceptance* (ω) (Miyata e Yasunaga, 1980) que mensura a relação das mutações do tipo substituições nas posições nucleotídicas que podem alterar o aminoácido codificado (chamado de taxa de substituições nucleotídicas não sinônimas, ou dN) pelas substituições em posições nucleotídicas que não alteram o aminoácido codificado (taxa de substituição sinônima de nucleotídeos, ou dS). As mutações sinônimas são invisíveis para a seleção natural enquanto que as não sinônimas podem estar sob forte pressão de seleção, portanto a comparação entre dS e dN permite observar as taxas de substituição de genes codificantes de proteínas e fornece meios importantes para a compreensão da evolução molecular.

O estudo da adaptação evolutiva utilizando a análise de taxas de substituições envolve duas etapas básicas. A primeira envolve a reconstrução da história evolucionária do gene na forma de uma árvore filogenética que descreve as mudanças que ocorrem enquanto as sequências descendem de um antepassado comum. Na segunda etapa, a

árvore é usada para estimar as taxas de substituições nucleotídicas não sinônimas e sinônimas ao longo do tempo (Bush, 2001). Para tanto foram desenvolvidos modelos que esclarecem as relações heterogêneas de ω entre sítios de aminoácidos aplicando às análises filogenéticas de sequências codificantes de proteína no DNA. Todos os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram ajustados para estes modelos com diferentes hipóteses sobre a distribuição dos valores estimados (Yang et al., 2000): (1) M0 supõe que um valor de ω para todos os codons; (2) M1 divide os codons em uma classe invariante p_0 , onde ω seja ajustado em zero (seleção de purificação) e em uma classe neutra p_1 , onde ω seja ajustado em um (evolução neutra); (3) O M2 inclui p_0 e p_1 de M1, e adiciona uma terceira classe (p_2), onde ω é estimado a partir dos dados subjacentes podendo ser maior que um; (4) O M3 divide os codons entre as três classes dos sítios (p_0 , p_1 , e p_2) e ω é estimado independentemente para todas as três classes e pode ser maior que um; (5) M7 caracteriza dez classes modeladas com uma beta distribuição discreta. A forma da distribuição é determinada pelos parâmetros p e q , e os valores de ω para estas classes não podem ser maiores que um; e (6) M8 inclui as dez classes de M7 (referido coletivamente como p_0), e utiliza uma classe adicional (p_1) onde ω pode ser maior de um.

Os modelos M0 e M1 são agrupados com modelos M2 e M3, e o modelo M7 é agrupado com M8. Os modelos que são agrupados juntos podem ser comparados estatisticamente usando um teste de razão de verossimilhança (*likelihood*) em que a diferença entre os valores da probabilidade de registro para dois modelos é comparada duas vezes com uma tabela de distribuição X^2 com os graus de liberdade iguais à diferença no número de parâmetros entre os dois modelos (Yang et al., 2000).

Esta comparação fornece um valor de P para a probabilidade que a hipótese nula

(nenhuma seleção positiva, personificada nos modelos M1 e M7) é um ajuste igualmente bom ou até melhor para os dados quando comparada aos modelos agrupados que permitem a possibilidade de seleção positiva.

A seleção positiva é pressuposta nesta análise quando (1) modelam o M2, M3 ou M8 indicando um grupo de codons com uma relação maior que um para ω , e (2) a probabilidade do modelo de seleção positivo é significativamente mais elevada do que aquela do modelo agrupado da hipótese nula (em $P < 0,05$). O modelo M0, que supõe única relação de ω para todas as linhagens, e o modelo das relações livres podem ser igualmente comparados.

Após obter os parâmetros através do teste ML, o teorema de Bayes foi usado para calcular as probabilidades de códons individuais, pertencentes a sítios distintos, predizerem aqueles que estão sob seleção positiva. O programa forneceu a lista de sítios dos códons com probabilidade $\geq 0,5$ de estarem na classe selecionada positivamente.

3.8 Filogeografia

A filogeografia é um campo de estudo baseado nos princípios e processos responsáveis pela distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas intra-específicas ou entre espécies relativamente próximas. Para que seja possível analisar e interpretar a forma como são distribuídas as linhagens, um estudo filogeográfico deve utilizar o máximo de informações possíveis, incluindo dados de genética molecular, genética de populações, demografia, filogenética, geologia, geografia histórica, entre outros (Avice, 2000).

Estudos filogenéticos e filogeográficos auxiliam no entendimento da evolução das diferenças moleculares, morfológicas, comportamentais e fisiológicas dos

organismos (Mindell *et al.*, 1997), numa boa análise comparativa desses caracteres e nas reconstruções biogeográficas (Harvey e Pagel, 1991). De modo geral, a filogeografia age como uma ponte de ligação entre as disciplinas de filogenia e genética de populações (Avise *et al.*, 1987) e constituiu-se em esforço integrativo, entre diversas disciplinas micro e macroevolutivas (Avise, 2000).

Os estudos de filogeografia possibilitam o entendimento da evolução das diferentes linhagens e sua relação com os eventos históricos determinantes de sua diversificação. Com o advento do sequenciamento de DNA foi possível estudar a genética de populações sobre uma nova óptica. Avise *et al.* (1987) propuseram a designação do termo “filogeografia” para “o campo de estudo envolvido com os princípios que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas de alelos, especialmente em nível intra específico”. Filogeografia é o estudo da distribuição geográfica das linhagens de genes dentro de uma espécie, ou em espécies próximas. A filogeografia é a ponte entre a genética de populações e a sistemática, entre os eventos microevolutivos, que operam entre indivíduos distribuídos em populações que levam à mudança de frequências gênicas ao longo das gerações e os eventos macroevolutivos que dizem respeito à diferenciação entre espécies e táxons superiores. Por este motivo Avise (2000) considerou a filogeografia como o estudo da formação das espécies.

3.9 Epidemiologia do Circovírus suíno do tipo 2

A morbidade da infecção pelo CVS-2 foi associada com o desenvolvimento da viremia e linfopenia nos animais com sinais clínicos da doença e a mortalidade avaliada em taxas de 10% a 50% (Gillespie *et al.*, 2009).

Foi determinado que a infecção subclínica pelo CVS-2 pode ocorrer em até 100% dos animais especialmente naqueles suínos em fase de crescimento pertencentes a um rebanho infectado. Apesar do aparecimento dos sinais clínicos estar relacionado com eventos ou fatores tais como: coinfeções, vacinações e stress, que desencadeiem estimulação do sistema imune e ativação do CVS-2 em macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, resultando na replicação do vírus e expressão clínica da doença (Krakowka *et al.*, 2001).

Pesquisas revelaram a presença do CVS-2 nos tecidos afetados, especialmente órgãos linfóides. Entretanto, as iniciativas de reprodução experimental da doença através da inoculação do CVS-2 não alcançaram resultados satisfatórios (Allan *et al.*, 1999).

Condições ambientais desfavoráveis tais como superpopulação, baixa qualidade do ar, misturas entre grupos de idades diferentes e outros fatores estressantes podem exacerbar a severidade da doença (Allan e Ellis, 2000; Pogranichniy *et al.*, 2002; Wallgren *et al.*, 2004; Vigre *et al.*, 2005). Na Nova Zelândia, foi possível estabelecer uma conexão entre as propriedades afetadas pela SACS e baixas condições de bioseguridade no manejo. O trânsito livre entre as propriedades é outro fator de risco na transmissão horizontal da SACS entre propriedades e deve ser considerado nos estudos da disseminação espaço-temporal da doença (McIntosh *et al.*, 2006; Lohse *et al.*, 2008).

Tem sido demonstrado, também, que raças de suínos tais como Landrace parecem ser mais susceptíveis ao CVS-2 do que Duroc ou Large White. Um estudo comparativo da suscetibilidade de suínos derivados das raças Pietrain, Duroc e de linhagens de Large White determinou que animais originários da mistura entre Duroc e Large White são mais susceptíveis a infecção pelo CVS-2 do

que suínos raça-pura Pietrain (Opriessnig *et al.*, 2006; Ramamoorthy e Meng, 2008).

Albina *et al.* (2001) e Kristensen *et al.* (2006) demonstraram o risco da transmissão horizontal da SACS dentro de propriedades livres da doença a partir de outras já infectadas. Estudos indicam que a transmissão horizontal da doença pode se dar através do contato direto entre animais doentes e sadios, através das vias oro-nasal e oro-fecal (Lohse *et al.*, 2008). A presença deste agente em fetos entre 32 e 114 dias de gestação (Ohlinger *et al.*, 2000) e em leitões neonatais sugere que a transmissão vertical é importante (Sibilla *et al.*, 2001). Isto pode ser relacionado não somente com falhas reprodutivas, mas também com o desenvolvimento da doença multissistêmica, posteriormente na vida do animal (Bogdan *et al.*, 2001). Larrochelle *et al.* (1999) e Hamel *et al.* (2000) detectaram a presença do vírus em amostras de sêmen e sugeriram um risco potencial de disseminação do CVS-2 através da inseminação artificial (Larochelle *et al.*, 2000; McIntosh *et al.*, 2006).

A severidade da SACS dentro das propriedades assim como sua duração também pode ser variável. Podendo a doença em casos severos ser interrompida em 3 a 6 meses com a aplicação de medidas de manejo e higiene rigorosas, enquanto que pode manter-se por mais que 2 anos naquelas propriedades relutantes em alterar suas práticas de manejo (Madec *et al.*, 2000).

3.10 Sinais Clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas

Em geral os sinais clínicos da doença são inespecíficos. Clinicamente a doença caracteriza-se por refugagem progressiva, baixa condição corporal, depressão, linfadenopatia, edema generalizado, anemia, dispnéia, e às vezes icterícia e diarreia,

úlceras gástricas, tosse (Larrochelle *et al.*, 1999; Darwich *et al.*, 2004). Mesmo leitões identificados como sobreviventes apresentam falha no crescimento exibindo um deficiente ganho de peso e desuniformidade de carcaça, o que resulta em grande perda econômica para o produtor.

Macroscopicamente são encontradas lesões granulomatosas em vários órgãos especialmente linfonodos mesentéricos e inguinais, pulmão, rins, intestino grosso. Além de marcada atrofia do timo em animais severamente afetados (Ellis *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1999; Segalés *et al.*, 2004a; Opriessnig *et al.*, 2007).

Geralmente há uma evidente linfadenopatia sistêmica, especialmente envolvendo os linfonodos inguinais, mesentéricos, brônquicos e mediastinais que podem apresentar-se brancos e homogêneos à superfície de corte. Alterações similares são observadas nas placas de Payer e no baço. O fígado pode apresentar desde uma discreta icterícia até atrofia com acentuada presença de tecido conjuntivo interlobular. Nos rins podem ser observados pontos brancos na córtex renal, edema e aumento de tamanho do órgão. É comum encontrar em suínos afetados com a SACS pulmões com consolidação crânio-ventral e colapso. No caso de envolvimento do trato gastrointestinal pode haver palidez, edema e ulceração não hemorrágica da porção par-esofágica do estômago, além de espessamento das paredes do intestino com preenchimento por fluido, especialmente no intestino delgado (Allan e Ellis, 2000; Segalés *et al.*, 2004a; Opriessnig *et al.*, 2007).

O comprometimento de um ou mais órgãos é bastante variável em animais acometidos pela SACS e os fatores que determinam esta característica não estão bem compreendidos, mas podem estar associados à presença de agentes coinfecciosos bacterianos, diferenças entre isolados do vírus, estágio da

infecção, além de diferenças genéticas ou da resposta imune do hospedeiro (Allan e Ellis, 2000).

As lesões microscópicas da SACS em tecidos linfóides são bastante particulares em suínos. Há variável grau de depleção de linfócitos com perda da arquitetura folicular em quase todos os animais acometidos, afetando tanto os folículos linfóides como as zonas paracorticais. Este achado geralmente é observado em combinação com uma multifocal a difusa, discreta a muito evidente infiltração celular histiocitária, que frequentemente contém corpúsculos de inclusão citoplasmáticos basofílicos vistos como grandes inclusões individuais (sincícios) ou como corpos pequenos múltiplos (Clark, 1996; Chianini *et al.*, 2003; Darwich *et al.*, 2004; Segalés *et al.*, 2004b). Nos folículos podem ser observadas células dendríticas foliculares caracterizadas por células grandes com abundante citoplasma eosinofílico, além de ocasionais células sinciciais ocupando o centro do folículo. Lesões na zona de células T dependentes (zona paracortical) dos linfonodos caracterizam-se geralmente por depleção de pequenos linfócitos. Nestas áreas, o estroma fibrovascular pode apresentar-se mais evidente. Grandes células mononucleares e figuras mitóticas ocasionais podem também ser encontradas dispersas nos componentes do estroma. Nos sinusóides corticais dos linfonodos pode haver a infiltração de grandes células histiocitárias, que pode variar em intensidade iniciando como agregados de células entre as trabéculas sinusais e estendendo através áreas de zonas parafoliculares em casos severos. Células sinciciais podem ser observadas nos sinusóides corticais, embora possam aparecer também em zonas paracorticais. Além disso, pode ainda ser observada depleção linfo-celular dos cordões medulares com esvaziamento dos seios medulares em variados graus (Rosell *et al.*, 1999). Lesões necrotizantes em linfonodos

associados também têm sido observadas em suínos severamente afetados pela SACS (Segalés *et al.*, 2004a).

Alterações nas placas de Payer e tonsilas podem consistir de depleção de células linfóides na área interfolicular, despovoamento de folículos com células estromais claramente evidentes, e, esporádico aparecimento de células sinciciais dentro dos folículos. Também pode ser observada a infiltração da área interfolicular com histiócitos e a presença de inclusões citoplasmáticas em células histiocitárias (Rosell *et al.*, 1999).

O baço pode apresentar depleção de células linfóides a partir das bainhas linfóides periarteriolas e infiltração de células histiocitárias na mesma área. Células sinciciais e inclusões intracitoplasmáticas podem ser encontradas ocasionalmente (Rosell *et al.*, 1999).

As infiltrações linfo-histiocitárias podem também ocorrer no fígado, rim e pulmões (Allan *et al.*, 1998a; Ellis *et al.*, 1998; Kiupel *et al.*, 1998).

As lesões hepáticas têm sido descritas como infiltração inflamatória linfocitária na zona portal, áreas de necrose de hepatócitos até a vacuolização do citoplasma de hepatócitos com cariomegalia e progressiva substituição dos hepatócitos pelas células histiocitárias (Clark, 1997; Allan e Ellis, 2000; Segalés *et al.*, 2004a). Em alguns animais pode ser observado severo comprometimento hepático caracterizado por fibrose perilobular generalizada, desorganização da estrutura hepática além de pronunciada perda de hepatócitos. Estas lesões estão associadas com icterícia e lesões macroscópicas no fígado (Segalés *et al.*, 2004a).

Nos rins pode ser observada nefrite intersticial subaguda severa à crônica (Segalés *et al.*, 2004a), infiltração multifocal

a difusa de histiócitos e linfócitos no tecido conjuntivo peri-pelvico com edema e proliferação de fibroblastos, além de vasculite multifocal não supurativa. Além de lesões corticais variando desde atrofia tubular multifocal e regeneração até extensa necrose tubular com edema e nefrite intersticial e fibroplasia (Allan e Ellis, 2000; Chae, 2004). Em alguns animais pode ser observada glomerulonefrite exsudativa aguda com presença de fibrina no espaço de Bowman e na lâmina tubular proximal (Rosell *et al.*, 1999).

Os pulmões podem apresentar pneumonia intersticial linfo-histiocitária, com destruição do epitélio bronquial e bronquiolar e presença de células inflamatórias nos septos alveolares. Em casos crônicos bronquiolite fibrosa obliterante pode estar presente (Clark, 1997; Segalés *et al.*, 2000; Segalés *et al.*, 2004a). Alguns animais podem apresentar depleção de linfócitos e infiltração histiocitária em tecido linfóide brônquio associado (Segalés *et al.*, 2004a). Ocasionalmente podem ser observadas células sinciciais no interior dos infiltrados inflamatórios (Rosell *et al.*, 1999).

Em casos onde há acometimento do trato gastrointestinal pode-se observar microscopicamente a atrofia das vilosidades acompanhada de discreta à severa infiltração linfocitocitária com variável descamação e ou regeneração das células epiteliais das criptas (Allan e Ellis, 2000).

3.11 Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos e Síndromes Associadas ao Circovírus tipo 2

A SACS raramente ocorre em suínos infectados exclusivamente pelo CVS-2. Diferentes agentes coinfecciosos podem estar associados e dois mecanismos são investigados. O primeiro sugere que os microorganismos compartilhem mecanismo comum de afecção ao sistema imune (Allan

e Ellis, 2000; Krakowka *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004) o qual posteriormente permita a progressão do CVS-2 ocasionando a SACS. Contrariamente o segundo sugere que a depleção linfóide induzida pelo CVS-2 promova uma imunossupressão que aumente a suscetibilidade do animal a outras infecções virais e bacterianas (Chianini *et al.*, 2003; Darwich *et al.*, 2003).

Os patógenos coinfecciosos mais frequentemente associados com o CVS-2 na SACS são o vírus da *Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína* (SRRS) (41%), *Mycoplasma hyopneumoniae* (27%), bactérias septicêmicas (10%), bactérias pneumônicas (6%) e Vírus da Influenza Suína (4%) (Pallares *et al.*, 2002; Drole *et al.*, 2003; Grau Roma *et al.*, 2008). No Brasil, dentre os agentes bacterianos o *Mycoplasma hyopneumoniae* representa um risco maior que o vírus da SRRS uma vez que o primeiro é endêmico e o segundo conforme Ciacci-Zanella *et al.* (2004) ainda não foi isolado no Brasil.

Além da expressiva incidência dos agentes é importante salientar sua correlação com a expressão de doenças do Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) como a rinite atrófica aguda causada pela associação da *Bordetella bronchiseptica* com a *Pasteurella multocida* do tipo A e tipo D, além da broncopneumonia supurativa induzida pelo *Haemophilus parasuis* e a pleuropneumonia suína causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Halbur *et al.*, 1993; Halbur *et al.*, 1998; Thacker, 2001).

O termo Complexo de Doenças Respiratórias dos Suínos (CDRS) descreve processos pneumônicos de etiologia múltipla. O CDRS pode ser caracterizado pelo isolamento de diferentes patógenos em uma mesma propriedade, podendo incluir muitas vezes a sobreposição de patógenos em um mesmo animal ou em uma mesma

região geográfica atingindo diferentes plantéis (Thacker and Thanawongnuwech, 2002). A interação entre patógenos e fatores ambientais resultam em supressão das defesas do pulmão e doença clínica com variável grau de severidade ao longo do tempo de permanência dos animais nas granjas (Taylor, 1996; Thacker and Thanawongnuwech, 2002).

É considerado sério problema em sistemas intensivos de criação de suínos no Brasil e no mundo, causando enormes prejuízos frequentemente relacionados à redução de peso, diferente conversão alimentar, mortalidade, letargia, anorexia, febre, tosse e dispnéia (Halbur *et al.*, 1998; Thacker, 2001). No Brasil Reis *et al.* (1992), Sobestianks *et al.* (1999), Silva *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2002) determinaram taxas de prevalência de lesões pulmonares associadas ao CDRS de 19.7% a 75.7% em diferentes estados do Brasil.

O CDRS pode envolver infecções concomitantes causadas por qualquer um dos vários patógenos respiratórios de origem viral ou bacteriana comumente encontrado nos criatórios, como Circovírus suíno tipo II, Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (SRRS), Vírus da Doença de Aujeszky, Vírus da Influenza Suína, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* (Halbur *et al.*, 1998; Thacker, 2001, Harms, 2002). Neste contexto os agentes virais normalmente atuam como agentes primários, enquanto as bactérias geralmente atuam como oportunistas secundários (Christensen *et al.*, 1999). Entretanto é relevante o fato que as doenças infecciosas primárias virais ou bacterianas são na maioria dos casos induzidas por cepas de baixa diversidade, com pequeno número de clones virulentos, capazes de causar a doença sob certas circunstâncias, enquanto que infecções oportunistas são frequentemente associadas

com cepas não patogênicas, comensais, com alto nível de diversidade (Davies *et al.*, 2003).

Os mecanismos pelos quais os agentes primários alteram as defesas do trato respiratório não estão inteiramente compreendidos, mas incluem danos ao epitélio ciliado ou pulmonar do trato respiratório, alteração do funcionamento dos macrófagos pulmonares, produção de adesinas que podem ser usadas por outras bactérias para aderirem ao epitélio respiratório, além de efeitos imunomodulatórios. Enquanto que a eficiência da resposta do hospedeiro contra infecções bacterianas nos pulmões é dependente de sua rápida eliminação a partir do trato respiratório, a resolução do processo dependente do controle da taxa de multiplicação e eliminação bacteriana, evitando-se acúmulo substancial que poderia gradualmente ocasionar doença (Bossé *et al.*, 2002; Brockmeier *et al.*, 2002a).

Algumas das bactérias envolvidas com o CDRS e também já relacionadas com a SACS são gram negativas residentes comensais da flora do trato respiratório superior de suínos, patogênicas e membros da família *Pasteurellaceae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*), além de organismos gram positivos como *Streptococcus suis* e do trato digestivo como a *Escherichia coli* (Ristow *et al.*, 2007). As lesões pulmonares associadas às bactérias gram negativas são geralmente associadas a danos vasculares com edema, derrame de fibrina e eritrócitos. Adicionalmente, muitas dessas bactérias produzem toxinas que são diretamente tóxicas às células endoteliais ou que estimulam a liberação de células inflamatórias e diversas citocinas pelo tecido do hospedeiro resultando em dano vascular e coagulopatia disseminada (Reams *et al.*, 1995).

3.11.1 Agentes Bacterianos Associados ao Complexo das Doenças Respiratórias dos Suínos

Actinobacillus pleuropneumoniae é um coco bacilo gram negativo, pequeno e capsulado de complexa patogênese que causa pleuropneumonia contagiosa dos suínos caracterizada por pneumonia hemorrágica necrotizante e pleurite fibrinosa. O agente pode ser encontrado no fluído alveolar e interlobular e espalhar a partir do parênquima para a pleura através dos vasos linfáticos do septo interlobular e pleura, entretanto a bacteremia tem rara ocorrência (Haesebrouck *et al.*, 1997; Rycroft e Garside, 2000). Quando é o agente primário da infecção o *A. pleuropneumoniae* pode predispor o hospedeiro às infecções secundárias por *Pasteurella multocida* Tipo A, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis* (Nicolet, 1993).

A maioria dos animais de um plantel pode morrer num surto da doença causada pela *A. pleuropneumoniae*, enquanto outros apresentam recuperação total ou parcial mantendo lesões residuais nos pulmões caracterizadas por abscessos encapsulados por tecido conjuntivo fibrinoso (Bossé *et al.*, 2002). As lesões residuais podem predispor à infecções futuras com outras bactérias, na presença de adesões pleurais a função respiratória pode ficar comprometida afetando o ganho de peso.

Os animais acometidos pela infecção pelo *A. pleuropneumoniae* podem apresentá-la desde a forma subaguda até a crônica dependendo do sorotipo, da imunidade do hospedeiro e do número de bactérias que alcancem os pulmões. As lesões pulmonares podem ser caracterizadas por severo edema, inflamação, hemorragia, presença de fluído serosanguinolento e placas de fibrina preenchendo a cavidade torácica, além de pleurite fibrinosa difusa, e pericardite. Os linfonodos traqueobrônquiais e mesentéricos

podem estar edematosos e distendidos pela presença de infiltrado polimorfonuclear e depósito de fibrina (Bossé *et al.*, 2002).

Nos estágios iniciais da doença observa-se evidente infiltração de células polimorfonucleares, edema, e exsudato fibrinoso. Enquanto que nos estágios finais é mais aparente a presença de infiltrado de macrófagos e áreas necróticas circundadas por leucócitos degenerados. Dentro dos alvéolos podem ser observados células epiteliais pulmonares degeneradas, macrófagos, e neutrófilos. Uma severa vasculite necrotizante pode induzir a ruptura do leito sanguíneo pulmonar resultando em hemorragia. No interior de capilares pulmonares podem ser encontrados eritrócitos degenerados, fibrina e trombos plaquetários (Bossé *et al.*, 2002).

O *Haemophilus parasuis* é um bastonete imóvel, pequeno, pleomórfico da família *Pasteurellaceae* (Biberstein e White, 1969), variando de um simples coco bacilo a longas e filamentosas cadeias, caracterizado por intensa heterogeneidade entre as cepas e seus sorotipos. As cepas geralmente encontradas na cavidade nasal e tonsilar são de baixa virulência e apresentam diversidade quanto ao sorotipo e genótipo. Enquanto que as cepas pulmonares são menos variadas que as nasais, mas com diversidade genética maior que as cepas sistêmicas.

Importante colonizador do trato respiratório superior de suínos antes do desmame (Pijoan e Trigo, 1990) pode provocar doença em suínos a partir de 2 semanas até 4 meses de idade, geralmente associada a condições de estresse e a redução da imunidade do rebanho (Olvera *et al.* 2007). O *H. parasuis* pode ser isolado da cavidade nasal, tonsilas, traquéia e pulmões de animais saudáveis e também em secreções nasais com descarga mucosa, rinite, e pulmões com broncopneumonia em animais doentes (Vahle *et al.*, 1995; Vahle *et al.*, 1997). Seu sítio inicial de colonização no trato

respiratório superior de suínos é ainda controverso, entretanto possui tropismo pelas membranas serosas, e pelo parênquima pulmonar (Menin *et al.*, 2005).

Fatores envolvidos na invasão sistêmica pelo *H. parasuis* durante a infecção são desconhecidos, acreditando-se que a perda de cílios e tumefação das células da mucosa nasal e da traquéia sejam os principais responsáveis. Além do LPS que presente na corrente sanguínea pode induzir à trombose e coagulação intravascular disseminada (Macinnes e Desrosiers, 1999).

Dentre as diferentes apresentações clínico-patológicas têm sido descritas doenças respiratórias associadas com broncopneumonia catarral purulenta (Hoeffling, 1994), além de pneumonia em animais susceptíveis (Macinnes e Desrosiers, 1999).

Vahle *et al.* (1995) observaram em estudo com suínos de cinco semanas de idade, nascidos de cesariana, privados de colostro e inoculados via intranal com *H. parasuis*, rinite purulenta caracterizada por discreta a moderado infiltrado de neutrófilos na submucosa e intenso agregado focal de neutrófilos no epitélio nasal. Além de inflamação na superfície pleural dos pulmões e na superfície peritoneal do fígado, baço e intestino delgado. O exsudato consistia de quantidade variável de fibrina, numerosos neutrófilos, pequeno número de macrófagos e agregado basofílico granular. Neste experimento os autores observaram em apenas um animal broncopneumonia supurativa focal caracterizada por septos alveolares espessados pela presença de exsudato seroso com moderado número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, além de linfáticos interlobulares distendidos pela presença de material eosinofílico. Este animal exibia lúmen alveolar com número variável de neutrófilos e macrófagos, escassa quantidade de fibrina, congestão dos

capilares dos septos alveolares e pequeno número de neutrófilos nos bronquíolos.

Pasteurella multocida é um coco bacilo, gram negativo, anaeróbio facultativo e sem motilidade que induz importantes perdas econômicas em espécies domésticas através de doenças como a cólera aviária, a septicemia hemorrágica bovina, a rinite atrófica progressiva dos suínos, além de casos de pneumonia e pleurite em suínos com infecções pulmonares (De Alwis, 1992; Pijoan, 2006). As cepas de *P. multocida* são classificadas em sorogrupos (A, B, C, D, E e F) de acordo com seus antígenos capsulares e em 16 sorotipos baseado nos antígenos somáticos (Stepan, 1995; Borowski, 2002).

São descritas três apresentações clínicas para a infecção pela *P. multocida*: subaguda, aguda e crônica. Os sinais clínicos da infecção pela *P. multocida* variam em severidade dependendo da amostra envolvida e do grau de imunidade do animal (Pijoan, 2006).

A forma subaguda está associada com amostras que produzem pleurite. Na fase de crescimento e terminação são observados tosse e respiração abdominal (Pijoan, 2006).

A forma aguda de pneumonia está mais associada com amostras do sorotipo B e a mortalidade pode ser alta (5 a 40%), mas este tipo de infecção é rara em suínos. Clinicamente a doença pode ser confundida com a pleuropneumonia causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, porém na pasteurelose geralmente não ocorre morte súbita (Pijoan, 2006).

A forma crônica é a mais comum e se caracteriza por tosse ocasional de severidade variável, comumente entre 10 a 16 semanas de idade. Os sinais são indistinguíveis daqueles causados pela infecção simples pelo *Mycoplasma hyopneumoniae* e a *P. multocida* representa uma continuação ou exacerbação da micoplasmose primária. As

lesões ocorrem na cavidade torácica e se caracterizam por consolidação de áreas do pulmão. A porção afetada apresenta coloração de vermelha a acinzentada. Podem complicar com pleurite e abscessos, com aderência da pleura a parede torácica. A pleurite geralmente é seca, o que pode auxiliar na diferenciação da pleurite causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, onde costuma ocorrer infiltração com fibrina e a lesão de pleurite parietal é mais severa. As lesões microscópicas são similares às presentes na maioria das pneumonias bacterianas com broncopneumonia exsudativa, presença de neutrófilos no exsudato mucopurulento nos brônquios e alvéolos. Também tem sido relatada a presença de nefrite intersticial associada à broncopneumonia (Heres, 2009).

Recentemente a *P. multocida* tem sido reconhecida em infecções com o circovírus suíno do tipo 2 embora seja encontrada mais comumente associada ao *Mycoplasma hyopneumoniae* (Heres, 2009). A colonização da superfície do muco é um importante fator na patogenia da infecção pela *P. multocida*. O sorotipo A adere principalmente ao epitélio ciliado enquanto o sorotipo D tem preferência pelas células epiteliais não ciliadas (Jacques, 1987; Pijoan e Trigo, 1990; Pijoan, 2006; Borowski, 2006; Borowski *et al.*, 2007).

Cepas toxigênicas de *P. multocida* do tipo D capsular e menos frequentemente do tipo A podem estar associadas a rinite atrófica dos suínos. A exotoxina dermonecrótica produzida por estas cepas estaria envolvida na osteólise e atrofia dos ossos turbinados nasais (Eamens *et al.*, 1988; Kamp e Kimman, 1988; Lariviere *et al.*, 1992; Fussing *et al.*, 1999; Sakano *et al.*, 1992).

A *Bordetella bronchiseptica* é um microorganismo gram negativo, pleomórfico, coco bacilo, flagelar e com motilidade (Goodnow, 1980). É uma bactéria comumente isolada do trato

respiratório de suínos, agente primário de rinite e pneumonia que predispõe a colonização pela *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* e *Haemophilus parasuis* (Dugal *et al.*, 1992; Vecht *et al.*, 1992; Brockmeier *et al.*, 2001; Brockmeier *et al.*, 2004). A coinfeção de suínos com a *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida* pode resultar na rinite atrófica progressiva (Chanter *et al.*, 1989).

Há vários mecanismos potenciais pelos quais a *Bordetella bronchiseptica* predispõe a infecção com outras bactérias. Um destes é a toxina dermatonecrótica capaz de promover o atraso dos mecanismos de *clearance*, aumentar o acúmulo de muco, induzir danos na mucosa e causar alterações degenerativas de osteoblastos e do perióstio, expor áreas da submucosa facilitando a adesão de outras bactérias e a disponibilidade de nutrientes. Esta toxina induz danos ao tecido nasal dos suínos e causa a rinite atrófica e as lesões pneumônicas caracterizadas por necrose, hemorragia, acúmulo de neutrófilos e eventual fibrose (Brockmeier e Register, 2000). Outro fator relacionado é a citotoxina traqueal que causa ciliostase e danos ao epitélio respiratório, contribuindo na predisposição a infecções bacterianas secundárias (Khelef *et al.*, 1993; Banemann e Gross, 1997). Os filamentos de hemaglutinina produzidos pela *Bordetella bronchiseptica* são outro exemplo, uma vez que podem facilitar a adesão de outras bactérias aos cílios das células do epitélio nasal. A *Bordetella bronchiseptica* é também citotóxica para macrófagos alveolares de suínos induzindo a redução da fagocitose e *clearance* de bactérias nos pulmões (Hewlett *et al.*, 2006; Brockmeier e Register, 2007).

Uma vez que a *Bordetella bronchiseptica* tenha promovido à colonização do trato respiratório a outras bactérias, como *Pasteurella multocida*, pode predispor o animal a um quadro pneumônico, por

exemplo, com a *Pasteurella multocida* além de tornar os animais susceptíveis a infecções virais, como vírus da doença reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) e o CVS-2, predispondo (Chanter *et al.*, 1989; Brockmeier *et al.*, 2001).

As lesões microscópicas observadas na infecção pela *B. bronchiseptica* incluem infiltração da mucosa por neutrófilos, perda dos cílios, metaplasia do epitélio e reabsorção óssea com substituição por tecido fibroso. As lesões pulmonares são caracterizadas por infiltração dos espaços aéreos com neutrófilos, necrose de alvéolos e vasos sanguíneos, hemorragia. Em casos crônicos é possível observar uma extensa fibrose dos pulmões (Brockmeier *et al.*, 2002b).

A *Escherichia coli* é um bacilo gram negativo retilíneo, que pode apresentar cápsula e flagelos e diferentes antígenos de superfície como o antígeno O (lipopolissacarídeo - LPS); antígeno H (flagelar) e antígeno K (capsular). Sua classificação em sorogrupos é realizada pela avaliação do antígeno O presente em uma cepa. Até o momento, mais de 170 sorogrupos já foram identificados baseado na expressão de diferentes antígenos em sua superfície. Os sorotipos da *E. coli* podem ser determinados através da identificação do antígeno O, do antígeno H, e em alguns casos, também do antígeno K. As cepas de *E. coli* podem ser ainda classificadas quanto aos fatores de virulência presentes relacionados com suas três principais manifestações clínicas: doença entérica/diarréica, infecções do trato urinário e meningite/septicemia (Kaper *et al.*, 2004).

Os mecanismos envolvidos na patogenia das cepas patogênicas de *E. coli* são os fatores de adesão e colonização, que permitem à bactéria estar presente em sítios normalmente não colonizados, além das toxinas, capazes de interferir em inúmeros

mecanismos nas células eucarióticas (Kaper *et al.*, 2004).

As endotoxinas da *E. coli* estão incriminadas na indução de uma resposta inflamatória aguda pela interação com específicos receptores de membrana sobre células mononucleares fagocitárias e neutrófilos promovendo sua ativação e a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Olson *et al.*, 1995; O'Grady *et al.*, 2001). Quando administrados intravenosamente (i.v.), instilada ou inalada, podem induzir edema pulmonar e prejuízo do funcionamento pulmonar (Urbain *et al.*, 1992; Gustin *et al.*, 1994, Maurenbrecher *et al.*, 2001). O LPS da parede da *E. coli* é capaz de iniciar a secreção de citocinas, as quais produzem uma resposta inflamatória no interior dos espaços aéreos pulmonares e aumentar a permeabilidade à albumina (O'Grady *et al.*, 2001).

O efeito sinérgico entre diversas doses de LPS da *E. coli* e a *Pasteurella multocida* tipo A foram observados por Halloy *et al.* (2005). Em todas as combinações de doses testadas, o volume e a natureza das lesões pulmonares, assim como, os sinais clínicos pareceram depender da dose de LPS administrada. Foi demonstrado que baixas doses de LPS promoveram infecção respiratória assintomática, podendo aumentar os riscos do desenvolvimento de uma pneumonia infecciosa. Enquanto que doses significativas de 400 µg/kg de LPS com *Pasteurella multocida* tipo A induziram tosse, hipertermia além do influxo de células inflamatórias para os espaços aéreos, aumento dos movimentos expiratórios e marcada redução do peso corporal. Foram observadas também pneumonia intersticial e alveolar subaguda exsudativa, acompanhados de pleurisia e pericardite. As análises bacteriológicas e a PCR realizados no fluido do lavado bronquioalveolar possibilitaram observar que a *Pasteurella multocida* tipo A foi completamente debelada dos pulmões, enquanto que o

processo inflamatório associado permaneceu predispondo a infecções oportunistas como pela *Bordetella bronchiseptica*.

Streptococcus suis é um organismo gram positivo, hemolítico, anaeróbio facultativo, coco ovóide que ocorre isolado, em pares ou pequenas cadeias. O microorganismo está relacionado a diversas doenças em suínos tendo já sido isolado em casos de broncopneumonia (Higgins e Gottschalk, 1990) inclusive em diferentes regiões do Brasil (Reis *et al.*, 1980; Farinha *et al.*, 1981; Barcellos *et al.*, 1984, Barcellos *et al.* 1995), como em Botucatu, São Paulo, onde foi detectado taxas de prevalência (zero a 33,33%) de infecção tonsilar pelo *S. suis*, entre animais de 30 a 60 dias de idade (Bosco *et al.*, 2000). É relevante também sua presença junto a coinfeções por diversos patógenos bacterianos (*Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella*) (Reams *et al.*, 1994).

As cepas de *Streptococcus suis* são divididas em 35 sorotipos de acordo com seus polissacarídeos capsulares (Staats *et al.*, 1997). A virulência difere entre e dentro dos sorotipos de *S. suis*, assim nem todos os sorotipos causam doença e nem todos os isolados dentro de um sorotipo causam a mesma doença (Staats *et al.*, 1997). Em um surto pelo *S. suis* podem ser encontrados múltiplas cepas ou sorotipos dentro de um plantel. Os sorotipos 2-5, 7, 8 e ½ são aparentemente os mais propícios a induzirem sinais respiratórios e lesões de broncopneumonia supurativa e /ou pleurite (Reams *et al.*, 1994; Reams *et al.*, 1996).

Os achados macroscópicos dependem da duração da infecção e da distribuição do *S. suis* nos tecidos. Macroscopicamente nos pulmões podem ser observadas inflamações supurativas e /ou fibrino-purulentas (Reams *et al.*, 1994).

À histopatologia pode ser observada pneumonia intersticial fibrinosa, pneumonia fibrino-hemorrágica, broncopneumonia fibrinosa ou supurativa na presença ou ausência de infiltrado de linfócitos perivascular, peribronquial, e peribronquiolar, bronquiolite, bronquite, hemorragia alveolar, consolidação lobular, enfisema interlobular e pleurite fibrinopurulenta. Células gigantes alveolares podem estar presentes em casos de pneumonia intersticial fibrinosa. Em infecções agudas, a lesão histopatológica mais característica é a presença de infiltrado neutrofílico difuso (Staats *et al.*, 1997). Processos inflamatórios supurativos (neutrofílicos) são comumente observados à avaliação histopatológica com todos os sorotipos de *S. suis*.

A broncopneumonia supurativa é considerada indistinguível dos casos de pasteurelose ou infecções com outras bactérias piogênicas. A pneumonia intersticial (lesão considerada secundária a septicemia) pode ser comumente observada em suínos infectados com os sorotipos 1 e 7 (Reams *et al.*, 1994). A pneumonia fibrino-necrótica ou necrotizante ou necrótico-hemorrágica tem sido observada em suínos afetados por todos os sorotipos, exceto 1 e 6, e frequentemente o *Actinobacillus pleuropneumoniae* também foi isolado (Reams *et al.*, 1994). A pleurite fibrinopurulenta ou fibrinosa com evidente exsudação supurativa, peritonite ou poliserosite têm sido relatadas em casos de *Streptococcus suis* em associação com o *Haemophilus parasuis* sendo o diagnóstico diferencial identificado pelo aspecto do exsudato. Quando o exsudato supurativo prevalece sobre o fibrinoso, o *S. suis* é considerado agente primário na infecção (Reams *et al.*, 1994).

3.12 Diagnóstico das Síndromes Associadas à Circovirose Suína

O diagnóstico definitivo da SACS deve ser realizado pela associação dos sinais clínicos compatíveis, lesões histopatológicas e detecção do antígeno dentro das lesões. Estes três critérios não podem ser utilizados separadamente, pois a presença do CVS-2 não implica necessariamente em doença, assim como alguns sinais clínicos não são específicos da SACS (Sorden, 2000; Quintana *et al.*, 2001; Calsamiglia *et al.*, 2002).

Genoma e antígeno do CVS-2 têm sido detectados em ampla variedade de células. Material viral foi encontrado no citoplasma de histiócitos, células gigantes mononucleares, macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas foliculares dos tecidos linfóides. Alguns autores também já identificaram o vírus em pneumócitos tipo II nos alvéolos pulmonares, células renais, células endoteliais, musculares lisas, hepatócitos, enterócitos e células epiteliais germinativas dos túbulos seminíferos (Darwich *et al.*, 2004).

Para o diagnóstico da síndrome os tecidos de maior valor são os órgãos linfóides embora outros tecidos tais como o pulmão, fígado e rim, possam ser também úteis para a detecção do CVS-2. A detecção do antígeno viral pela técnica de imunohistoquímica associado a lesões típicas nos tecidos; demonstração da presença do vírus nos tecidos pela técnica de imunofluorescência e demonstração do genoma viral utilizando a técnica de PCR e hibridização *in situ* (Sorden *et al.*, 1999) têm sido utilizados.

Embora animais severamente afetados pela SACS possam apresentar lesões em quase todos os tecidos, em alguns casos foi possível detectar o vírus em tecidos sem qualquer lesão anatomopatológica visível. Como regra geral, as lesões mais graves são

vistas nos órgãos linfóides não sendo, contudo possível correlacioná-las com a severidade das lesões em outros órgãos como pulmão, fígado ou rim (Rosell *et al.*, 1999; Rosell *et al.*, 2000a; Quintana *et al.*, 2001).

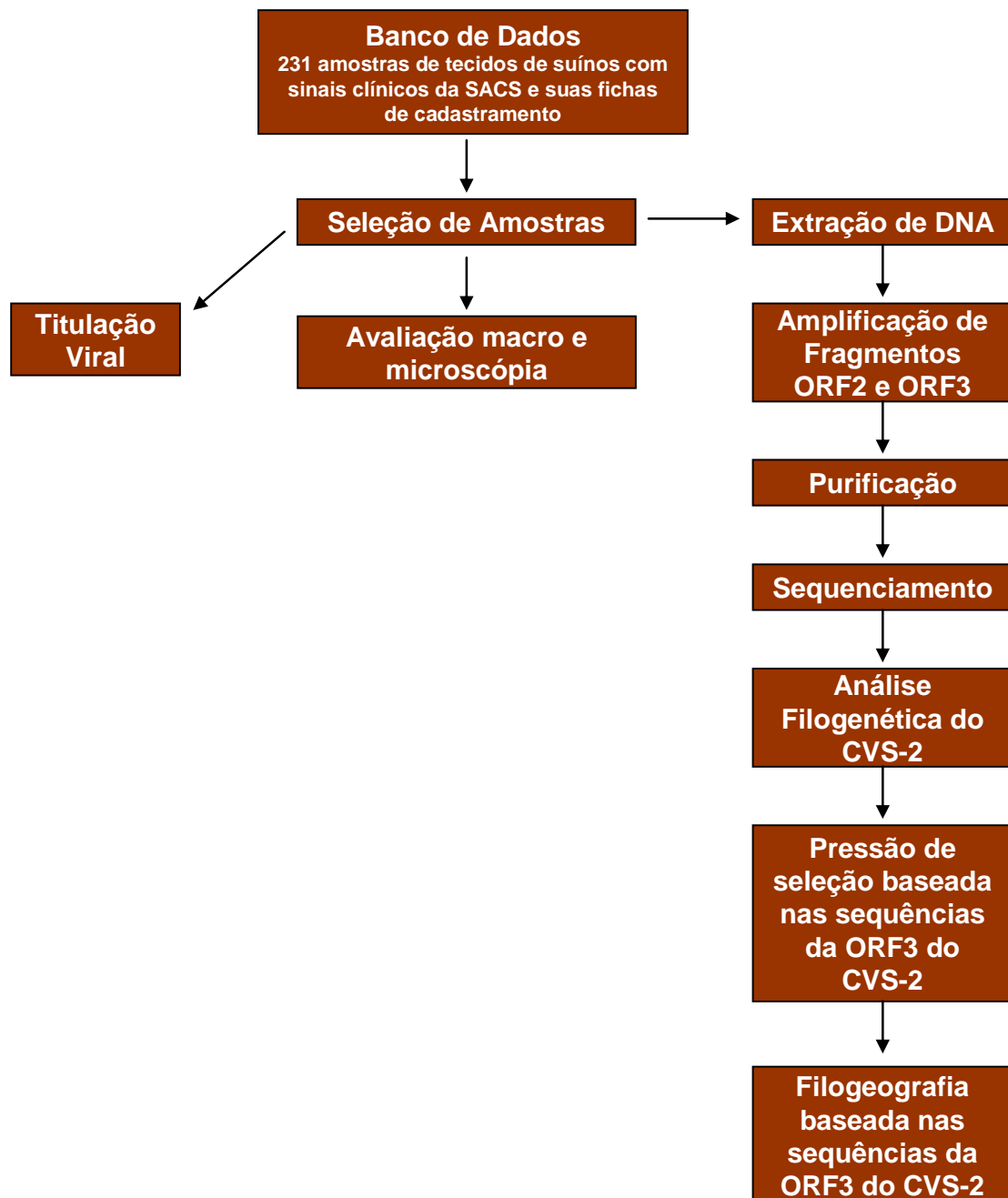
O monitoramento da carga viral é um indicativo da infecção ativa, da interação vírus-hospedeiro e um bom marcador da progressão da doença além de fornecer informações sobre a relevância clínica e epidemiológica da infecção pelo CVS-2. Este monitoramento pode ser realizado no soro e nos tecidos de animais infectados pelo CVS-2 sendo que no soro permite avaliação e progressão da infecção nos animais ainda vivos (Olvera *et al.*, 2004). As técnicas mais utilizadas na avaliação da carga viral são: o título do vírus infeccioso realizado em monocamadas de células PK15 através da técnica de imunoperoxidase e a quantificação do número de cópias de DNA viral pela reação de polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real) (Brumborg *et al.*, 2004).

O PCR em tempo real é uma excelente ferramenta de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade e rapidez de processamento. Em relação a PCR convencional a PCR em tempo real é geralmente mais rápida, menos trabalhosa, mais acessível além de apresentar resultados mais confiáveis. Este sistema é assim chamado por possibilitar o monitoramento do acúmulo de *amplicons* diretamente durante o processo de amplificação do DNA. Os primeiros ensaios com a PCR em tempo real para a detecção do CVS-2 utilizaram o sistema *TaqMan* com sondas de hibridização principalmente em amostras de soro e posteriormente foi adotada a técnica com o sistema SYBR Green para a quantificação do CVS-2 em soro, fezes e múltiplos tecidos (Ladekjaer-Mikkelsen *et al.*, 2002; Rovira *et al.*, 2002; Gilpin *et al.*, 2003; Brunborg *et al.*, 2004; Olvera *et al.*, 2004; Fenaux *et al.*,

2004; Yang *et al.*, 2007 e McIntosh *et al.*, 2009).

4 PLANO DE TRABALHO

O seguinte plano de trabalho foi realizado.



5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem

A amostragem inicial foi construída a partir de um banco de dados de 231 amostras de tecidos do Instituto de Pesquisas Veterinárias Especializadas (IPEVE) provenientes de suínos com sinais clínicos compatíveis com a SACS pertencentes a granjas localizadas nos Estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul no período de 2006 e 2007. A distribuição das amostras por estado foi feita de acordo com o fluxo de recebimento e processamento das amostras no IPEVE.

Foi realizado um banco de dados a partir das suas fichas de cadastramento que continham informações sobre proprietário, data da coleta, localização de acordo com o Estado, Mesorregião, idade do animal, especificação do material coletado à necropsia, quantidade de material enviado, lesões observadas à necropsia, histopatologia, exames complementares relativos a isolamento de agentes bacterianos nas amostras estudadas. Dentre as 231 amostras foram selecionadas para o estudo filogenético aquelas com o maior número de informações oferecidas no banco de dados, além de procurar-se garantir a representatividade por estado e mesorregião, o maior número de localidades de coleta possível, e a inclusão de uma ampla variedade de tipos de propriedades incluindo unidades de alta condição sanitária, granjas de ciclo completo em sítio único ou sítios múltiplos ou sistema de integração.

A partir dos dados coletados foram selecionadas ainda 31 amostras, nomeadas pareadas, originárias dos Estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina que se destacavam pelo fato de possuírem uma contrapartida

coletada na mesma propriedade em datas distintas. O objetivo da seleção destas amostras foi avaliar a possibilidade de cepas distintas circulando dentro de uma propriedade em datas diferentes.

Na análise filogenética do CVS-2 em grupo e subgrupos foram estudadas 51 amostras do banco de dados e mais 24 amostras do GenBank. No estudo da filogenia da ORF3 foram utilizadas 89 amostras do banco de dados (**Anexo 2, 3 e 6**) e 3 amostras do GenBank.

Na avaliação macroscópica e microscópica foram avaliadas respectivamente 205 e 83, sendo que na correlação entre o título infeccioso do CVS-2 e as lesões microscópicas foram utilizadas todas as 83 amostras analisadas. O número de amostras com avaliação de lesões microscópicas e discriminação do genogrupo da ORF3 foram 89 amostras. Cada amostra foi representada por diversas lâminas contendo em cada uma um corte de apenas um órgão. As lesões microscópicas foram avaliadas conforme seu reconhecimento e descrição nas lâminas de histopatologia, e portanto uma mesma lesão ora foi observada muitas vezes (em vários cortes), ora poucas vezes (em poucos cortes). A partir dessa observação é que foi criada uma tabela com a frequência das principais lesões. Da mesma forma foram avaliadas as lesões macroscópicas e a tabela de frequência nesse caso foi criada através da análise da descrição macroscópica dos achados em cada amostra..

Do total das 231 amostras avaliadas apenas 151 apresentaram exames para detecção de agentes bacterianos coinfecciosos (*Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*).

5.2 Preparo do *pool* de extratos de tecidos das amostras

No preparo do *pool* de extrato de tecidos das amostras foram utilizados fragmentos de tecidos e órgãos (fígado, rins, baço, intestinos delgado e grosso, pulmões, e linfonodos) contemplando todo o material enviado pelo IPEVE. O material foi então macerado, homogeneizado numa suspensão de 20% em solução salina tamponada com fosfato (0,01M PO₄, 0,15M NaCl em pH 7,2) e armazenado em frascos com capacidade de 20 mL. As alíquotas foram mantidas congeladas a – 20 °C. Todas as 231 amostras foram enviadas pelo IPEVE ao Laboratório de Doenças a Vírus da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais sob refrigeração em frascos contendo o *pool* representativo de cada amostra.

5.3 Avaliação das Lesões Macroscópicas e Microscópicas

A avaliação macroscópica das lesões foi realizada por diferentes veterinários e na maioria das vezes ainda a campo quando os animais eram sacrificados para envio do material ao IPEVE. A avaliação histopatológica das lesões microscópicas foi realizada pelos veterinários do IPEVE, tendo sido os fragmentos fixados em formalina a 10% e em seguida desidratados em álcool absoluto, tratados com xilol e depois embebidos e incluídos em parafina, cortados a 5 micrômetros e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). As lesões microscópicas foram classificadas em lesões discreta, moderada e severa de acordo com Chianini *et al.* (2003) (**Tabela 1**).

Tabela 1 Classificação em discreta, moderada e severa da infecção pelo CVS-2 através dos achados microscópicos adaptado de Chianini *et al.* (2003)

Achados microscópicos	Classificação
<p>Tecidos linfóides (linfonodos, baço, placas de peyer) Folículos linfóides com discreta depleção linfóide Discreta infiltração histiocitária Discreta presença de células gigantes multinucleadas sinciciais</p>	Discreta
<p>Pulmões Discreto espessamento multifocal dos septos alveolares devido a presença de infiltrado linfocitocitário</p>	
<p>Rins Agregado multifocais de linfócitos e células plasmáticas</p>	Moderada
<p>Tecidos linfóides (linfonodos, baço, placas de peyer) Folículos linfóides com moderada depleção linfóide Variável número de histiócitos nas áreas foliculares e interfoliculares Presença de células gigantes multinucleadas sinciciais Presença de corpúsculos de inclusão basofílicos intracitoplasmáticos</p>	
<p>Pulmões Discreto espessamento multifocal dos septos alveolares devido a presença de infiltrado linfocitocitário Aumento no número de macrófagos alveolares Exsudação neutrofilica em bronquios, bronquíolos e alveolos</p>	
<p>Rins Infiltração linfoplasmocitária na cortical e medula renal</p>	
<p>Tecidos linfóides (linfonodos, baço, placas de peyer) Folículos linfóides com severa depleção linfóide Intenso infiltrado histiocitário nas áreas subcapsulares, e interfoliculares Presença de células gigantes multinucleadas sinciciais Presença de corpúsculos de inclusão basofílicos intracitoplasmáticos Placas de peyer com consistente depleção linfóide associada com infiltrado histiocitário</p>	Severa
<p>Pulmões Infiltraçãoohistiocitária Diminuição ou perda dos tecidos linfóides broncoassociados Moderado a severo espessamento multifocal dos septos alveolares devido a presença de infiltrado linfocitocitário Aumento no número de macrófagos alveolares Exsudação neutrofilica em bronquios, bronquíolos e alveolos</p>	
<p>Rins Discreta a moderada infiltração multifocal linfoplasmocitária no cortex renal</p>	

5.4 Titulação dos homogeneizados de tecido em cultura de célula

O total de 231 amostras foi titulado para avaliação da carga de vírus infeccioso sendo a quantificação do vírus infeccioso nas suspensões de tecidos realizada pela técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) conforme Ellis *et al.* (1998) e Fort *et al.* (2007) com modificações. Resumidamente, o inoculo viral obtido a partir suspensão 20% em PBS do pool de tecidos diluído na base 3, (1:10, 1:30, 1:90, 1:270, 1:810, 1:2430) e acrescentado em duplicata sobre as monocamadas semiconfluentes de células PK15. As microplacas foram incubadas por 72 horas em estufa de CO₂ a 37°C e em seguida fixadas com solução de acetona/álcool metílico 95% (1:1) e secas à temperatura ambiente. Soro padrão anti-CVS-2 (VMRD®) foi acrescentado sob as monocamadas e após uma hora de incubação em estufa à 37°C e lavagem das placas anticorpo secundário previamente titulado foi adicionado e incubado uma hora em estufa à 37°C. Após lavagem a reação foi revelada pela adição do substrato, o cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol adicionado de 0,3% H₂O₂ e a leitura realizada em microscópio invertido.

5.5 Extração do DNA

O DNA foi extraído utilizando a técnica de tiocianato de guanidina de Chomkzynski (1993) com modificações, onde aos 100 microlitros (µl) de cada amostra foram adicionados 500µl de tiocianato de guanidina em microtubo de 1500µL. Após 10 minutos de homogeneização manual as amostras foram mantidas em banho de gelo durante 10 minutos. Foi adicionado 250µl de acetato de amônio (7 M), refrigerado a -20°C, a cada amostra sendo mantidas por mais 10 minutos em banho de gelo. Em seguida foi adicionado 500µL de solução clorofórmio/2-pentanol (24:1) também

refrigerado a -20°C, e as amostras foram submetidas à vigorosa homogeneização até a formação de emulsão através de vórtex. O material foi centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 10 minutos para separação das fases. A fase aquosa resultante da fase anterior foi transferida para outro microtubo de 1500µL, misturada com 405µL de isopropanol (-20°C) e incubada em freezer a -20°C por um período mínimo de duas horas. Após esse período as amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 4°C a 12.000 x g por 5 minutos e, o sobrenadante descartado por inversão. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado com 500µL de etanol 70%, temperatura ambiente, centrifugado a 4°C a 12.000 x g por 5 minutos e, o sobrenadante descartado, novamente, por inversão. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e, suspenso em 50µl de água bidestilada. O DNA viral foi mantido em freezer a -20°C até o momento do uso.

5.6 A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

5.6.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Para a amplificação do gene da ORF2 foram usados diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores (Castro *et al.*, 2007). Regiões conservadas do genoma foram escolhidas como alvo para o desenho dos pares de oligonucleotídeos iniciadores. Para o gene da ORF3 foi desenhado par específico para este trabalho (**Figura 12 e Tabela 2**).

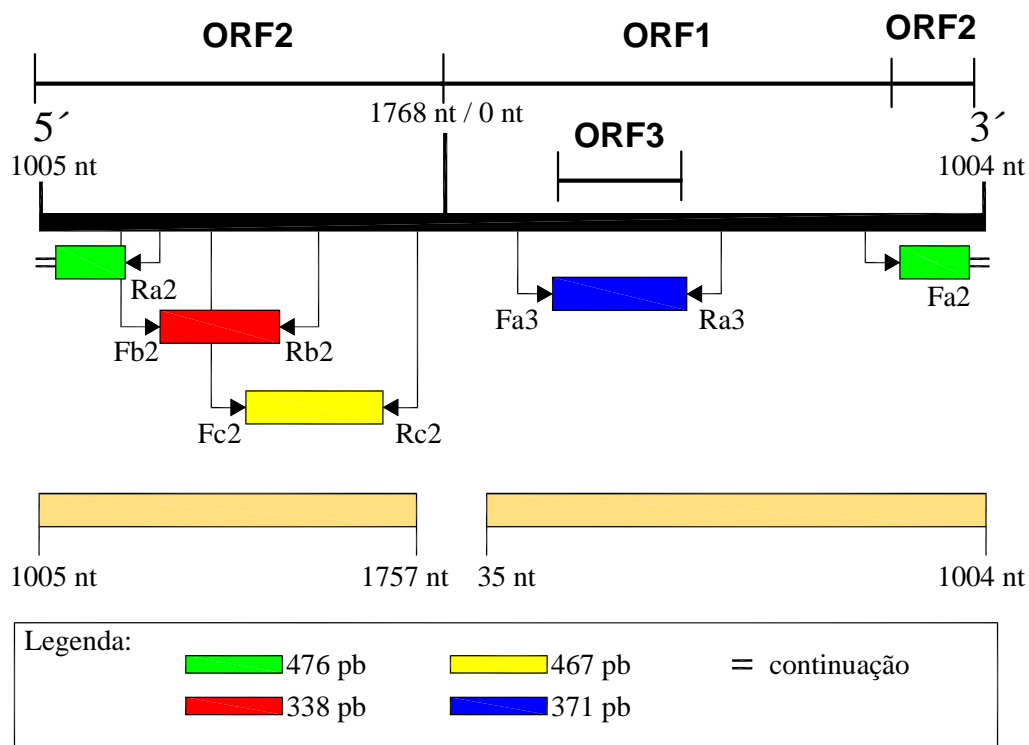


Figura 12 Representação esquemática dos pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene da ORF2 e ORF3 (Adaptado de Castro Tese Doutorado, 122 p., 2005).

Tabela 2 Pares de *oligonucleotídeos iniciadores* da ORF3 do CVS-2

Pares de oligonucleotídeos iniciadores da ORF3	Alvo	Seqüência 5' - 3'	Região de hibridização	Tamanho do fragmento
Fa3	ORF3	CGAGAAAGCGAAAGGA	299-314	371
Ra3		GGTAACCATCCCACCA	669-654	

5.6.2 Condições de Amplificação

Após a extração do DNA dos homogeneizados de tecidos foi realizada a PCR utilizando 3µL de DNA extraído num volume final da reação de 50µl utilizando 1,5 mM MgCl₂, 1X tampão PCR, 0,2 mM de dNTP, 50pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e 1,5 U de Taq DNA polimerase. O material foi amplificado em termociclador automático modelo *Eppendorf Mastercycler ep Gradient S thermal cycler*. O número de

ciclos, tempo e as temperaturas utilizadas para as reações dos fragmentos da ORF2 foram realizadas conforme Castro *et al.* (2007) sendo para a ORF3 utilizado 30 ciclos, com desnaturação inicial à 95° C por 2 min, desnaturação do DNA à 95° C por 30 s, anelamento dos *oligonucleotídeos iniciadores* à 50° C por 30 s e extensão à 72° C por 30 s. A reação finalizou-se com uma etapa de aquecimento a 72° C por 5 min.

5.6.3 Detecção do produto amplificado

Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em cuba horizontal, em gel de agarose 1,5% imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (89 mM de Tris-borato, 2mM de EDTA pH 8,2) e sob 120v e corrente elétrica de 400mA. A visualização dos fragmentos amplificados em cada corrida eletroforética foi possível após coloração com brometo de etídio na concentração de 0,5mg/mL e visualização à luz ultravioleta em transiluminador. As dimensões dos amplificados foram comparadas com padrão de peso molecular (100 pb Promega) disposto no gel juntamente com as amostras analisadas.

5.6.4 Purificação das Amostras

Os fragmentos de DNA foram submetidos à migração eletroforética em gel de agarose a 1,5% e purificados com o kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade da purificação do DNA foi verificada em outra corrida eletroforética com 5µL de DNA purificado por canaleta juntamente com o padrão de peso molecular (100 pb Promega).

5.7 Sequenciamento

Todas as amostras foram sequenciadas no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - VPS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.7.1 Reação de Sequenciamento e Purificação do produto com bases marcadas

Os fragmentos amplificados pela PCR seguido da purificação e quantificação foram utilizados nas reações de sequenciamento automático. Em um volume final de 10µL foram utilizados 1µL de *Big Dye v 3.1 (TM Terminator-cycle sequencing ready reaction*

Applied Biosystems), 2µL de tampão *Save Money 5x* (200mM de Tris, 5mM de MgCl₂, pH 9,0), 10pmoles do *primer* e 24ng de DNA purificado. Os fragmentos de DNA foram submetidos a uma migração eletroforética em gel de agarose a 1,5% com 5µL de DNA purificado por canaleta juntamente com o padrão *Low Mass DNA Ladder* (Gibco BRL-Gaytherburg/USA). Após a corrida, compararam-se, visualmente, as intensidades das bandas obtidas do DNA purificado com aquelas do padrão, utilizando a tabela fornecida pelo fabricante, obtendo-se desta forma a concentração de DNA em ng/µL. Quando a concentração do DNA das amostras foi abaixo de 4ng/µL, o volume final da reação foi duplicado, assim como a concentração dos reagentes, exceto a do *primer* utilizado. As condições de tempo e temperatura da reação de sequenciamento foram: 96°C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos (Castro *et al.*, 2007).

Para cada 10µL do produto das reações de sequenciamento foram adicionados 40µL de isopropanol a 65%, homogeneizado gentilmente e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 14.000 x g durante 25 minutos; o sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, por inversão e o sedimento lavado com 300µL de etanol a 70%. Depois o material foi centrifugado a 14.000 x g durante 10 minutos, o sobrenadante descartado com o auxílio de pipeta e o sedimento aquecido no termobloco a 82°C por dois minutos para evaporar o etanol residual. Esse material foi armazenado a -20°C. No instante em que as amostras foram colocadas no aparelho ABI PRISM™ 377 *Genetic Analyzer* (PE *Applied Biosystems*, USA), essas foram suspensas em 3,4µL da solução contendo formamida e *Blue Dextran-EDTA* (*Applied Biosystems*, USA) na proporção de 5:1. Posteriormente, esse

material foi desnaturado a 95°C por dois minutos e colocado em gelo por mais dois minutos. Aplicaram-se 1,5µL desse material no gel de sequenciamento (Castro *et al.*, 2007).

5.8 Análise Filogenética

5.8.1 Montagem e validação das sequências nucleotídicas

A qualidade das sequências foi verificada inicialmente no programa *Sequence Analyzer 2.4* que acompanha o seqüenciador de DNA e posteriormente o programa Phred v.0.20425 (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green, 1998), utilizando o parâmetro phred=20 (probabilidade de 1 possível erro em 100 nucleotídeos) para a validação das bases. Algumas sequências foram assim excluídas das análises e outras simplesmente não foram geradas quando o produto da purificação da PCR mostrou-se de qualidade duvidosa.

5.8.2 Busca de sequências homólogas em bancos de dados

As sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank*, utilizando os programas BLASTN e BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

5.8.3 Análise filogenética do CVS-2 baseada nas sequências de ORF2 e ORF3

A qualidade das sequências foi verificada inicialmente no programa *Sequence Analyzer 2.4* e posteriormente no programa Phred v.0.20425 (Ewing *et al.*, 1998; Ewing e Green, 1998), utilizando o parâmetro phred=20 (probabilidade de 1 possível erro em 100 nucleotídeos) para a validação das bases. As sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank*, utilizando os programas BLASTN

e BLASTX (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). O alinhamento das sequências de aminoácidos de todas as amostras foi feito usando Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) implementado no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) que também foi usado para estimar a divergência entre os diferentes haplótipos através do modelo de distância nucleotídica Kimura 2-parâmetros (K2p) e para construção de árvore filogenética baseada no método de distância *Neighbor Joining* (NJ) usando distâncias K2p e medidas de suporte e confiabilidade de ramos calculadas com porcentagem de 1000 réplicas (*bootstrap*) (**Figura 15 e 17**). Para o alinhamento da ORF2 foi utilizado não apenas o segmento da ORF2 como também da ORF1 uma vez que apenas a sequência da ORF2 não permitiria a diferenciação entre os grupos 1 e 2 com os oligonucleotídeos utilizados.

No alinhamento e discriminação das 89 sequências da ORF3 do CVS-2 do presente trabalho foram utilizadas três amostras do *GenBank* (*GER3*, *AF20130*; *GER1*, *AF201305*; *Fd1*, *AY322000*). Estas amostras foram previamente classificadas e utilizadas na divisão de genogrupos da ORF3 conforme Timmusk *et al.* (2008): amostra *AF201307* pertencem ao genogrupo SG1 da ORF3; amostra *AF201305*, ao genogrupo SG2 da ORF3 e a amostra *AY322000* ao genogrupo SG3 da ORF3.

As amostras estudadas foram agrupadas dentro de cada um dos genogrupos pela similaridade de sua sequência de nucleotídeos (**Anexo 4**) e de aminoácidos com as sequências de referência. A edição e cálculo da identidade das sequências foi feito usando o programa BioEdit, versão 7.0.4

(<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Na construção das árvores filogenéticas foi utilizado o método *Neighbor Joining* e primeiramente estabelecidos os modelos de

evolução para cada conjunto de dados a ser analisado através do programa Modeltest. De posse dos modelos de evolução, as árvores para a sequência de nucleotídeos (**Anexo 5**) e de aminoácidos foram construídas com busca heurística, partindo de uma árvore construída pelo método de *NJ* com 1000 réplicas.

5.8.4 Pressão de Seleção baseada na sequência da ORF3 do CVS-2

Para estimar d_S and d_N foram usados os métodos NG (Nei e Gojobori, 1986) and ML (Goldman e Yang, 1994). A existência de pressão seletiva ao longo da ORF3 foi então testada através do *software phylogenetic analysis by maximum-likelihood* (PAML) (Yang, 1997) que utiliza aproximação da máxima verossimilhança com modelos baseados em codon para estimar a relação (ω) da taxa de substituições não sinônimas por sítio não sinônimos (d_N), para estimar taxa de substituições sinônimas por sítio sinônimo (d_S). E assim estima a taxa ω pela *maximum-likelihood* com modelos baseados em códons, com taxas heterogêneas entre os sítios (Yang *et al.*, 2000).

5.8.5 Filogeografia baseada na sequência da ORF3 do CVS-2

Foram construídas redes haplotípicas (*networks*) para observar a distribuição geográfica e a filogenia dos haplótipos para a ORF3 do CVS-2. Os dados foram gerados pelo algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999) utilizando-se o programa Network 4.0.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste Exato de Fisher foi utilizado nas análises estatísticas: i) correlação entre o título infeccioso de 83 amostras com descrição histopatológica com as categorias discreta, moderada e grave da severidade das lesões; ii) comparação entre os grupos de

extratos de pulmões com isolamento bacteriano (n=37) e sem isolamento bacteriano (n=34); iii) correlação entre os grupos com e sem isolamento bacteriano nos pulmões quanto ao título infeccioso de CVS-2, e a classificação das lesões histopatológicas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 PCR

Todas os 231 extratos de tecidos provenientes de suínos com sinais clínicos de SACS foram positivos para CVS-2 através da PCR e amplificaram o fragmento de 371 bp a partir do gene *ORF3*.

7.2 Agentes coinfecciosos bacterianos isolados e sua distribuição nos estados brasileiros

Das 231 amostras do estudo foram analisados 150 extratos de tecidos. 42 amostras (28.0%) em 150 não apresentaram isolamento de qualquer agente bacteriano, 67 amostras (44.7%) isolaram apenas um agente bacteriano e 41(27.3%) isolaram mais de um agente bacteriano.

A frequência observada dos agentes bacterianos nas 67 amostras foi: 18/67 (26.9%) de *Streptococcus suis*, 7/67 (10.4%) de *Actinobacillus pleuropneumonia*, 22/67 (32.8%) de *Pasteurella multocida* tipo A, 6/67 (9.0%) de *Pasteurella multocida* tipo D, 3/67 (4.5%) de *Bordetella bronchiseptica*, 7/67 (10.4%) de *Haemophilus parasuis* e 4/67 (6.0%) de *Escherichia coli* alfa hemolítica (**Gráfico 1**).

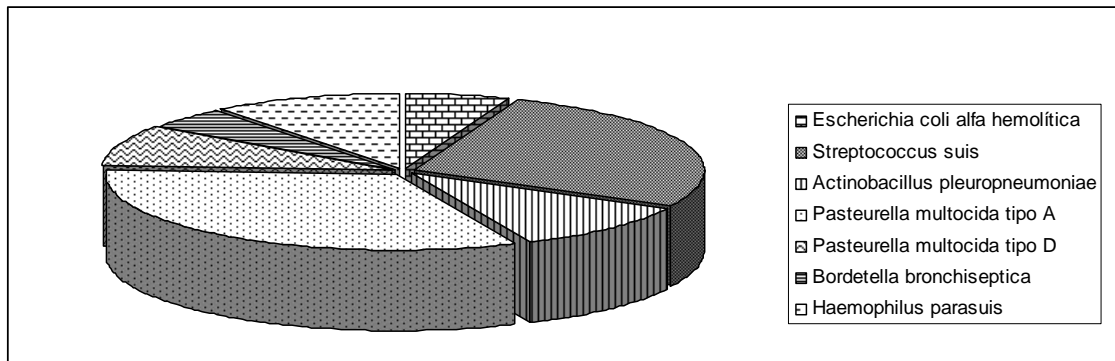


Gráfico 1 Frequência dos agentes bacterianos isolados e identificados em coinfeção com o CVS-2 em 67 amostras analisadas de animais com sinais clínicos de CDRS e pneumonia

Todas as bactérias foram isoladas de suínos com sinais clínicos da SACS associados à pneumonia. As bactérias mais comumente isoladas e identificadas nas amostras foram *P. multocida* tipo A e *S. suis*.

Os resultados foram concordantes com os de Brockmeier *et al.* (2002a), Kim *et al.* (2003) que incriminaram o CVS-2 como um dos agentes virais primários da CDRS devido a sua ampla prevalência em suínos com doenças respiratórias. E com aqueles de Thacker e Thanawongnuwech (2002) que definiram que a importância da CDRS está justamente nas interações entre patógenos virais e bacterianos agindo como agentes primários e secundários.

Conforme Pijoan (2006) uma possível explicação para a predominância da *P. multocida* tipo A em processos pneumônicos seria sua capacidade de aderência às células epiteliais facilitando sua difusão pelas vias aéreas e resistência ao processo de defesa mucociliar, aliada a presença da cápsula de ácido hialurônico que dificulta sua fagocitose pelos macrófagos alveolares nos pulmões.

Stepan (1995) acompanhando o abate de suínos em frigoríficos do Rio Grande do Sul em 1993 isolou 100 amostras de *P. multocida* a partir de 230 pulmões com consolidação, pneumonia e pleurite. Borowsky *et al* (2002) confirmaram seus achados ao estudarem amostras de *P. multocida* isoladas de animais com lesões pneumônicas no estado de Rio Grande do Sul e relataram aumento no número de isolamentos de cepas a partir de pulmões de suínos com pneumonia e pleurite.

Ristow e colaboradores (2007) em estudo com animais com sinais clínicos da SACS oriundos de 46 granjas dos estados Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul encontraram em amostras positivas para CVS-2 uma prevalência de 97,8% para *Streptococcus suis* e de 15,2% para *Pasteurella multocida*.

A distribuição das bactérias associadas ao CDRS em suínos com sinais clínicos da SACS nos estados brasileiros estudados mostrou diversidade (**Figura 13**). Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com Reis *et al.* (1992), Sobestianks *et al.* (1999) e Silva *et al.* (2002).

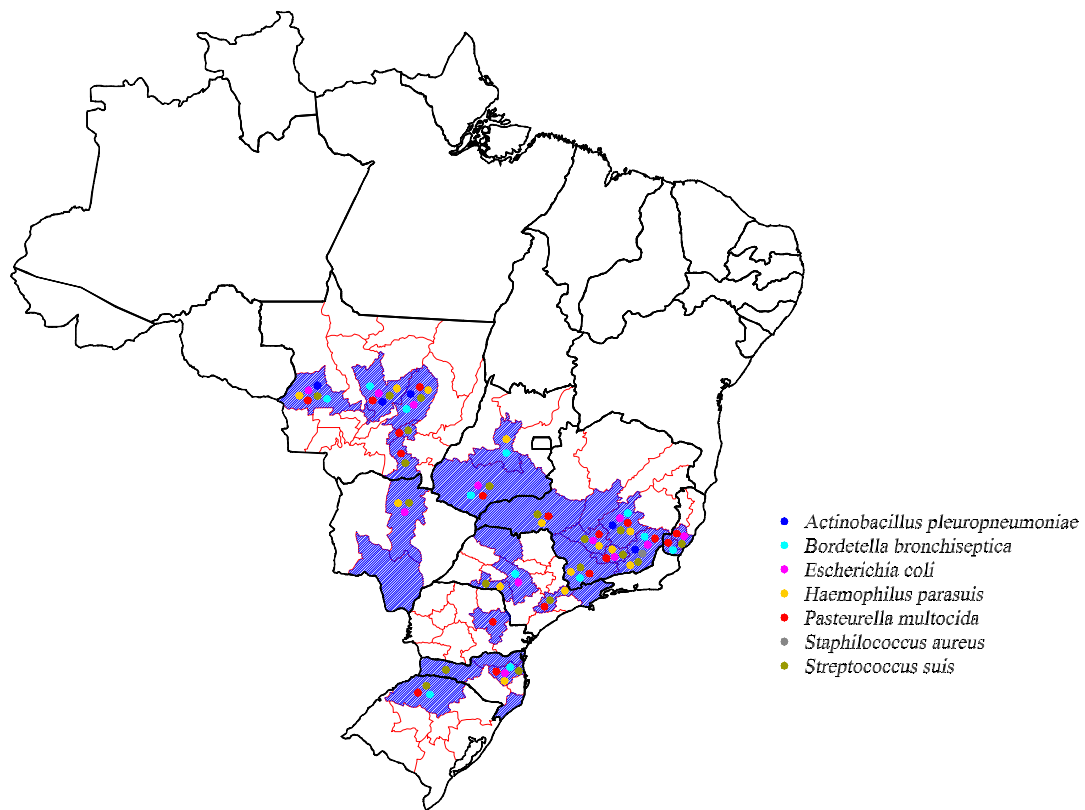


Figura 13 Distribuição dos agentes bacterianos coinfecciosos em amostras de suínos com sinais clínicos da SACS nos estados brasileiros (MT, MS, GO, MG, ES, SP, PR, SC, RS)

O estado de Minas Gerais foi o que apresentou maiores frequências de agentes bacterianos, destacando-se *P. multocida* tipo A, *H. parasuis* e o *S. suis* (**Gráfico 2**).

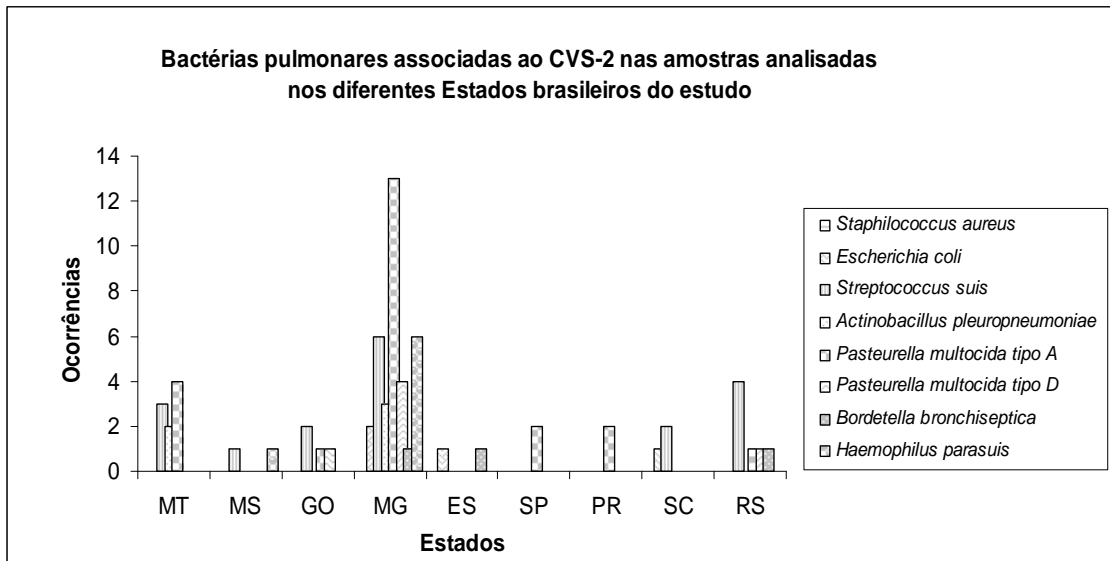


Gráfico 2 Distribuição das bactérias pulmonares associadas ao CVS-2 nas amostras estudadas nos Estados Brasileiros envolvidos no estudo

Nas 41 mostras nas quais foi possível isolar e identificar mais de um agente bacteriano em coinfeção com o CVS-2 observou-se 24 associações entre patógenos (**Gráfico 3**). O grande número de associações é condizente com a assertiva de Thacker e Thanawongnuwech (2002) que haviam definido o CDRS como processo de etiologia múltipla envolvendo inclusive a sobreposição de patógenos em um mesmo animal ou em uma mesma região geográfica, podendo inclusive afetar diferentes plantéis com graus de severidade variáveis ao longo do período de permanência dos animais na granja.

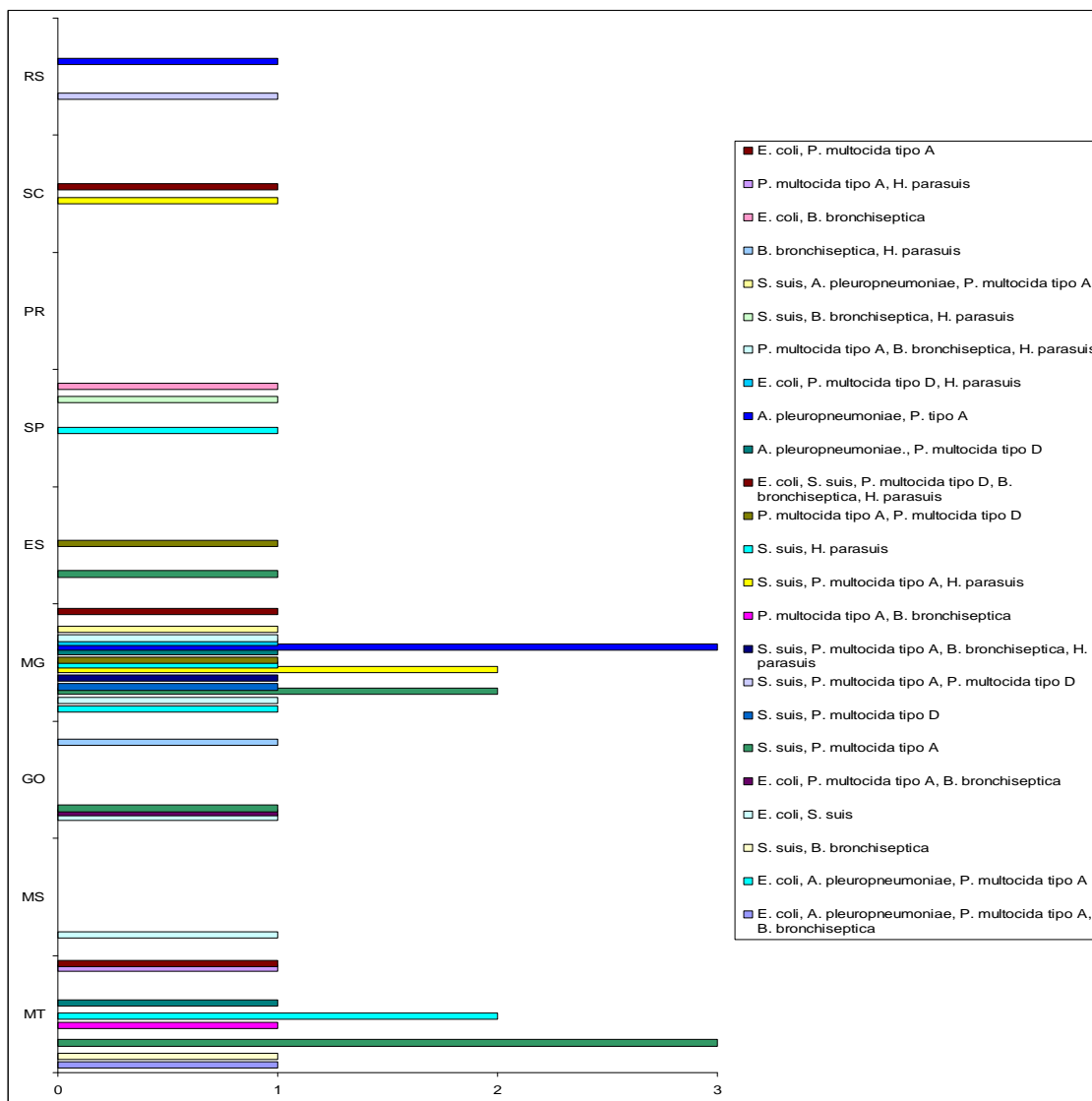


Gráfico 3 Distribuição das bactérias pulmonares associadas ao CVS-2 em 24 diferentes combinações nas amostras estudadas nos estados brasileiros envolvidos no estudo

Em Minas Gerais mais uma vez foram observadas as maiores frequências entre as diferentes associações tendo destacado *A. pleuropneumoniae* e *P. multocida* tipo A; *S. suis* e *P. multocida* tipo A; *S. suis* e *P. multocida* tipo A e *H. parasuis*.

Ao exame macroscópico as lesões foram variáveis (Clark, 1996; Rosell *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1998), não específicas (Segalés *et al.*, 2004a) e apresentaram maior concentração nos linfonodos, baço, pulmões, fígado e rins (**Tabela 3**).

7.3 Avaliação e frequência das lesões macroscópicas

Tabela 3 Frequência das principais lesões macroscópicas à necropsia avaliadas em 205 extratos de tecidos do estudo

Lesões macroscópicas	Frequência	%
Tecidos linfóides (n=298)		
Linfadenopatia e congestão (inguinal, submandibular, mesentérico, e mediastinal)	168	56,4
Baço aumento de tamanho e hiperplasia da polpa branca	130	43,6
	Frequência total nos tecidos linfóides	298
Pulmões (n=248)		
Pulmões com áreas de hepatização	131	52,8
Pulmões com edema interlobular, congestão e áreas de consolidação crânio ventral	117	47,2
	Frequência total nos pulmões	248
Fígado (n=23)		
Fígado com lobulação evidente, congesto e presença de fibrina na superfície de corte	12	52,2
Fígado pálido, congesto e com deposição de fibrina	11	47,8
	Frequência total no fígado	23
Rins (n=140)		
Rins pálidos ou com múltiplos focos brancos de diâmetro variável e petéquias que se aprofundam ao corte em direção cortical	89	63,6
Rins hiperplásicos e congestos	51	36,4
	Frequência total nos rins	140

Os linfonodos apresentavam-se aumentados de tamanho, congestos e com áreas hemorrágicas. Em alguns animais foi possível observar edema interlobular e subcapsular.

O baço estava aumentado de tamanho, congesto, com hiperplasia da polpa branca e presença de áreas de infarto. Em alguns animais foi possível observar a presença de fibrina na superfície e aderência. Entretanto também foram observados animais com linfonodos reagentes, aumentados de volume e baço sem quaisquer lesões dignas de nota.

Os pulmões apresentavam edema interlobular de graduação discreta a intensa, áreas de hepatização nos lobos apicais, diafragmático e cardíaco. Em alguns animais pôde ser observado espessamento da pleura, depósitos de fibrina e aderências interlobulares, além de micro abscessos.

O fígado apresentava lobulação evidente, consistência firme, palidez, presença de pontos brancos, petéquias, e fibrina na superfície.

Os rins apresentavam-se aumentados de volume, congestos, com áreas esbranquiçadas em todo o parênquima. Presença de petéquias e pontos brancos distribuídos de maneira focal na superfície do órgão, e que se aprofundavam ao corte.

7.4. Avaliação histopatológica e frequência das lesões microscópicas

As lesões microscópicas observadas à histopatologia e a sua frequência em 83 amostras do presente trabalho foram compatíveis com aquelas observadas (Segalés *et al.*, 2004a; Chae, 2004; Opriessnig *et al.*, 2007) em animais clinicamente afetados pela SACS (**Tabela 4**).

Tabela 4 Frequência e porcentagens das principais lesões microscópicas de tecidos linfóides e não linfóides em 83 amostras estudadas

Lesões microscópicas	Frequência	%
Tecidos linfóides (n=246)		
Linfonodos com folículos linfóides com depleção linfóide	70	28,46
Linfonodos com infiltrado inflamatório histiocitário	71	28,86
Linfonodos com presença de células gigantes sinciciais	35	14,23
Linfonodos com presença de corpúsculos de inclusão basofílicos intracitoplasmáticos	12	4,88
Baço com folículos linfóides com depleção linfóide	30	12,20
Baço com infiltrado inflamatório histiocitário	28	11,38
Total das frequências de lesões microscópicas nos tecidos linfóides	246	100,00
Pulmões (n=150)		
Pulmões com pneumonia broncointersticial	54	36,00
Pulmões com infiltrado inflamatório linfohistiocitário ao redor de brônquios e bronquíolos	35	23,33
Pulmões com exsudação de fibrina na pleura	18	12,00
Pulmões com septos alveolares espessados por infiltrado histiocitário e hiperplasia de macrófagos alveolares	36	24,00
Pulmões com presença de células gigantes sinciciais	7	4,67
Total das frequências de lesões microscópicas nos pulmões	150	100,00
Rins (n=76)		
Rins com nefrite intersticial linfohistiocitária	35	46,05
Rins com glomerulonefrite membranoproliferativa	20	26,32
Rins com nefrose tubular difusa	19	25,00
Rins com presença de células gigantes sinciciais	2	2,63
Total das frequências de lesões microscópicas nos rins	76	100,00
Intestino delgado (n=)		
Intestino delgado com proliferação de histiócitos	5	35,71
Intestino delgado com hipertrofia das placas de peyer	3	21,43
Intestino delgado com proliferação de enterócitos	3	21,43
Intestino delgado com presença de células gigantes sinciciais	2	14,29
Intestino delgado com presença de corpúsculos de inclusão basofílicos intracitoplasmáticos	1	7,14
Total das frequências de lesões microscópicas no intestino delgado	14	100,00

Nos linfonodos foram observados folículos linfóides com discreta a severa depleção de linfócitos levando à perda da arquitetura folicular além de histiocitose (71/83), em conformidade com o descrito por Segalés *et al.* (2004b) que consideraram esta uma das lesões em tecidos linfóides mais características de suínos afetados pela SACS. A presença de células gigantes multinucleadas sinciciais e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos basofílicos puderam também ser observados. Segundo Allan e Ellis (2000) este achado poderia ser associado à presença intracitoplasmática de grande quantidade de antígeno de CVS-2 em células da linhagem monócitos/macrófagos, incluindo células dendríticas. Diversos autores (Clark, 1996; Kiupel *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1999; Segalés *et al.*, 2004a) classificaram este achado como patognomônico na SACS, embora Chae (2004) tenha afirmado que sua baixa

frequência é considerada um episódio normal na síndrome. Em alguns animais a presença de necrose central circundada por macrófagos epitelióides foi observada como descrito por Segalés *et al.* (2004a), além da presença de infiltrado neutrofílico e micro abscessos caracterizando uma linfadenite piogranulomatosa.

No baço foram observados (33/83) folículos linfóides com depleção linfóide discreta a severa e proliferação de macrófagos de forma semelhante que o observado nos linfonodos (Rosell *et al.*, 1999; Allan e Ellis, 2000)

Nos rins foram observados (35/83) glomerulonefrite membranoproliferativa, nefrite intersticial multifocal com infiltrado inflamatório de linfócitos e histiócitos, localizada no interstício tubular e perivascular, todas as lesões compatíveis

com as descritas por Rosell *et al.* (1999). Estavam presentes também células gigantes sinciciais e nefrose tubular difusa caracterizada por cápsula glomerular espessa envolvida por células inflamatórias e deposição de material hialino homogêneo no espaço glomerular.

Em alguns animais foram observadas lesões histopatológicas no intestino delgado (06/83) caracterizadas por mucosa espessada com moderada a intensa proliferação de enterócitos que se apresentavam jovens e imaturos. Criptas com várias camadas de enterócitos, infiltrado de neutrófilos, linfócitos e histiócitos na base e ausência de células caliciformes. Placas de Payer hipertrofiadas, com severa depleção de linfócitos, intensa proliferação de histiócitos, presença de células gigantes multinucleadas e corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos.

Em apenas um animal foi observado enterite mucó hemorrágica aguda difusa, com focos de proliferação de enterócitos jovens e imaturos, e, ausência de células caliciformes. Neste animal também foram observadas criptas dilatadas e repletas de secreção e debris celulares ou infiltrados de neutrófilos, além de macrófagos entre as criptas.

7.4.1 Avaliação histopatológica de 83 extratos de pulmões e sua correlação com a presença ou ausência de coinfeções bacterianas

Os achados histopatológicos observados nos pulmões foram descritos conforme associação positiva (34/83) ou negativa do CVS-2 com coinfeções bacterianas (37/83). Os resultados foram concordantes com os de Brockmeier *et al.* (2002a), Harms (2002) e Kim *et al.*, (2003) que haviam incriminado o CVS-2 como um dos agentes virais primários da CDRS devido a sua ampla prevalência em suínos com doenças

respiratórias. E com aqueles de Thacker e Thanawongnuwech (2002) que definiram que a importância da CDRS estaria justamente nas interações entre patógenos virais e bacterianos agindo como agentes primários e secundários.

No grupo de associação negativa com bactérias foi observado pneumonia bronco intersticial com septos alveolares espessados por infiltrado de histiócitos e neutrófilos nos espaços alveolares, e na luz de brônquios e bronquíolos. Presença de infiltrado inflamatório linfocitoplasmático peribronquiolar e perivascular e células gigantes multinucleadas sinciciais (Rosell *et al.*, 1999; Allan e Ellis, 2000; Chae, 2004; Segalés *et al.*, 2004a).

No grupo de associação positiva com coinfeções bacterianas foram observadas (12/34) lesões pulmonares semelhantes ao grupo anterior, e lesões (22/34) com características das infecções associadas.

Em duas amostras nas quais foi detectada a presença de coinfeção com *Pasteurella multocida* tipo A foram observados pneumonia bronco intersticial com presença de exsudação de fibrina. Em uma delas foi observada também pneumonia intersticial e broncopneumonia fibrino purulenta aguda.

A presença de *Pasteurella multocida* tipo D foi detectada em uma amostra na qual foi observada broncopneumonia fibrinosa aguda.

A associação entre *Pasteurella multocida* tipo A e tipo D permitiu a observação de broncopneumonia fibrinosa aguda caracterizada por infiltrado linfocitoplasmático com localização peribronquial, peribronquiolar e perivascular, associada à pneumonia intersticial caracterizada por septos alveolares espessados por infiltrado de histiócitos e hiperplasia de macrófagos alveolares. E de pleuropneumonia fibrino

purulenta com abundante exsudação de neutrófilos e de fibrina na pleura visceral, nos espaços alveolares e na luz de brônquios e bronquíolos.

Em quatro amostras foi identificada coinfeção com *Pasteurella multocida* tipo A e *Streptococcus suis*. Em cada uma delas a manifestação da lesão pulmonar foi distinta. Em uma amostra foi observada pneumonia bronco intersticial semelhante aos casos de associação negativa com bactérias. Em uma segunda amostra foi observada pleurite fibrinosa e pneumonia bronco intersticial, caracterizada por exsudação na pleura visceral, infiltrado linfocitário e moderada proliferação de folículos linfóides bronco associados. Em uma terceira foi observada broncopneumonia fibrino supurada com exsudação de fibrina nos espaços alveolares, na luz de brônquios e bronquíolos, e infiltrado linfocitário. E na quarta amostra foi observada broncopneumonia fibrinosa aguda.

As lesões observadas com a associação entre as *Pasteurella multocida* tipo A e D e *Streptococcus suis* foram pleurite fibrino-hemorrágica difusa, caracterizada por abundante exsudação de fibrina na pleura visceral acompanhada de área de hemorragia e moderado infiltrado inflamatório constituído predominantemente de linfócitos, neutrófilos e macrófagos. Observou-se ainda discreto infiltrado inflamatório linfocitário peribronquiolar.

Pleuropneumonia fibrino supurada crônica com presença de micro abscessos, exsudação de fibrina com grumos bacterianos e áreas de necrose foi observada em amostra com a associação de *Pasteurella multocida* tipo A e *Bordetella bronchiseptica*.

Já a associação entre *Pasteurella multocida* tipo A, *Bordetella bronchiseptica* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo

3, foi observado quadro de pleurite crônica com broncopneumonia supurada multifocal.

Em duas amostras foi identificada a associação entre *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 3. Entretanto em uma amostra a *Pasteurella multocida* era do tipo A e na outra do tipo D. Em ambas as amostras foi observada broncopneumonia fibrino supurada aguda. Mas observou-se na amostra com a *Pasteurella multocida* tipo D a presença de intensa exsudação de fibrina e de neutrófilos, com localização subpleural nos espaços alveolares e na luz de brônquios e bronquíolos.

Em uma amostra na qual foi identificada a associação entre as bactérias *Pasteurella multocida* tipo A, *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 3 e *Escherichia coli* não hemolítica foi observada pleuropneumonia fibrino supurada aguda caracterizada por abundante exsudação de fibrina na pleura visceral, infiltrado inflamatório linfocitário, peribronquiolar e peribronquiolar, infiltrado inflamatório neutrofílico nos espaços alveolares e na luz de bronquíolos. E presença de áreas de necrose e focos de hemorragia.

A *Pasteurella multocida* tipo A ou tipo D geralmente considerada um agente oportunista tem sido recentemente relacionado a numerosos casos de severa broncopneumonia frequentemente associada à pleurite. Estes achados têm indicado uma maior virulência de certos isolados e a possibilidade inclusive, de que possam ser considerados como patógenos primários, apesar de geralmente estarem relacionados a infecções mistas com vírus e bactérias (Davies *et al.*, 2003). Tal assertiva pôde ser observada no presente trabalho com amostras comprovadamente positivas para o CVS-2 pela PCR e que no isolamento apresentaram *P. multocida* acompanhada de um ou mais patógenos bacterianos. Um exemplo disso foi o isolamento em uma

amostra da *P. multocida* e *E. coli*, tal qual retratado por Halloy *et al.* (2005) em estudo com suínos experimentalmente infectados com as duas bactérias. No presente trabalho foi observado ainda quadro pneumônico em suínos infectados tanto com sorotipos A quanto D em conformidade com o que Pijoan (2006) e Borowski *et al.* (2007) já haviam determinado.

No Brasil o número de isolamentos de cepas de *Pasteurella multocida* a partir de pulmões de suínos com pneumonia e pleurite assim como sua identificação nos diversos estados brasileiros produtores de suínos tem sido grande (Borowski, 2006). Neste estudo a *Pasteurella multocida* tipo A pôde ser encontrada nos estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e no Rio Grande do Sul demonstrando estar presente em praticamente todas as regiões produtoras, independente do manejo. Enquanto que a *Pasteurella multocida* tipo D foi encontrada apenas em Goiás, Minas Gerais, e Rio Grande do Sul (**Gráfico 2**).

O *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 3 assim como o sorotipo 8 foram identificados em amostras estudadas. As lesões observadas nas amostras com o sorotipo 3 foram caracterizadas por pleuropneumonia fibrino necrótica aguda com abundante exsudação de fibrina na pleura visceral e nos espaços alveolares, além de áreas de necrose e de hemorragia. Enquanto que naquelas com o sorotipo 8 foi observada pneumonia intersticial caracterizada por septos alveolares espessados por infiltrado de histiócitos. Além de pleuropneumonia fibrino hemorrágica aguda com intensa exsudação de fibrina, subpleural, nos espaços alveolares e na luz de bronquíolos, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico ao redor de brônquios e de bronquíolos. E também o espessamento dos septos alveolares e infiltrado neutrofílico na luz dos alvéolos. Os achados de pleuropneumonia em ambos os casos foram

coerentes com a descrição de Heres (2009) que diferenciou a pleurite do tipo seca induzida pela *P. multocida* daquela induzida pelo *A. pleuropneumoniae* caracterizada pela infiltração de fibrina. Conforme ressaltado pelo mesmo autor, à microscopia as lesões pulmonares com envolvimento da *P. multocida* são bastante similares às presentes na maioria das pneumonias bacterianas e caracterizam-se por pneumonia exsudativa com a presença de neutrófilos.

Surtos com *Actinobacillus pleuropneumoniae* estão frequentemente associados a presença de outros patógenos primários. Assim a infecção do animal por um destes agentes promove alterações do sistema de defesa pulmonar, predispondo às infecções secundárias por *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Actinobacillus suis*.

No **Gráfico 2** pôde ser observada a presença deste agente nos estados de Mato Grosso e Minas Gerais, ambos considerados pólos importantes de distribuição de suínos para as diferentes regiões brasileiras. Particularmente em Minas Gerais este achado foi relevante devido a importância do estado na suinocultura brasileira e à múltipla identificação e isolamento de outras bactérias pulmonares também relacionadas ao CDRS.

Em duas amostras a *Bordetella bronchiseptica* foi isolada. Em uma delas foi observada broncopneumonia purulenta multifocal caracterizada por infiltrado inflamatório linfohistiocitário peribronquial, peribronquiolar e perivascular, infiltrado neutrofílico nos espaços alveolares e na luz de brônquios e bronquíolos com moderada proliferação de folículos linfóides bronco-associados. Na outra amostra foi observada pneumonia intersticial focal e broncopneumonia fibrino supurada aguda. Foi possível observar nas 2 amostras a infiltração dos espaços aéreos por neutrófilos sem contudo a presença de

necrose de alvéolos, e vasos sanguíneos ou de hemorragia que geralmente caracterizam os quadros de infecção pulmonar pela *B. bronchiseptica*.

Em uma amostra foi identificada as bactérias *Bordetella bronchiseptica* e *Haemophilus parasuis*. À avaliação histopatológica observou-se pleurite fibrinosa aguda e broncopneumonia fibrino purulenta aguda.

Diversos estudos (Banemann e Gross, 1997; Brockmeier e Register, 2000; Hewlett *et al.*, 2006 e Brockmeier e Register, 2007) têm indicado mecanismos pelos quais a *B. bronchiseptica* é capaz de predispor o hospedeiro à infecções por outras bactérias. A toxina dermatonecrótica é incriminada como um dos principais fatores pela sua capacidade de alterar o *clearance* através da destruição do epitélio ciliar, aumento do muco além da exposição de áreas da submucosa facilitando a adesão de outras bactérias como o *H. parasuis*, *Streptococcus suis* e a *P. multocida*.

A *Bordetella bronchiseptica* foi identificada (**Gráfico 2**) em amostras dos estados de Espírito Santo e Rio Grande do Sul. Epidemiologicamente sua presença adquiriu maior relevância no estado do Rio Grande do Sul onde a *P. multocida* tipo D também foi identificada indicando a possibilidade de ocorrência de casos de rinite atrófica progressiva em plantéis da região.

Em duas amostras foi identificada *Haemophilus parasuis*. Em uma delas foi observada pneumonia broncointersticial aguda caracterizada por septos alveolares espessados por infiltrado de histiócitos, abundante exsudação de fibrina e de neutrófilos na luz de brônquios, bronquíolos e espaços alveolares. Presença de infiltrado linfocitário peribronquial, peribronquiolar, perivascular e intensa proliferação de macrófagos alveolares. Em outra foi observada pleurite fibrinosa difusa e pneumonia intersticial multifocal. As

lesões observadas nestas 2 amostras são coincidentes com as descrições de Vahlé *et al.* (1995) Vahlé *et al.* (1997). Nestes trabalhos os autores definiram o *H. parasuis* como agente etiológico da broncopneumonia supurativa, caracterizada por consolidação das secções antero-ventrais do pulmão e pela presença de exsudato purulento nos brônquios e bronquíolos. Foi observado sua capacidade em induzir lesões no epitélio da mucosa ao se associar com a camada mucosa da cavidade nasal e promover a liberação de compostos tóxicos além de sua capacidade em induzir infecções respiratórias e rinite atrófica induzida pela *Pasteurella multocida*.

No presente trabalho, o *H. parasuis* foi identificado (**Gráfico 2**) apenas nos estados de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, entretanto os achados foram considerados relevantes uma vez que em rebanhos imunologicamente debilitados o patógeno geralmente manifesta-se de forma aguda provocando perdas econômicas significativas devido a mortalidade elevada em leitões, grande número de refugos além da depreciação de carcaças no abatedouro.

A *Escherichia coli* não hemolítica foi observada em uma amostra na qual foi observada pneumonia broncointersticial crônica com intensa fibrose peribronquial e peribronquiolar, abundante exsudação fibrina e de neutrófilos nos espaços alveolares e na luz de brônquios e bronquíolos. Em outra amostra, a *E. coli* não hemolítica foi identificada juntamente com o *Streptococcus suis* e neste caso foi observada pneumonia broncointersticial e broncopneumonia supurada. Em todas as amostras nas quais a *E. coli* foi identificada, em infecção isolada ou mista pôde ser observado a presença de lesões pulmonares caracterizadas por processos inflamatórios com a presença de infiltrado linfocitário e neutrofilico nos espaços alveolares e no interior de brônquios e bronquíolos além de exsudato de fibrina.

Estes achados estão de acordo com os estudos de Olson *et al.* (1995), O'Grady *et al.* (2001), Halloy *et al.* (2005) que determinaram a indução de resposta inflamatória aguda sobre células mononucleares fagocitárias e neutrófilos induzida pelas endotoxinas da *E.coli*, aumentando os riscos de uma infecção respiratória assintomática evoluir para um quadro de pneumonia infecciosa. Entretanto é importante ressaltar que as amostras enviadas para o laboratório de diagnóstico parceiro deste trabalho foram coletadas de animais com sinais clínicos da SACS que foram sacrificados. Assim sendo devemos ser cautelosos em não excluir a possibilidade da ocorrência de contaminação das amostras pela *E. coli* durante sua coleta à necropsia.

7.5 Associações entre lesões microscópicas e título infeccioso

O título infeccioso das 205 amostras foi estabelecido através da inoculação de diluições dos homogeneizados de tecidos em monocamadas celulares. Os títulos obtidos foram agrupados em 4 categorias: negativos (< 10), baixo (10 a 30), moderado (90 a 270) e alto (> 810). O título infeccioso de 83 amostras com descrição histopatológica foi comparado com as categorias discreta, moderada e grave de classificação da severidade das lesões (conforme Chianini *et al.*, 2003), através do teste Exato de Fisher. Não foi encontrada significância, ou seja lesões discretas, moderadas e severas são estatisticamente iguais em todas as categorias de títulos (negativos, baixo, moderado, e alto). Os resultados podem ser observados na **Tabela 5** e no **Gráfico 4**.

Tabela 5 Análise de associação entre os títulos utilizados e os tipos de lesões encontradas nas amostras.

Título	lesões			Total	Teste Exato de Fisher (Prob)			
	Discreta (D)	Moderada (M)	Severa (S)		D x M	D x S	M x S	
Negativo(N)	0	2	1	3				
Baixo(B)	5	9	4	18	N x B	0,4583	0,5000	0,7054
Médio(ME)	7	3	2	12	N x ME	0,1515	0,3000	0,7143
Alto(A)	0	0	2	2	N x A	-	-	0,3000
					B x ME	0,1069	0,3100	0,5609
					B x A	-	0,2727	0,1429
					ME x A	-	0,1091	0,2857

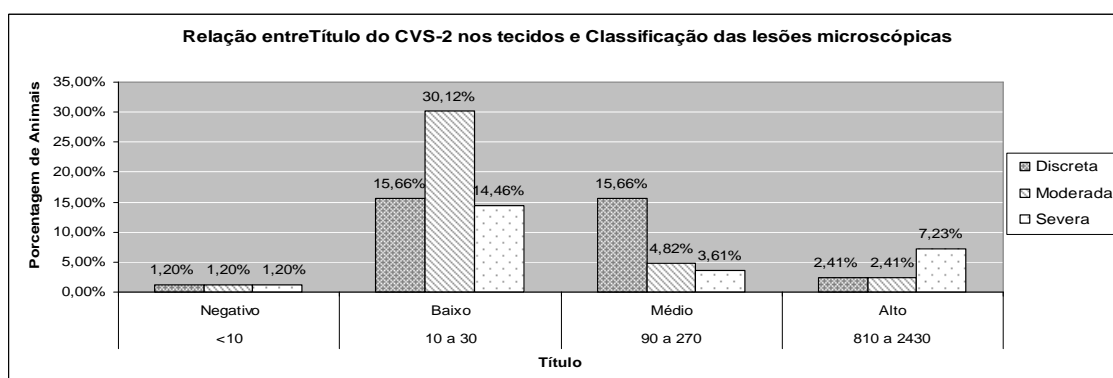


Gráfico 4 Títulos infecciosos do CVS-2 categorizados em baixos e médios relacionados com a classificação das lesões (discreta, moderada e severa) de 83 amostras analisadas

Mesmo quando a comparação foi realizada entre os grupos de extratos de pulmões com isolamento bacteriano (n=37) e sem isolamento bacteriano (n=34) através do teste Exato de Fisher não houve diferença significativa (**Anexo 7**).

O mesmo foi observado quando a correlação foi estabelecida entre estes dois grupos quanto ao título infeccioso de CVS-2, e a classificação das lesões histopatológicas ou seja, nestes dois grupos também não foi possível observar diferenças significativas (**Tabela 6**).

Tabela 6 Relação entre o título infeccioso de CVS-2 classificado em alto (≥ 810), médio (90 a 270) e baixo (<10 a 30) em amostras de extratos de pulmões sem isolamento de agentes bacterianos (n = 37) e com isolamento de agentes bacterianos (n = 34) e a classificação das lesões histopatológicas em discretas, moderadas e graves

Título	Amostras de extratos de pulmões sem isolamento e identificação de coinfeções bacterianas (n=12)			Amostras de extratos de pulmões com isolamento e identificação de coinfeções bacterianas (n=32)		
	Classificação das lesões microscópicas			Classificação das lesões microscópicas		
	Discreta	Moderada	Severa	Discreta	Moderada	Severa
Alto	0	0	1	1	2	2
Médio	1	2	0	5	1	2
Baixo	1	2	5	6	10	3

As alternativas que explicam este fato podem ser esclarecidas pelos animais recentemente infectados que podem apresentar lesões microscópicas discretas associadas a grandes quantidades de vírus infecciosos devido a altas taxas de replicação viral nas fases iniciais da infecção. Contrariamente aqueles animais que na fase tardia da doença podem apresentar lesões microscópicas severas e baixa carga de vírus infeccioso característica de infecção viral parcialmente controlada. Outra alternativa plausível seria a diferença na aplicabilidade dos testes dificultando a correlação entre o título infeccioso e as lesões microscópicas, uma vez que a primeira técnica detecta vírus infeccioso enquanto a outra permite a visualização das lesões causadas pela passagem do vírus no organismo do animal. Ou ainda a possibilidade de problemas com a conservação das amostras que poderia ocasionar baixos títulos infecciosos em amostras com lesões histológicas moderadas a severas. E finalmente, deve ser citada a porcentagem de animais que podem se recuperar e apresentar nos estágios crônicos

lesões microscópicas discretas ou mesmo ausentes com títulos baixos indicando quantidades mínimas de CVS-2 em tecidos linfóides e não linfóides.

7.6 Sequenciamento

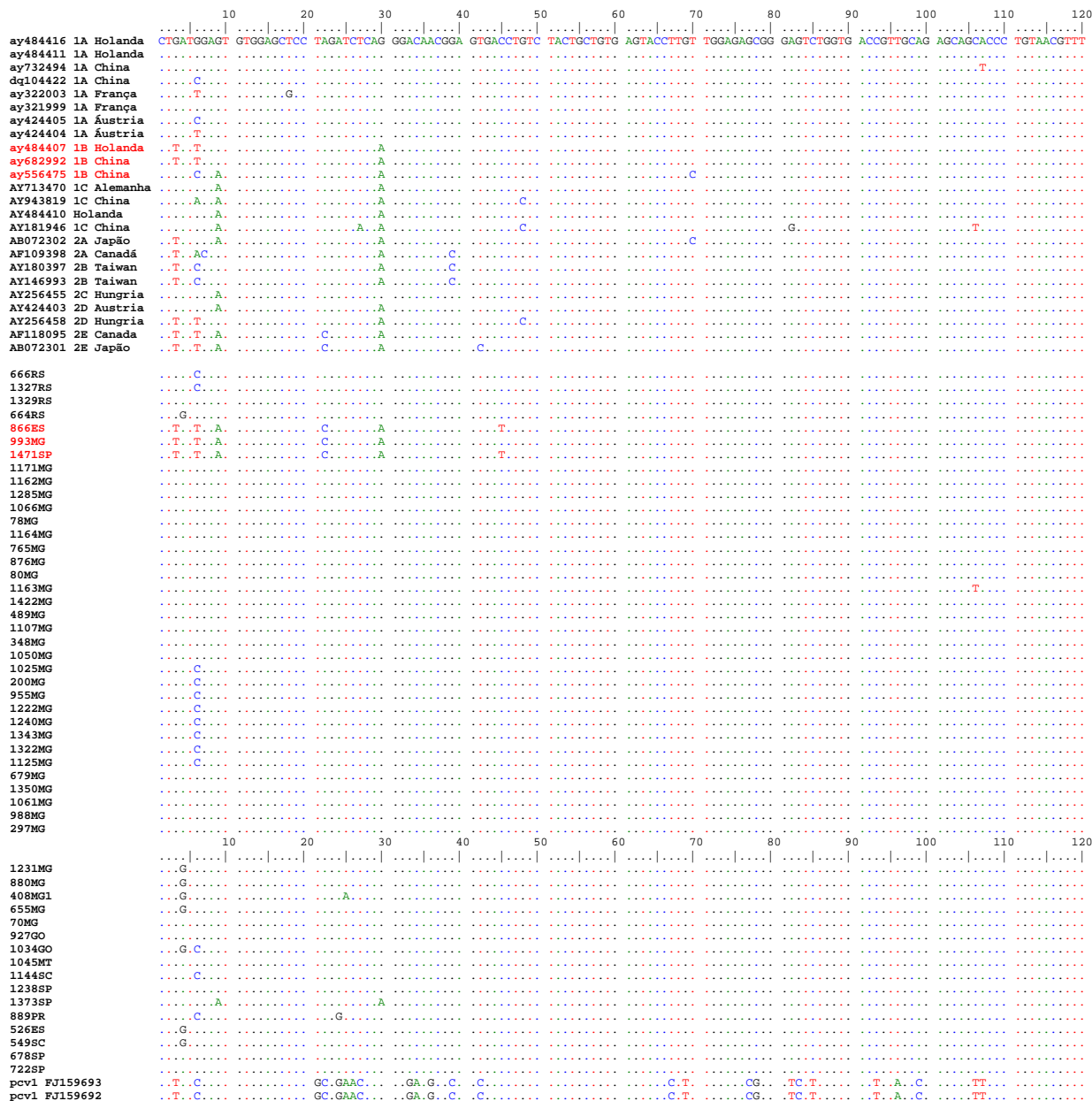
Foram sequenciadas 51 amostras do banco de dados para o estudo da ORF2 e 89 amostras para estudo da ORF3.

7.7 Análise filogenética da ORF2 do CVS-2

O alinhamento das sequências das 51 amostras do presente trabalho e mais 24 amostras do GenBank (**Figura 14**) permitiu observar o agrupamento das mesmas no grupo 1 e subgrupos 1A e 1B conforme Olvera *et al.* (2007). No presente trabalho não conseguimos identificar nenhuma amostra do grupo 2. Relevante, também, foi a diferença na porcentagem entre os dois subgrupos, pois enquanto o 1A apresentou 88,5% das amostras dispostas entre os estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná,

Santa Catarina e Rio Grande do Sul, apenas 11,5% das amostras foram classificadas no subgrupo 1B, com amostras nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo. Entretanto é preciso ressaltar que na totalidade das amostras, Minas Gerais detinha 66,66% e como apenas uma amostra desse total foi do subgrupo 1B sua influência

na distribuição das amostras no subgrupo 1A foi marcante (**Figura 15**). Outro fator que deve ser considerado é o grande trânsito entre suínos de Minas Gerais para os demais estados representando um fluxo genético dispersor de variantes predominantes em Minas Gerais devido ao comércio regular com os outros estados.



		130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	
ay484416	1A	Holanda	GTCAGAAAT	TCCGCGGGCT	GGCTGAACTT	TIGAAAGTGA	GCGGGAAAAAT	GCAGAAAGCGT	GATTGGAAGA	CTAATGTACA	CGTCATTGTG	GGGCCACCTG	GGTGTGGTAA	AAGCAATGG
ay484411	1A	Holanda	
ay732494	1A	ChinaG.....	
dq104422	1A	ChinaG.....C.....	
ay322003	1A	França	
ay321999	1A	França	
ay424405	1A	Áustria	
ay424404	1A	Áustria	
ay484407	1B	Holanda	
ay682992	1B	China	
ay556475	1B	China	
AY713470	1C	Alemanha	
AY943819	1C	China	
AY484410	HolandaG.....G.....	
AY181946	1C	China	
AB072302	2A	Japão	
AF109398	2A	Canadá	
AY180397	2B	Taiwan	
AY146993	2B	Taiwan	
AY256455	2C	Hungria	
AY424403	2D	Áustria	
AY256458	2D	Hungria	
AF118095	2E	Canadá	
AB072301	2E	Japão	
666RS	
1327RS	
1329RS	
664RS	
866ES	
993MGC.....	
1471SP	
1171MG	
1162MG	
1285MG	
1066MG	
78MG	
1164MG	
765MG	
876MG	
80MG	
1163MG	
1422MG	
489MG	
1107MG	
348MG	
1050MG	
1025MG	
200MG	
955MG	
1222MG	
1240MG	
1343MG	
1322MG	
1125MG	
679MG	
1350MG	
1061MG	
988MG	
297MG	
1231MG	
880MG	
408MG1	
655MG	
70MG	
927GO	
1034GO	
1045MT	
1144SC	
1238SP	
1373SP	
889PR	
526ES	
549SC	
678SP	
722SP	
pev1_FJ159693G.....C.....AGC.....A.....C.....G.....T.....G.....G.....
pev1_FJ159692G.....C.....AGC.....A.....C.....G.....T.....G.....G.....

		490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
1222MG	
1240MG	
1343MG	
1322MG	
1125MG	
679MG	
1350MG	
1061MG	
988MG	
297MG	
1231MG	
880MG	
408MG1	
655MG	
70MG	
927GO	
1034GO	
1045MT	
1144SC	
1238SP	
1373SP	
1471SP	
889PR	
526ES	
549SC	
678SP	
722SP	
pcv1 FJ159693	
pcv1 FJ159692	

		610	620	630	640	650	660
ay484416	1A Holanda	GTAGTCTCAG	CCACAGCTGA	TTTCITTTGT	TGTTTGGTTG	GAAGTAATCA	ATAGTGGAAAT
ay484411	1A Holanda
ay732494	1A China
dq104422	1A China
ay322003	1A França
ay321999	1A França	.G.....
ay424405	1A Áustria
ay424404	1A Áustria
ay484407	1B Holanda
ay682992	1B China
ay556475	1B China
AY713470	1C AlemanhaG..T..A..G..G..T..CCT..A.....
AY943819	1C ChinaG..T..A..G..G..T..CCT..A.....
AY484410	Holanda	.C.....G..T..A..G..C..T..CCT..A.....
AY181946	1C ChinaG..T..A..G..G..T..CCT..A.....
AB072302	2A JapãoG..T..A..G..G..T..CCC..A.....
AF109398	2A CanadáG..T..A..G..G..T..CCC..A.....
AY180397	2B TaiwanC.....A.....C.....A.....

		610	620	630	640	650	660
AY146993	2B TaiwanC.....A.....C.....A.....
AY256455	2C HungriaC.....A.....C.....A.....
AY424403	2D ÁustriaC.....A.....C.....A.....
AY256458	2D Hungria	.G.....T..C.....A.....
AF118095	2E CanadáC.....A.....C.....A.....G.....
AB072301	2E JapãoC.....A.....C.....A.....G.....

666RS
1327RS
1329RSG.....
664RS
866ESC.....
993MG
1171MG
1162MG
1285MGA.....
1066MG
78MG
1164MG
765MG
876MG
80MGAC.G.
1163MG
1422MG
489MG
1107MG
348MG
1050MG
1025MG
200MG
955MG
1222MG
1240MG
1343MGG.....
1322MG
1125MGA.....
679MG
1350MG
1061MG
988MG
297MG

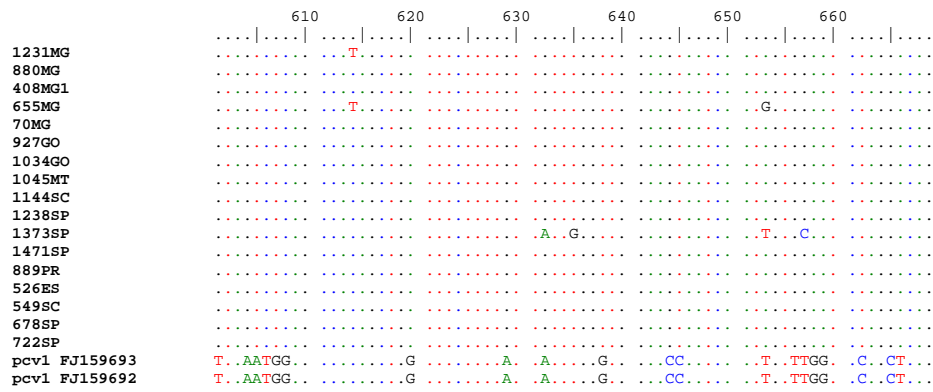


Figura 14 Alinhamento dos fragmentos da ORF2 para agrupamento das sequências dentro dos grupos e subgrupos do CVS-2

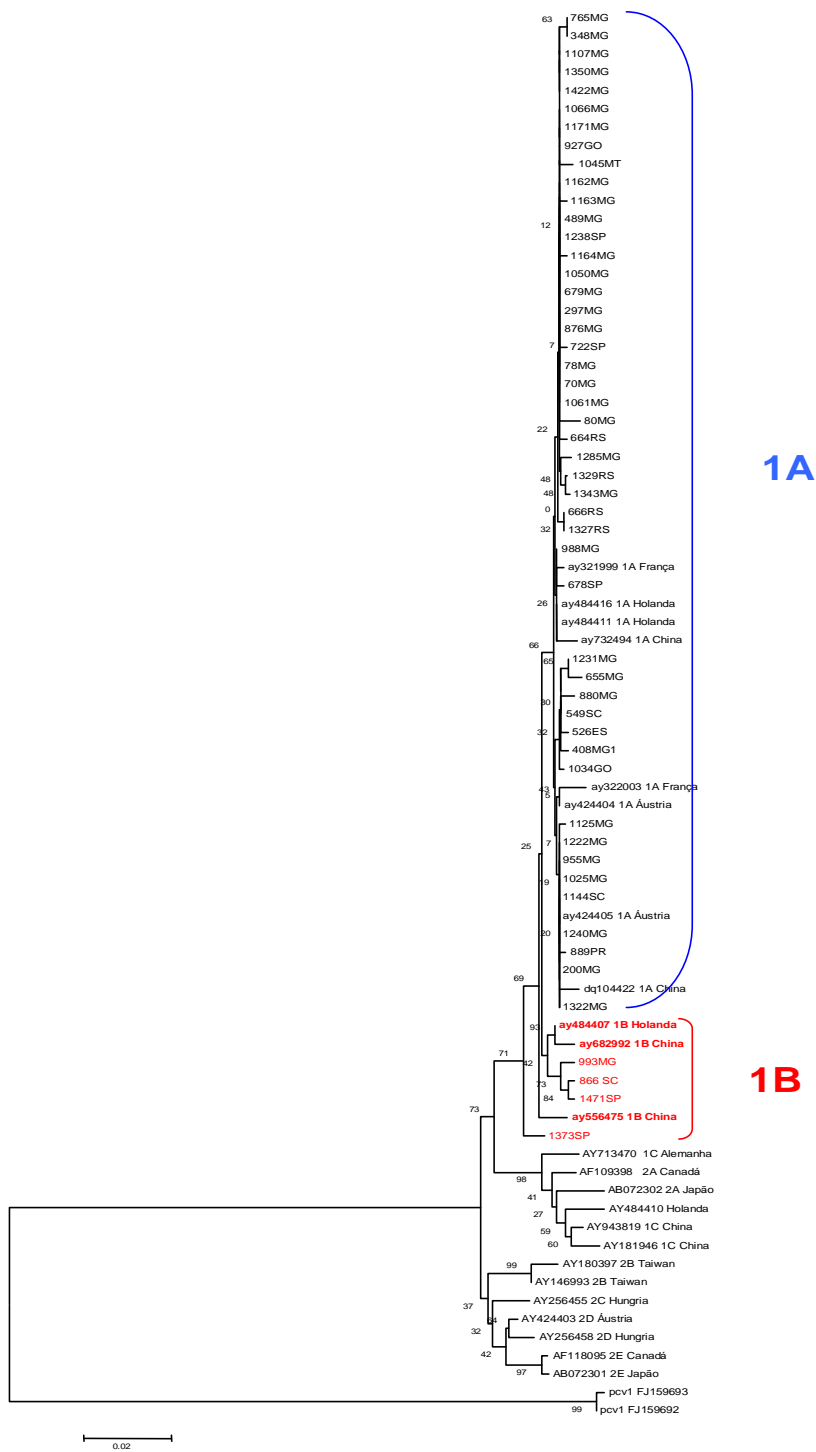


Figura 15 Árvore Filogenética da ORF-2 do CVS-2 construída pelo método de distância *Neighbor-Joining* (azul grupo 1 subgrupo A e vermelho grupo 1 subgrupo B)

Os nossos achados estão de acordo com o trabalho de Chiarelli-Neto *et al.* (2008) que também não detectaram qualquer outra amostra do grupo 2 no Brasil. Em seu trabalho os autores agruparam as amostras, pertencentes aos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, São Paulo (92,86% do total) no grupo 1, subgrupo 1AB. Sua classificação foi baseada na afirmação de Olvera *et al.* (2007) de que o subgrupo 1B é um variante recombinante resultado da ORF2 do subgrupo 1A com a ORF1 do subgrupo 2D, e com Hesse *et al.* (2008) que afirmaram que o grupo e subgrupo 1A do CVS-2 está normalmente associado a casos de SACS. Tal afirmativa está em acordo com o presente trabalho onde todas as amostras foram originárias de suínos com sinais clínicos das Síndromes Associadas à Circovirose Suína sendo 88,5% inseridas no 1A e, apenas 11,5% no 1B. É importante ressaltar que no presente trabalho a amostragem foi baseada na demanda do laboratório de diagnóstico parceiro (IPEVE) e que não priorizou um cálculo do número de amostras por estado para uma análise de prevalência, portanto não foi possível determinar se os dados obtidos se devem a grande concentração das amostras em Minas Gerais e estados relacionados, ou ao predomínio efetivo do subgrupo 1A nos estados brasileiros.

Já Castro *et al.* (2007) e Ciacci-Zanella *et al.* (2009) encontraram amostras do grupo 2 e subgrupos D e E em São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul nos anos de 2003 e 2004. Este fato pode ter ocorrido devido a introdução de variantes via animais e sêmen ou à proximidade geográfica entre as propriedades amostradas, localizadas predominantemente no sul do país o que explicaria não terem sido observados representantes do grupo 2 do CVS-2 nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. Outra possibilidade a ser aventada no caso das seqüências de Santa Catarina é o

sistema de integração que favorece a multiplicidade de animais de origens diferentes circulando entre as granjas.

Um exemplo de introdução via importação de animais foi relatado por Carman *et al.* (2008) num estudo na província do Quebec no Canadá, onde foram encontradas variantes genéticas do CVS-2 previamente detectadas na França, ocasionando sua subsequente distribuição para outras províncias através do comércio regular entre as províncias.

Opriessning *et al.* (2006) especularam que diferentes apresentações clínicas da circovirose poderiam ser relacionadas à variação na patogenicidade entre os isolados. Enquanto que Sorden (2000); Quintana *et al.* (2001), Casalmiglia *et al.* (2002) e Madec *et al.* (2000) afirmaram que a presença do CVS-2 pode não implicar necessariamente em doença, assim como alguns sinais clínicos podem não ser específicos para a SACS, sendo fatores importantes e geralmente associados o manejo, a densidade populacional, e a presença de co-infecções na duração da SACS e sinais clínicos associados. No presente trabalho todas as amostras estudadas foram associadas com desordens respiratórias associadas a SACS independente do subgrupo que pertenciam. Castro *et al.* (2007) encontraram animais com sinais clínicos de emagrecimento, desordens respiratórias e outros ainda sem qualquer sinal clínico enquanto Ciacci-Zanella *et al.* (2009) relacionaram suas amostras a sinais clínicos de desordens respiratórias, enterite proliferativa, fetos abortados, síndrome da dermatite e nefropatia suína apesar dos diferentes grupos e subgrupos encontrados nos diferentes estados.

Das 51 amostras estudadas nos diferentes estados apenas 22 delas possuíam avaliação

histopatológica e, mais uma vez independentemente do subgrupo do CVS-2 as amostras apresentavam lesões microscópicas variando entre discretas,

moderadas e severas conforme a classificação de Chianini *et al.* (2003) (**Tabela 7**).

Tabela 7 Grupo 1 e subgrupos A e B do CVS-2 e sua relação com lesões microscópicas classificadas em discretas, moderadas e severas nas 22 das 83 amostras estudadas

Amostras	Estados	Grupo 1 subgrupos 1A e 1B	Classificação lesões microscópicas
765	MG	1A	Discreta
880	MG	1A	Discreta
549	SC	1A	Discreta
526	ES	1A	Discreta
889	PR	1A	Discreta
866	SC	1B	Discreta
1171	MG	1A	Moderada
679	MG	1A	Moderada
1061	MG	1A	Moderada
1327	RS	1A	Moderada
678	SP	1A	Moderada
655	MG	1A	Moderada
1125	MG	1A	Moderada
1222	MG	1A	Moderada
955	MG	1A	Moderada
1322	MG	1A	Moderada
1066	MG	1A	Severa
1343	MG	1A	Severa
1034	GO	1A	Severa
1025	MG	1A	Severa
1240	MG	1A	Severa
993	MG	1B	Severa

Carman *et al.* (2008) discutem que o aumento da severidade das lesões histopatológicas em múltiplos tecidos afetados por cepas variantes poderia ser relacionado a aumento da virulência devido a propriedades genéticas do novo vírus, alterações nos seus aminoácidos, e mutações silenciosas que poderiam afetar a transcrição do RNAm viral, a tradução das proteínas virais ou mesmo a replicação do vírus. Por outro lado Segalés *et al.* (2004a) ressaltam a importância do conhecimento da época da coleta do tecido para avaliação histopatológica em relação ao tempo pós inoculação, pois animais recentemente infectados (antes dos 21-25 pós infecção

onde ocorre o pico de replicação do vírus) ou em fase terminal (após 35 dias pós infecção na fase de declínio da replicação viral) podem apresentar lesões microscópicas discretas ou mesmo ausentes, que não auxiliam na classificação da virulência dos variantes circulantes.

Nos anos de 2005 e 2006 um aumento na frequência de casos severos da SACS na América do Norte levou Carman *et al.* (2006); Gagnon *et al.* (2007); Cheung *et al.* (2007); Horlen *et al.* (2007) a tentarem estabelecer este fenômeno com a introdução de uma cepa nova mais virulenta do CVS-2, mas não obtiveram sucesso. Opriessnig *et al.*

(2008) buscando determinar se a diversidade de cepas do CVS-2 influenciaria na sua virulência utilizaram clones de diferentes variantes dos grupos 2A e 2B do CVS-2 em animais SPF. Seus resultados demonstraram não haver diferenças na virulência entre os distintos grupos do CVS-2, mas apontaram que diferenças na virulência poderiam ser encontradas nas variantes de cada grupo possivelmente devido a mínimas alterações nos genomas. Embora Olvera *et al.* (2007) tenham afirmado que a sequência do gene ORF2 seja adequada apenas para separar os isolados dentro de grupos e subgrupos, não permitindo, contudo associação de genótipos específicos com o estado de saúde do animal ou sua origem geográfica.

Um achado interessante foram amostras pareadas (mesma propriedade) com diferença de um ano entre a data de coleta (2006 e 2007) que pertenciam aos subgrupos 1B e 1A. Esse achado indica que variantes distintos circularam na mesma propriedade, entretanto não foi possível estabelecer se houve diferença quanto a virulência dos mesmos, pois não dispúnhamos das descrições das lesões microscópicas das duas amostras.

7.8 Análise Filogenética da ORF3 do CVS-2

Todos os 89 homogeneizados de tecidos foram amplificados com o par de oligonucleotídeos iniciadores Fa3/Ra3 resultando num fragmento de 371 pares de bases que compreende a ORF3 do CVS-2. A análise filogenética da sequência da ORF3 permitiu identificar e discriminar os três genogrupos definidos por Timmusk *et al.* (2008) nas amostras dos diferentes Estados do Brasil. No genogrupo SG1 foram agrupadas sequências de São Paulo e Santa Catarina correspondendo a 3,4% do total. No genogrupo SG2 foram reunidas sequências do Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Santa

Catarina correspondendo a 12,3% das sequências. Um total de 84,3% das sequências foram agrupadas no genogrupo SG3 que reuniu sequências de todos os 9 Estados estudados, sendo que 58,6% dessas eram originárias de propriedades de Minas Gerais.

A avaliação da possibilidade de diferentes variantes circulando numa mesma propriedade em datas distintas foi testada. As 31 amostras selecionadas por apresentarem uma contrapartida coletada na mesma propriedade em épocas distintas, 67,74%, originárias de Mato Grosso, Minas Gerais e Paraná foram classificadas em SG3B e 6,45% de Mato Grosso foram classificadas em SG2D enquanto 25,81% das amostras originárias de Goiás, São Paulo e Santa Catarina, apresentaram diferentes classificações em cada coleta. As amostras de Santa Catarina classificadas em SG1 na primeira coleta foram classificadas em SG2B e SG2A na seguinte, as de São Paulo coletadas entre dezembro de 2006 e junho de 2007 foram classificadas como SG3B e as de Goiás foram classificadas na primeira coleta como SG2D e na seguinte como SG3A.

A maior porcentagem das amostras testadas manteve a mesma classificação entre as diferentes coletas, entretanto foi possível observar amostras diferentes circulando em uma mesma propriedade em datas distintas tanto em Santa Catarina caracterizada pelo sistema de integração de múltiplas origens quanto em São Paulo e Goiás caracterizadas por ciclo contínuo de origem única. A ocorrência de amostras coletada em datas distintas e classificadas em SG1, SG2 e SG3 indica a presença de variantes do CVS-2, circulando em uma mesma propriedade e num mesmo Estado.

Conforme Steverink *et al.* (2002) a doença é mais comumente encontrada em granjas de terminação de múltiplas origens como no caso das propriedades do Estado de Santa

Catarina. Uma vez que a chance de entrada de um novo variante no plantel é muito grande e o risco de eventos de mutação, recombinação na presença de múltiplos variantes como descrito por Hesse *et al* (2008), apesar do gene da ORF3 ser mais conservado em relação ao da ORF2, é maior que no sistema de fluxo contínuo. Interessante que esse tipo de substituição de variantes também ocorreu em granjas de ciclo completo com fluxo contínuo como em Goiás e São Paulo e um espaço de tempo curto, em torno de sete meses.

As sequências do *GenBank* utilizadas como referência para cada um dos genogrupos (SG1, SG2, e SG3) e as sequências de aminoácidos das amostras estudadas foram comparadas quanto a identidade na sequência de resíduos de aminoácidos (**Figura 16**). As 89 sequências do presente

estudo apresentaram similaridade de 97%, 98% e 99% com as sequências referências do GenBank para os genogrupos SG1, SG2 e SG3, respectivamente. Em SG2 e SG3 foi possível a subdivisão em categorias (SG2: A, B, C, D e SG3: A e B) de acordo com a identidade de sua sequência de resíduos de aminoácidos. No subtipo SG3A todas as 16 amostras apresentaram um resíduo de aminoácido diferente da amostra AY322000 na posição 103. No subtipo SG3B, 54 amostras apresentaram 100% de identidade com a sequência de referência AY322000 e apenas cinco amostras (1045, 1231, 532, 408 e 1164) demonstraram menor identidade devido à diferença nos resíduos de aminoácidos: em 1045 nas posições 16 e 26; em 1231 na posição 19, em 532 e 408 na posição 96 e 1164 na posição 58 (**Quadro 1**).

Quadro 1 Comparação quanto a identidade dos resíduos de aminoácidos entre as sequências de referência do GenBank para os três genogrupos SG1, SG2 e SG3 do CVS-2 e as 89 amostras do estudo dos animais clinicamente afetados

CARACTERÍSTICAS	Genogrupo SG1 (AF201307)	Genogrupo SG2 (AF201305)				Genogrupo SG3 (AY322000)	
		a	b	c	d	a	b
Localização dos genogrupos nos Estados Brasileiros do estudo	SP, SC	MT, GO, MG, SP, SC	SC	ES, SP	MT, GO	GO, MG, ES, SC, RS	MT, GO, MG, ES, SP, PR, SC, RS
Porcentagem de identidade com a sequência referência do Genbank	97%	98%				99%	
Número de resíduos de diferença com a sequência referência	2 (SP); 4 (SC)	1	2	2	1	1	0
Identificação dos resíduos de aminoácidos divergentes da sequência referência	14 I → V; 41 R → S (SP) / 14 I → V; 29 A → T; 41 R → S; 103 H → D (SC)	102 L → F	102 L → F; 104 K → Q	41 G → S; 102 L → F	41 G → S	103 H → D	Não observado

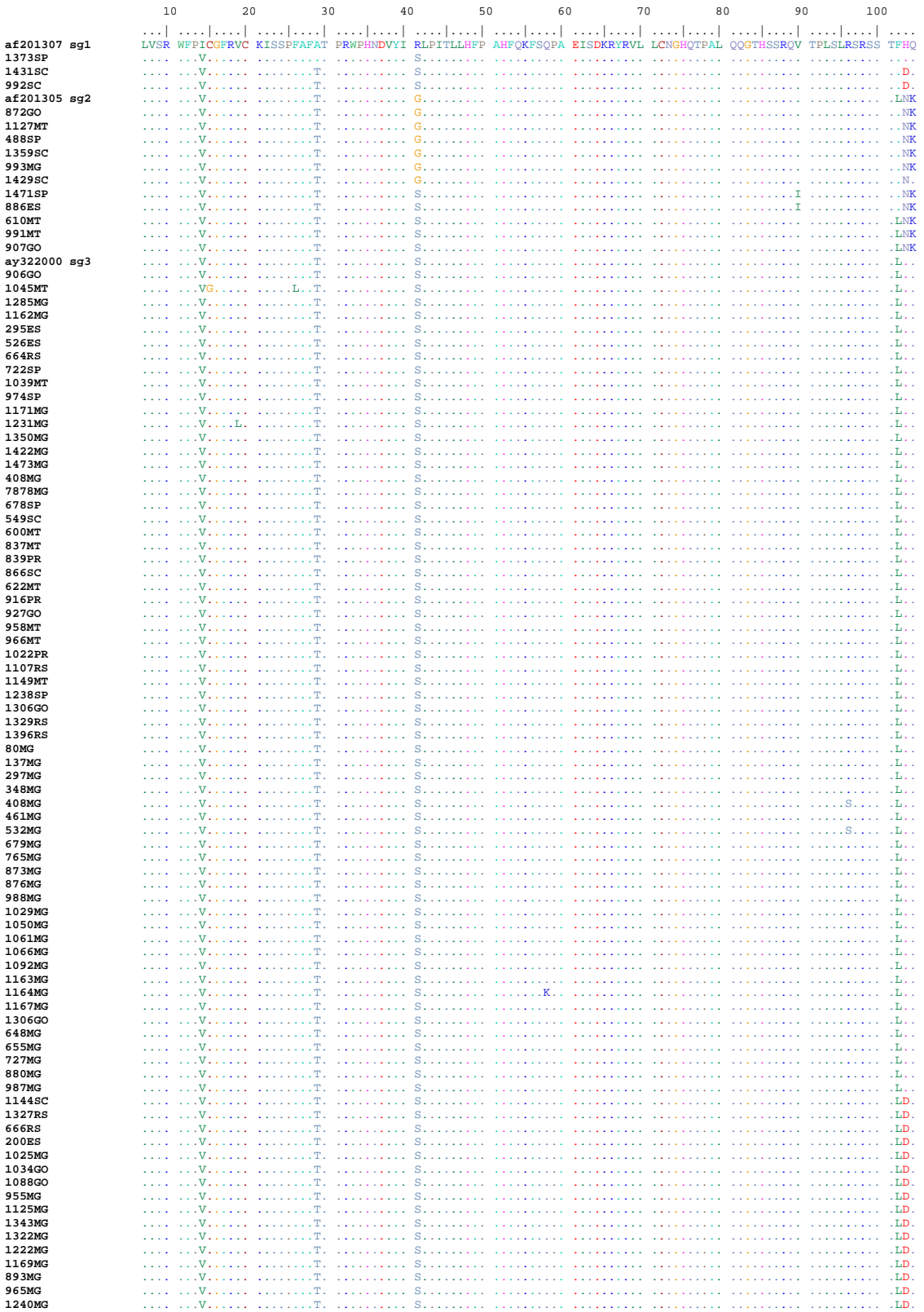


Figura 16 Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo gene ORF3 do CVS-2 nas 89 amostras do estudo. Pontos (.) indicam identidade de aminoácidos

As sequências de SG1, SG2 e SG3 apresentaram diferenças em resíduos de aminoácidos e em todos os casos a mudança foi não silenciosa resultando em modificação no aminoácido. O alinhamento múltiplo das sequências permitiu observar em SG1 100% de identidade entre as sequências do Estado de Santa Catarina, mesmo que a adoção do sistema de manejo de integração nas granjas deste estado normalmente facilite a circulação de amostras virais distintas entre os plantéis devido à múltipla origem dos animais confinados numa mesma propriedade.

A variação dos resíduos de aminoácidos nas posições 102-104 pode ser considerada específica para cada genogrupo da ORF3 do CVS-2; as sequências agrupadas no genogrupo SG1 apresentaram nas posições 102 a 104 de seus resíduos de aminoácidos FHQ (Fenilalanina / Histidina / Glutamina) e FDQ (Fenilalanina / Aspartato / Glutamina). As sequências classificadas no SG2 tinham nessas posições LNK (Leucina / Asparagina / Lisina), ou FNK (Fenilalanina / Asparagina

/ Lisina) ou FNQ (Fenilalanina / Asparagina / Glutamina), enquanto que as sequências do genogrupo SG3 apresentavam LHQ (Leucina / Histidina / Glutamina) ou LDQ (Leucina / Aspartato / Lisina). As variações detectadas nas posições 102 a 104 em cada grupo representam um marcador *fingerprint* que auxilia na classificação dos genogrupos e na identificação de variantes como sugerido recentemente por Cheung *et al.* (2007).

É possível que a variação observada no códon 41 afete a resposta imunológica do hospedeiro, uma vez que esse aminoácido está inserido na região imunodominante localizada entre os aminoácidos 31 a 50 da ORF3 responsável pela resposta de linfócitos T (Stevenson *et al.*, 2007). Apesar da mutação não silenciosa nesta região imunodominante, não houve troca de classe de aminoácidos, uma vez que resultou na troca de um resíduo de serina por glicina entre SG1 e SG2, mantendo a característica de polar neutro (**Tabela 8**).

Tabela 8 Diferenças dos aminoácidos (aa) da ORF3 do CVS-2 entre os três genogrupos SG1, SG2 e SG3 do CVS-2 em 89 das amostras dos animais clinicamente afetados

Genogrupos ORF3 CVS-2		Resíduo			
		41	102	103	104
SG1	Amino ácido - código de 1 letra	S	F	H	Q
	Características	Neutro	Neutro não polar	Polar básico	Neutro polar
SG2	Amino ácido - código de 1 letra	G	L	N	K
	Características	Neutro não polar	Neutro não polar	Neutro polar	Polar básico
SG3	Amino ácido - código de 1 letra	S	L	D/H	K
	Características	Neutro polar	Neutro não polar	Polar ácido/ Polar básico	Polar básico

7.9 Árvore Filogenética baseada na sequência da ORF3 do CVS-2

A análise da árvore filogenética de aminoácidos para a ORF3 (**Figura 17**) confirmou o alinhamento prévio que dividiu as 89 amostras em 3 genogrupos SG1, SG2 e SG3 e seus subtipos. A maior concentração

de amostras foi observada em SG3A e SG3B. A média de distância (d: estimada) dos aminoácidos dentro dos grupos SG1, SG2 e SG3 da ORF3 do CVS-2 foi respectivamente 0,024, 0,018, 0,006. A média de distância dos aminoácidos entre os subtipos foi analisada conforme o **Quadro 2**.

Quadro 2 Média de distância entre os subtipos dos genogrupos da ORF3 do CVS-2

	SG1	SG2A	SG2B	SG2C	SG2D	SG3B	SG3A
SG1							
SG2A	0,039						
SG2B	0.029	0.010					
SG2C	0.034	0.031	0.031				
SG2D	0.042	0.021	0.031	0.021			
SG3B	0.027	0.042	0.032	0.022	0.021		
SG3A	0.026	0.042	0.031	0.026	0.021	0.012	

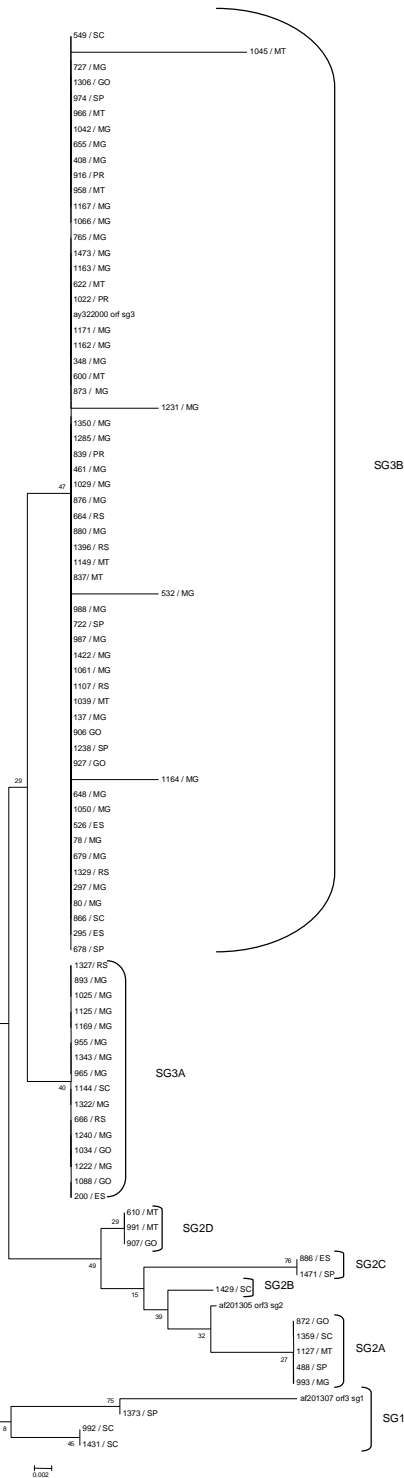


Figura 17 Árvore Filogenética baseada no método de *Neighbor-joining* (NJ) para sequência de aminoácidos da ORF3 do CVS-2 nas amostras analisadas. Os números dispostos ao longo dos ramos referem-se a porcentagem de confiança na análise NJ. Os genogrupos SG1, SG2 e SG3 estão destacados

A avaliação da árvore filogenética de aminoácidos para a ORF3 indicou que a distância média dos aminoácidos dos genogrupos SG1, SG2 e SG3 indicam uma maior proximidade filogenética entre os genogrupos SG1 e SG2 e os subtipos SG2A e SG2B; e SG3A e SG3B. A distância medida pelo tamanho dos ramos foi baixa indicando proximidade genética entre os indivíduos.

7.10 Classificação das lesões segundo os genogrupos da ORF3

O grau de severidade das lesões (Chianini *et al.*, 2003) de 44 amostras estudadas foi correlacionado com os genogrupos da ORF3 e seus subtipos (**Gráfico 5 e Anexo 1**).

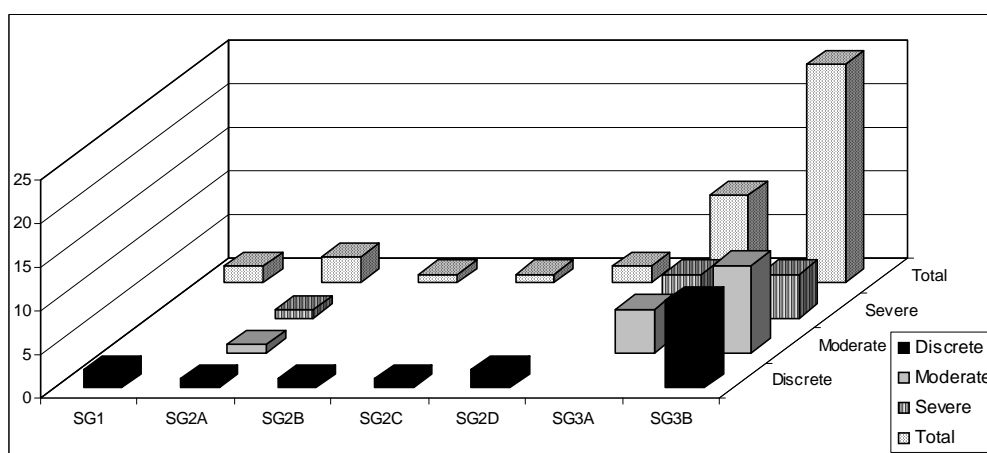


Gráfico 5 Distribuição das 44 amostras estudadas de acordo com a classificação das lesões microscópicas e dos genogrupos/subtipos da ORF3 do CVS-2

No subtipo SG3B observou-se que as lesões discretas e moderadas distribuíram-se equivalentemente enquanto que as severas apresentaram menor porcentagem. No subtipo SG3A foi observada a distribuição equivalente de lesões moderadas e severas sem a presença de amostras com lesões discretas. No genótipo SG2 apenas um subtipo apresentou lesões discretas, moderadas e severas, enquanto os demais apresentaram exclusivamente lesões discretas. Enquanto que no genótipo SG1 as lesões foram classificadas exclusivamente em discretas.

A maior concentração de amostras classificadas em moderadas e severas foi encontrada em SG3A e as discretas e moderadas em SG3B sugerindo variantes com diferença na virulência dentro do mesmo genótipo SG3 conforme afirmado por Cheung *et al.* (2007), sendo as amostras

de SG3A derivantes com maior patogenicidade que aquelas do subtipo SG3B. A presença predominante de lesões classificadas em discretas nos genótipos SG1 e SG2 confirma os resultados de Timmusk *et al.* (2008) que determinaram que a classificação dos genótipos pudesse ser baseada no histórico da presença da SACS na propriedade, e dessa forma o genótipo SG1 reuniria amostras provenientes de propriedades sem a doença, o SG2 de propriedades com surtos recentes e o SG3 com histórico da síndrome. Como as amostras do presente trabalho foram provenientes de animais com sinais clínicos compatíveis com a SACS era esperado que a maior distribuição fosse justamente no genótipo SG3 e que os demais apresentassem lesões discretas predominantemente. Entretanto é importante ressaltar que a tríade requerida para o diagnóstico da SACS não foi realizada nas

amostras estudadas, uma vez que o estudo foi realizado a partir de extratos de tecidos selecionados com base apenas nos sinais clínicos da síndrome.

7.11 Filogeografia dos genogrupos SG1, SG2 e SG3 da ORF3 do CVS-2 nas amostras

Através da filogeografia foi possível definir achados em relação à discriminação dos haplótipos, sua distribuição geográfica nos

Estados, dispersão dos genogrupos e sua predominância nas amostras estudadas (**Figura 18**) e, quais as possíveis características que amostras de mesma propriedade coletadas em datas diferentes poderiam apresentar dentro do contexto filogeográfico. No presente trabalho as sequências foram agrupadas em 14 haplótipos, onde as sequências de referência do GenBank para os genogrupos SG1, SG2, SG3 correspondiam respectivamente aos haplótipos H1, H6 e H11.

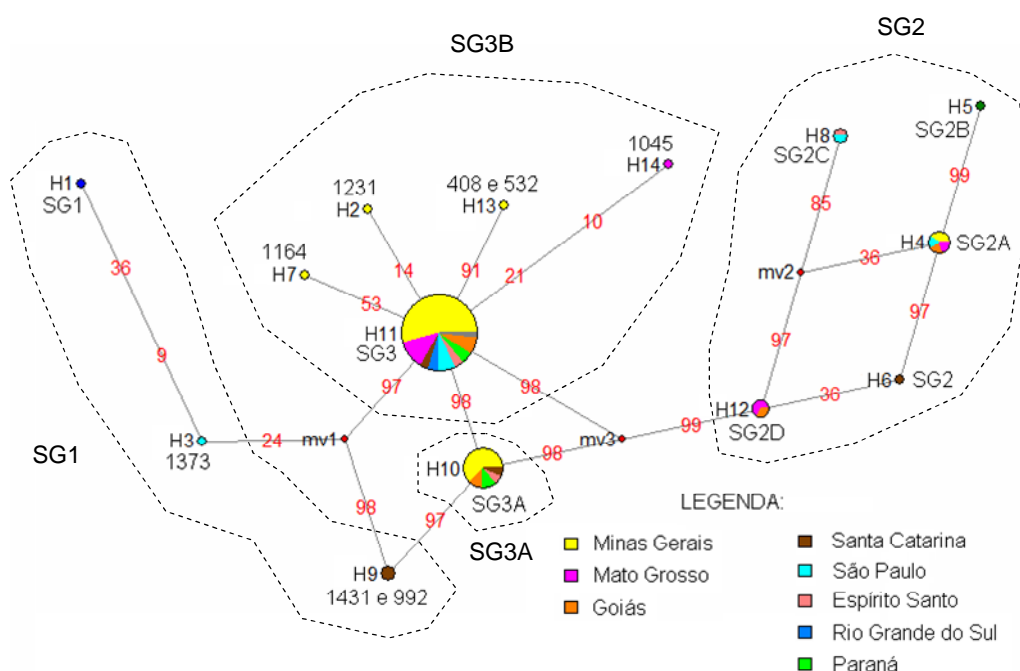


Figura 18 Representação gráfica da filogeografia dos 14 haplótipos que compõem o presente trabalho, divididos dentro dos genogrupos SG1, SG2, SG3. O tamanho das circunferências são relativamente proporcionais a frequência relativa dos haplótipos. Mv significa *median vector* e representam estágios que existiram (ou existem), mas não foram amostrados. Os números de substituições entre cada par de haplótipos são representados sobre a linha que os conecta. Os haplótipos foram discriminados conforme sua similaridade nos resíduos de aminoácidos (14-15-19-26-29-41-58-69-96-102-103-104) em H1 (1 sequência – ICVFARQVRFHQ); H2 (1 sequência – VCLFVSQVRLHQ); H3 (1 sequência – VCVFASQVRFHQ); H4 (5 sequências – VCVFTGQVRFNK); H5 (1 sequência – VCVFTGQVRFNQ ou sequência GenBank AF201307); H6 (1 sequência – VCVFTGQVRLNK ou sequência GenBank AF201305); H7 (1 sequência – VCVFTSKVRLHQ); H8 (2 sequências – VCVFTSQVRFNK); H9 (2 sequências – VCVFTSQVRFNQ); H10 (16 sequências – VCVFTSQVRLDQ); H11 (56 sequências – VCVFTSQVRLHQ sendo uma delas a sequência de referência do GenBank AY322000); H12 (3 sequências – VCVFTSQVRLNK); H13 (2 sequências – VCVFTSQVSLHQ); e H14 (1 sequência – VGVLTQSQVRLHQ).

O genogrupo SG1 foi observado em uma amostra coletada em Agosto de 2007 no Estado de São Paulo e em duas amostras coletadas em Novembro de 2007 no Estado de Santa Catarina, distribuídas nos haplótipos H3 e H9.

Os quatro subtipos de SG2 foram reunidos nos haplótipos H4, H5, H8, H12 respectivamente. Suas sequências estão distribuídas nos Estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina no período de Dezembro de 2006, Abril, Maio, Julho, Agosto, Setembro e Novembro de 2007.

O genogrupo SG3 subdividido em SG3A e SG3B demonstrou SG3B mais prevalente que SG3A, tendo sido observado em praticamente todos os meses nos nove Estados, enquanto SG3A foi encontrado nos meses de Maio, Julho, Agosto, Setembro e Outubro de 2007 nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O subtipo SG3A foi todo agrupado no haplótipo 10 enquanto que o SG3B envolveu os haplótipos H2, H7, H11, H13 e H14. O subtipo SG3A foi encontrado no mesmo período que o subtipo SG2D. O H11 agrupou 55 sequências representativas de todos os nove Estados tendo sido considerado o haplótipo derivador ou ancestral para o SG3 devido a sua ampla dispersão.

A singular ocorrência de SG1 em apenas três amostras dentre as 89 estudadas indica sua pequena prevalência entre os animais com sinais clínicos de SACS que relacionada com lesões discretas sugere um vírus de baixa patogenicidade. Entretanto é preciso observar que a pequena amostragem nos Estados de Santa Catarina e São Paulo pode ter influenciado este resultado.

A localização de SG2D na rede haplotípica associada a sua ocorrência em Estados de grande representatividade no comércio interestadual de suínos e sua manifestação

em lesões moderadas e severas é de relevância, pois pode representar risco de dispersão desta variante, possivelmente mais patogênica que aquelas do genogrupo SG1 ou demais subtipos de SG2.

A grande concentração de amostras no SG3B, sua ampla distribuição nos haplótipos e ocorrência de sequências coletadas numa mesma propriedade em datas distintas correlacionadas dentro deste genogrupo indicam que a variante do CVS-2 pertencente ao SG3B circulou nos anos de 2006 e 2007 com pequenas alterações na sequência da ORF3, insuficientes para alterarem seu genogrupo.

A presença dos diferentes genogrupos da ORF3 e seus subtipos nos nove Estados estudados, ao longo de todo o período de observação indicou a ampla circulação de variantes do CVS-2 numa mesma região e período. Opriessnig *et al.* (2008) mostraram que diferenças na virulência podem ser encontradas em variantes dentro de um mesmo grupo do CVS-2 possivelmente devido a mínimas alterações nos genomas. Hesse *et al.* (2008) demonstraram a possibilidade da presença de mais de um variante em um mesmo animal e Olvera *et al.* (2007) determinaram ser possível a formação de um vírus recombinante pela reunião de dois variantes, gerando um genoma único também infectivo.

Diante dos resultados alcançados com este trabalho é possível estabelecer que atualmente exista uma diversidade de variantes do CVS-2 circulando nos diferentes Estados brasileiros produtores de suínos. Seria interessante numa próxima etapa a realização de um novo levantamento em todos os Estados envolvidos nesse trabalho com um maior número de amostras e se possível um acompanhamento das mesmas propriedades ao longo de um período maior de anos a fim de determinar as variantes encontradas e sua distribuição espaço temporal.

7.12 Pressão de Seleção das sequências da ORF3 do CVS-2

O teste dos modelos para diferentes hipóteses sobre a distribuição dos valores estimados indicou seleção positiva na proteína ORF3 do CVS-2 nas posições 41, 102 e 103 com $p \geq 0,95\%$ (**Tabela 9**). Isto significa que $dN/dS \geq 1$ ou que as mutações não sinônimas ofereceram vantagens de adaptação evolutiva molecular à proteína através da modificação da sua função,

otimizando sua atividade, e aumentando a adaptabilidade dos indivíduos pela pressão de seleção positiva (Sharp, 1997; Akashi, 1999; Crandall *et al.*, 1999).

A análise estatística pelo teste de verossimilhança (**Tabela 10**) confirmou os resultados com a probabilidade do modelo de seleção positiva (M0 vs M3) significativamente maior que aquela do modelo agrupado (M1 vs M7) da hipótese nula.

Tabela 9 Parâmetros Estimados e Valores de Verossimilhança sob Modelos de Taxas Variáveis de ω entre sítios para a ORF3 do CVS-2

Modelos sítios específicos	p	l	Parâmetros estimados	Sítios de Seleção Positiva
M0: <i>one ratio</i>	1	-582,44	$\omega = 1.004$	Nenhum
M1: neutra (K= 2)	2	-581,02	$p_0 = 0.641, p_1 = 0.358$	Não permitido
M2: seleção.....	4	-570,39	$p_0 = 0.95376, p_1 = 0.000$ $p_2 = 0.04624, \omega_2 = 13.837$	41 R, 102 F, 103 H ($P > 0.95\%$)
M3: discreta.....	5	-571,69	$p_0 = 0.874, p_1 = 0.078$	41 R, 102 F, 103 H ($P > 0.95\%$)
M7: beta	2	-579,56	$p = 0.004, q = 0.006$	Não permitido
M8: beta & ω	4	-571,7	$p_0 = 0.953, p = 61.285, q = 99.000$ $(p_1 = 0.046), \omega = 13.595$	41 R, 102 F, 103 H ($P > 0.95\%$)

Note. ___p= número de parâmetros na distribuição ω ; dN/dS = média sobre os sítios. Sítios inferidos sobre seleção.

Tabela 10 Taxa Estatística de Verossimilhança entre os sítios sobre pressão seletiva da ORF3 do CVS-2

Comparação	ln	df	X ² %	
M0 (<i>one-ratio</i>) vs. M3 (discreta)	21,5	4	13.28	$p < 0.000252^{**}$
M1 (neutra) vs. M2 (seleção)	21,26	2	5.99	$p < 0.000024^{***}$
M7 (beta) vs. M8 (beta & ω)	15,72	2	5.99	$p < 0.000386^*$

* 95% Intervalo de nível de significância

A presença da seleção positiva no gene funcional ORF3 do CVS-2 é um achado interessante por indicar que há posições na proteína codificada em que as alterações não sinônimas (dos aminoácidos) têm fornecido

mecanismos moleculares de seleção evolutiva. Isso indica ainda que o vírus possa estar utilizando deste artifício no gene ORF3 para melhorar sua adaptação ao hospedeiro, ou facilitar sua adaptação a

novos hospedeiros ou ainda para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Estas informações serão válidas para melhorar o conhecimento da estrutura da ORF3 do CVS-2 através da localização dos resíduos sob pressão seletiva na estrutura secundária que fornecerão o ponto inicial na determinação da estrutura terciária e de como estes resíduos se encontram em

posições expostos às forças seletivas externas. Adicionalmente, poderão ser testadas hipóteses correlacionando as alterações observadas na árvore filogenética com os codons positivamente selecionados e mudanças no fenótipo ou na adaptação do vírus.

8 CONCLUSÕES

1. A maioria dos extratos de tecidos analisados apresentaram coinfeção do CVS-2 com agentes bacterianos associados ao complexo das doenças respiratórias dos suínos.
2. A presença de mais um agente bacteriano do complexo de doenças respiratórias associado ao CVS-2 em suínos com sinais clínicos de pneumonia é freqüente em plantéis brasileiros.
3. Suínos com sinais clínicos da SACS apresentam lesões principalmente concentradas em órgãos linfóides, fígado, rins e pulmões, as quais são evidenciadas e agravadas na presença de bactérias associadas.
4. Não há correlação entre o título infeccioso de CVS-2, o grau de severidade das lesões microscópicas e a presença ou ausência de coinfeção bacteriana.
5. Nos extratos de tecidos estudados foi possível detectar apenas o CVS-2 do grupo 1 e subgrupo A e B, tendo sido o subgrupo A preponderante entre as amostras.
6. Há diferentes variantes do CVS-2 circulando entre os plantéis brasileiros.
7. Os três genogrupos (SG1, SG2, SG3) da ORF3 do CVS-2 estão presentes nos estados brasileiros produtores de suínos e possuem alta identidade na sequência de resíduos de aminoácidos. O genogrupo SG3 é o de maior representatividade e reúne sequências de todos os nove Estados.
8. No Brasil podem ser observados subdivisões nos genogrupos da ORF3 com amostras agrupadas nos subgrupos SG2:A, B, C, D e SG3:A e B de acordo com a identidade de sua sequência de resíduos de aminoácidos.
9. As alterações nas posições 102-104 da sequência de aminoácidos da ORF3 é um marcador *fingerprint* para cada genogrupo da ORF3 do CVS-2.
10. O genogrupo SG3 apresenta variantes com distinta virulência nas amostras brasileiras.
11. Há seleção positiva na proteína ORF3 do CVS-2 nas posições 41, 102 e 103 com $p \geq 0,95\%$ das amostras brasileiras.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na economia brasileira o agronegócio é um dos mais importantes setores tanto no mercado interno quanto externo e a agroindústria de suínos movimenta todo um mercado de produção, insumos, serviços e saúde do rebanho, gerando bilhões de reais. Neste contexto o Circovírus Suíno do tipo 2 (CVS-2) atualmente endêmico no plantel e com reconhecida capacidade de induzir ou exacerbar a imunossupressão nos animais é um problema real mesmo que não seja uma zoonose. Associado a coinfeções virais e bacterianas pode alcançar perdas de 10% da renda no setor.

Diante deste quadro torna-se imperativo conhecer a epidemiologia molecular do vírus, seus grupos e subgrupos circulantes, sua distribuição geográfica e dispersão na tentativa de associar o estado de saúde com a carga viral no soro e nos tecidos e a evolução da doença.

A determinação do grupo 1 e seus subgrupos A e B como presentes nos criatórios é um fato que permite determinar a provável origem do vírus no Brasil. Entretanto a associação desta informação com a determinação e discriminação dos diferentes genogrupos do gene funcional ORF3 do CVS-2 adquire maior significado. Mais intrigante ainda quando as amostras

pareadas (mesma propriedade e diferente data de coleta) apresentam diferentes genogrupos de ORF3 e consequentemente subgrupos do CVS-2 indicam a existência de diversos variantes em circulação.

Quando o estudo da pressão seletiva indica que o gene ORF3 apresenta três posições sob pressão positiva dentre as amostras estudadas é possível inferir sua importância na adaptação do CVS-2 no hospedeiro e na continuidade dos estudos filogenéticos a fim de procurar estabelecer sua relação com a evolução da doença nos plantéis. A relação do gene ORF3 com a patogenicidade do CVS-2 tem sido cada vez mais comprovada assim como a sugestão de seu uso como marcador da evolução da doença.

Um próximo passo seria o estudo, em camundongos, dos variantes do CVS-2 encontrados tanto para a proteína do capsídeo quanto para a proteína ORF3. Dessa forma seria possível observar se algum deles foi mais eficiente na indução de uma melhor resposta humoral, imunomodulação e indução de linfócitos T. Com essas informações poder-se-ia clonar esses genes para uso no desenho de vacinas híbridas (ORF2 e ORF3) para serem testadas inicialmente em camundongos infectados com as variantes predominantes encontradas para apenas posteriormente, havendo sucesso, serem testadas em suínos a campo.

Agradecimentos:

Grazielle Cossenno Florentino Galinari – Funcionária do Laboratório de Doenças a Vírus da Escola de Veterinária da UFMG

Sheila Oliveira de Souza – Funcionária do LABMAS da Faculdade de Veterinária e Zootécnica da Universidade de São Paulo

10 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AKASHI, H. Within- and between-species DNA sequence variation and the “footprint” of natural selection. *Gene*, v.238, p.39–51, 1999.

ALLAN, G.M.; MEEHAN, B.; TODD, D., *et al.* Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Veterinary Record*, v. 142, p. 467-468, 1998a.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F., *et al.* Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*, v. 121, p.1-11, 1999.

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

ALBINA, E.; TRUONG, C.; HUTET, E., *et al.* An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *Journal of Comparative Pathology*, v.125, n.4, p.292-303, 2001.

AMEISEN, J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation*, v. 9, n.4, p.367-393, 2002.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M., *et al.* Intraespecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J.C. Phylogeography. *In: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. (447 pp), 2000.

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

BANEMANN, A.; GROSS, R. Phase variation affects long-term survival of *Bordetella bronchiseptica* in professional phagocytes. *Infection and Immunity*, v.65, p.3469-3473, 1997.

BARCELLOS, D.E.S.N.; OLIVEIRA, S.J.; BOROWSKI, S.M.M. Infecção de suínos por *Streptococcus suis* tipo II em Santa Catarina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.6, p.128-129, 1984.

BARCELLOS, D.E.S.N.; BOROWSKI, S.M.; OLIVEIRA, S.J. Swine infection with *Streptococcus suis* type II in State of Rio Grande do Sul: Determination of carrier rate by bacteriological examination of tonsils of slaughter pigs. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande Sul*, v.23, p.101-106, 1995.

BIBERSTEIN, E.L.; WHITE, D.C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *Journal of Medical Microbiology*, v. 2, p. 75–77, 1969.

BOGDAN, J.; WEST, K.; CLARK, E., *et al.* Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995 – 1998. *Canadian Veterinary Journal*, v. 42, p. 548-550, 2001.

BOROWSKI, S.M.; IKUTA, N.; LUNGE, V., *et al.* Caracterização antigênica e fenotípica de cepas de *Pasteurella multocida* isoladas de pulmões de suínos com pneumonia e/ou pleurite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.22, n.3, 2002.

BOROWSKI, S.M. Pasteurelose pulmonar em suínos: uma infecção de difícil controle. *In: I Simpósio Universidade Federal do Rio*

Grande do Sul sobre Manejo, Reprodução e Sanidade Suína, Porto Alegre, 2006.

BOROWSKI, S.; BARCELLOS, D.; MORÉS, N. Pasteurelose pulmonar. *In: Doenças dos Suínos*. Sobestiansky, J., Barcellos, D. (Eds.). – Goiânia: Cãnone Editorial, p.177-181, 2007.

BOSCO, S.M.G.; PEZERICO, S.B.; CABRAL, K.G., *et al.* *Streptococcus suis* Tipo II em suínos e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.67, n.2, p.157-160, 2000.

BOSSÉ, J.T.; JANSON, H.; SHEEHAN, B.J., *et al.* Actinobacillus pleuropneumoniae: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 225-235, 2002.

BRIDDON, R.W.; WATTS, J.; MARKHAM, P.G., *et al.* The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology*, v.172, n. 2, p.628-633, 1989.

BROCKMEIER, S.L.; REGISTER, K.B. Effect of temperature modulation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*, v. 73, p. 1–12, 2000.

BROCKMEIER, S.L.; PALMER, M.V.; BOLIN, S.R., *et al.* Effects of intranasal inoculation with *Bordetella bronchiseptica*, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, or a combination of both organisms on subsequent infection with *Pasteurella multocida* in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 521–525, 2001.

BROCKMEIER, S.L.; HALBUR, P.G.; THACKER, E.L. Porcine Respiratory Disease Complex. *In: Brogden, K.A. and*

Guthmiller, J.M. (Eds), *Polymicrobial Diseases*, American Society for Microbiology (ASM) Press, Herndon, Virginia (USA) pp. 1-21, 2002a.

BROCKMEIER, S.L.; REGISTER, K.B.; MAGYAR, T., *et al.* Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 481–490, 2002b.

BROCKMEIER, S.L. Prior infection with *Bordetella bronchiseptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine. *Veterinary Microbiology*, v. 99, p. 75–78, 2004.

BROCKMEIER, S.L.; REGISTER, K.B. Expression of the dermonecrotic toxin by *Bordetella bronchiseptica* is not necessary for predisposing to infection with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* v.125, p. 284–289, 2007.

BRUNBORG, I.M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C.M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, v.122, p.171–178, 2004.

BUSH, R.M. Predicting adaptative evolution. *Nature Reviews, Genetics*, v.2, p.387-392, 2001.

CASALMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; QUINTANA, J., *et al.* Detection of Porcine Circovirus Types 1 and 2 in Serum and Tissue Samples of Pigs with and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1848-1850, 2002.

CARMAN, S.; McEWEN, B.; DELAY, J., *et al.* Porcine circovirus-2 associated

disease in swine in Ontario (2004-2005). *The Canadian Veterinary Journal*, v. 47, n. 8, p. 761-2, 2006.

CARMAN, S.; CAI, H.Y.; DELAY, J., *et al.* The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease – 2004-2006. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.72, p.259-268, 2008.

CASTRO, A.M.M.G. Caracterização genética de amostras brasileiras de Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), São Paulo. 2005. 120f. Tese (Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; *et al.* Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Archives of Virology*, v.152, n.8, p.1435-1445, 2007.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B., *et al.* Molecular diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Research in Veterinary Science*, v.85, n.1, p.197-200, 2008.

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

CHANTER, N.; MAGYAR, T.; RUTTER, J.M. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Research in Veterinary Science*, v. 47, p. 48–53, 1989.

CHEUNG, A.K.; LAGER, K.M.; KOHUTYUK, O.I., *et al.* Detection of two

porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives of Virology*, n. 152, p.1035-1044, 2007.

CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J., *et al.* Immunohistochemical characterization of PCV2 associate lesions in lymphoid and non lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 94, p. 63-75, 2003.

CHIARELLI-NETO, O.; YOTOKO, K.S.C.; VIDIGAL, P.M.P., *et al.* Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Research*, v.140, n.1-2, p.57-63, 2008.

CHOI, C.; STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M., *et al.* Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.66, p. 217-224, 2002.

CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *Biotechniques*, v. 15, p. 532-537, 1993.

CHRISTENSEN, G.; SØRENSEN, V.; MOUSING, J. Diseases of the respiratory system. *In: Diseases of Swine*. 8th ed. Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.S., D’Allaire, S., Taylor, D. J. (Eds.), Ames, Iowa State University Press. pp 913-940, 1999.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORES, N. Síndrome Multissistêmica do deﬁnamento do leitão desmamado (SMDLD) causada

por circovirus suíno. *In: Congreso Mercosur de Producción Porcina*, Buenos Aires, 2000.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; TROMBETTA, C.; VARGAS, I., *et al.* Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. *Ciência Rural*, v.34, n.2, p.449-455, 2004.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; PINTO, L.S., *et al.* Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. *Research in Veterinary Science*, Jan, 2009 (in press).

CLARK, E.G. Pathology of the post-weaning multisystemic wasting syndrome of pigs *Proceedings of the Western Canadian Association on Swine Practitioners*, p. 22-25, 1996.

CLARK, E.G. Post-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, v.28, p.499-401, 1997.

CRANDALL, K.A.; KELSEY, C.R.; IMAMICHI, H., *et al.* Parallel evolution of drug resistance in HIV: failure of nonsynonymous/synonymous substitution rate ratio to detect selection. *Molecular Biology and Evolution*, v.16, p.372-382, 1999.

DARWICH, L.; BALASCH, M.; PLANADURÁN, J., *et al.* Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *Journal of General Virology*, v.84, n.12, p.3453-3457, 2003.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine

circovirus type 2: an immune riddle. *Archives of Virology*, v. 149, n. 5, p. 857-874, 2004.

DAVIES, R.L.; MACCORQUODALE, R.; BAILLIE, S., *et al.* Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 59-67, 2003.

DE ALWIS, M.C.L. Pasteurellosis in Production Animals: A Review. *In: Pasteurellosis in Production Animals*, ACIAR Proceedings n. 43. Patten, B.E., Spencer, T.L., Johnson, R.B., Hoffman, D.; Lehane, L. (Eds.). ACIAR, Bali, Indonésia, pp. 11-18, 1992.

DE BOISSÉSON, C.; BÉVEN, V.; BIGARRÉ, L., *et al.* Molecular characterization of porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome affected and non affected pigs. *Journal of General Virology*, v.85, p.293-304, 2004.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene*, v.25, n.51, p.6868-6886, 2006.

DELAY, J.; McEWEN, B.; CARMAN, S., *et al.* Porcine circovirus type 2 associated disease is increasing. *Animal Health Laboratory Newsletter*, v.9, p.22, 2005.

DONG-JUN, A.; IN-SOON, R.; DAE-SUB, S., *et al.* Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Research*, v. 129, p.115-122, 2007.

DROLE R.; LAROCHELLE, R.; MORIN, R., *et al.* Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine

influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Veterinary Pathology*, v. 40, p. 143-148, 2003.

DUGAL, F.; BELANGER, M.; JACQUES, M. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 56, p. 260-264, 1992.

DUPONT, K.; NIELSEN, E.O.; BAEKBO, P., *et al.* Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, v. 128, p. 56-64, 2008.

EAMENS, G.J.; KIRKLAND, P.D.; TURNER, M.J., *et al.* Identification of toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs by in vitro characterisation. *The Australian Veterinary Journal*, v. 65, p. 120-123, 1988.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E., *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Veterinary Journal*, v.39, p. 44-51, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C., *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, n. 8, p. 175-185, 1998.

FARINHA, F.B.N.; BERSANO, F.J.; RODRIGUES, F.M., *et al.* Meningite em suínos causada por *Streptococcus suis* tipo R. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.48, p.91-95, 1981.

FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; GILL, M., *et al.* Genetic characterization of type 2

porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 2494-2503, 2000.

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G., *et al.* Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *Journal of Virology*, v.78, n.24, p. 13440-13446, 2004.

FINSTERBUSCH, T.; STEINFELDT, T.; CALISKAN, R., *et al.* Analysis of the subcellular localization of the proteins Rep, Rep' and Cap of porcine circovirus type 1. *Virology*, v.343, n.1, p.36-46, 2005.

FLORES, E.F. *Virologia Veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 888 p., 2007.

FORT, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M., *et al.* Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary Microbiology*, p. 1-12, 2007.

FUSSING, V.; NIELSEN, J.P.; BISGAARD, M., *et al.* Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin producing *Pasteurella multocida ssp. multocida* in Denmark. *Veterinary Microbiology*, v. 65, p. 61-74, 1999.

GAGNON, C.A.; TREMBLAY, D.; TIJSSEN, P., *et al.* The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 48, p. 811-819, 2007.

- GILPIN, D.F.; McCULLOUGH, K.; MEEHAN, B.M., *et al.* In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.94, p.149–161, 2003.
- GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J., *et al.* Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, p. 1-13, 2009.
- GOLDMAN, N.; YANG, Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, v.11, p.725–736, 1994.
- GOODNOW, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews*, v. 44, p.722–738, 1980.
- GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M., *et al.* A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, v. 128, p. 23-35, 2008.
- GRIERSON, S.S.; KING, D.P.; SANDVIK, T., *et al.* Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Archives of virology*, v.149, n.6, p. 1171-1183, 2004a.
- GRIERSON, S.S.; KING, D.P.; WELLENBERG, G.J., *et al.* Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Research Veterinary Science*, v.77, n.3, p.265-268, 2004b.
- GUSTIN, P.; URBAIN, B.; PROUVOST, J.F., *et al.* Effects of atmospheric ammonia on pulmonary hemodynamics and vascular permeability in pigs: interaction with endotoxins. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.125, p.17–26, 1994.
- HAESEBROUCK, F.; CHIERS, K.; VAN OVERBEKE, I., *et al.* *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology*, v. 58, p. 239-249, 1997.
- HALBUR, P.G.; PAUL, P.S.; ANDREWS, J.J., *et al.* Experimental transmission of an apparent viral pneumonia in conventional and gnotobiotic pigs. *The Veterinary Record*, v.13, n.132, p.263-261, 1993.
- HALBUR, P.G.; ROTHSCCHILD, M.F.; THACKER, B.J., *et al.* Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v.115, p.181–189, 1998.
- HALLOY, D.J.; KIRSCHVINK, N.A.; MAINIL, J., *et al.* Synergistic action of *E. coli* endotoxin and *Pasteurella multocida* type A for the induction of bronchopneumonia in pigs. *The Veterinary Journal*, v.169, p. 417–426, 2005.
- HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P.S. Nucleotide sequence of Porcine Circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology*, v. 72, n. 6, p. 5262-5267, 1998.
- HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; SACHVIE, C., *et al.* PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *The Canadian Journal of Veterinarian Research*, v. 64, p. 44-52, 2000.
- HARMS, P.A. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *Journal*

of *Swine Health and Production*, v. 10, p. 27-30, 2002.

HARVEY, P.H.; PAGEL, M.D. The Comparative Method in Evolutionary Biology. In: Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford (pp.239), 1991.

HERES, T.S. Caracterização de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas de lesões pneumônicas associadas ou não com circovirose em suínos, Rio Grande do Sul. 2009. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HESSE, R.; KERRIGAN, M.; ROWLAND, R.R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Research*, v. 132, n.1-2, p.201-207, 2008.

HEWLETT, E.L.; DONATO, G.M.; GRAY, M.C. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Molecular Microbiology*, v.59, p.447-459, 2006.

HIGGINS, R.; GOTTSCHALK, M. An update on *Streptococcus suis* identification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.2, p.249-252, 1990.

HISCOTT, J. Introduction-cytokine receptors, signaling pathways and viruses. *Cytokine Growth Factor Review*, v.12, n.2-3, p.129-31, 2001.

HOEFLING, D.C. The various forms of *Haemophilus parasuis*. *Swine Health and Production*, v. 2, n. 1, p. 19, 1994.

HORLEN, K.P.; SCHNEIDER, P.; ANDERSON, J., *et al.* A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: clinical features and association with the PCV2b genotype.

Journal of Swine Health and Production, v.15, p.270-278, 2007.

JACQUES, M. Adherence of *Pasteurella multocida* to porcine upper respiratory tract cells. *Current Microbiology*, v.15, p.115-119, 1987.

KAMP, E.M.; KIMMAN, T.G. Induction of nasal turbinate atrophy in germ-free pigs, using *Pasteurella multocida* as well as bacterium-free crude and purified dermonecrotic toxin of *P. multocida*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 49, p. 1844-1849, 1988.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Review Microbiology*, v.2, p.123-140, 2004.

KARUPPANNAN, A.K.; JONG, M.H.; LEE, S.H.; *et al.* Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, 2008.

KHELEF, N.; ZYCHLINSKY, A.; GUIISO, N. *Bordetella pertussis* apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 4064-4071, 1993.

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

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

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Veterinary Record*, v.155, n.16, p.489-492, 2004.

- KIUPPEL, M.; STEVERSON, G.M.; MITTAL, S.K., *et al.* Circovirus-like viral associated tissues in weaned pigs in Indiana. *Veterinary Pathology*, v. 35, p. 303-307, 1998.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; McNEILLY, F. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Veterinary Pathology*, v.38, n.1, p.31-42, 2001.
- KRISTENSEN, C.S.; BILLE-HANSEN, V.; VIGRE, H., *et al.* Transmission of PMWS between pen mates. In: 19th International Pig Veterinary Society Congress Proceedings, 2006, Copenhagen, *Anais ...* Copenhagen: International Pig Veterinary Society, 2006, p.162.
- LADEKJAER-MIKKELSEN, A-S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T., *et al.* Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, v.89, p.97-114, 2002.
- LARIVIERE, S.; LEBLANC, L.; MITTAL, K.R., *et al.* Characterization of *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1398-1401, 1992.
- LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M., *et al.* Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, v. 80, p. 69-75, 1999.
- LAROCHELE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P., *et al.* PCR detection and evidence of shedding of Porcine circovirus type 2 in boar semen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 4629-4632, 2000.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Research*, v. 90, p. 101-112, 2002.
- LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, v. 79, n. 13, p. 8262-8274, 2005.
- LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q., *et al.* The ORF3 Protein of Porcine Circovirus Type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *Journal of Virology*, v. 80, p. 5065-5073, 2006.
- LIU, J.; ZHU, Y.; CHEN, I., *et al.* The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *Journal of Virology*, v.81, n.17, 2007.
- LOHSE, L.; BØTNER, A.; HANSEN, A-S. L., *et al.* Examination for a viral co-factor in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, v.129, p.97-107, 2008.
- MACINNES, J.I.; DESROSIERS, R. Agents of the "Suis-ide Diseases" of swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, Suppl., 63, p. 83-89, 1999.
- MADEC, F.; BRIDOUX, N.; BOUNAIX, S., *et al.* Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Veterinary Microbiology*, v.72, n.3-4, p.295-310, 2000.

- MAHÉ, D.; BLANCHARD, P.; TRUONG, C., *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal General Virology*, v. 81, p.1815-1824, 2000.
- MANKERTZ, A.; DOMINGO, M.; FOLCH, J.M., *et al.* Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Research*, v.66, p.65-77, 2000.
- MAURENBRECHER, H.; LAMY, M.; DEBY-DUPONT, G. An animal model of response and nonresponse to inhaled nitric oxide in endotoxin-induced lung injury. *Chest*, v.120, p.573-581, 2001.
- McINTOSH, K.A.; HARDING, J.C.; ELLIS, J.A., *et al.* Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.70, n.1, p.58-61, 2006.
- McINTOSH, K.A.; HARDING, J.C.; PARKER, S., *et al.* Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2 in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd. *The Canadian Veterinary Journal*, v.49, p.1189-1194, 2008.
- McINTOSH, K.A.; TUMBER, A.; HARDING, J.C.S., *et al.* Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Veterinary Microbiology*, v.133, p.23-33, 2009.
- MEEHAN, B.M.; CREELAN, J.L.; McNULTY, M.S., *et al.* Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *Journal of General Virology*, v. 78, p. 221-227, 1997.
- MEEHAN, B.M.; McNEILLY, F.; McNAIR, I., *et al.* Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology*, v.146, n.4, p. 835-842, 2001.
- MENIN, A.; GAVA, D.; VAZ, E.K. Aspectos gerais sobre a infecção por *Haemophilus parasuis* em suínos – Revisão. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.4, n.2, p. 148-156, 2005.
- MIYATA, T.; YASUNAGA, T. Molecular evolution of mRNA: a method for estimating evolutionary rates of synonymous and amino acid substitutions from homologous nucleotide sequences and its application. *Journal of Molecular Evolution*, v.16, n. 1, p.23-36, 1980.
- MINDELL, D.P.; SORENSON, M.D.; HUDDLESTON, C.J., *et al.* Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. In: Avian molecular evolution and systematics. Mindell, D.P. (Ed.), Academic Press, San Diego, pp. 213-247, 1997.
- NICOLET, J. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Diseases of Swine, 7th Edition, Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), London: Wolfe Publishing Ltd., pp. 401-408, 1993.
- O'GRADY, N.P.; PREAS, H.L.; PUGIN, J., *et al.* Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in humans. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 163, p. 1591-1598, 2001.
- OHLINGER, V.F.; SCHMIDT, U.; PESCH, S. Studies on pathogenetic aspects of the post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: Proceeding of the

16th International Pig Veterinary Society Congress, 2000, Melburn, Anais ... Melburn, 2000, p. 577.

OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *The British Veterinary Journal*, v. 151, p. 489-522, 1995.

OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M., *et al.* Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods*, v.117, p. 75–80, 2004.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*, n. 357, p. 175-185, 2007.

OPRIESSNIG, T.; MCKEOWN, N.E.; ZHOU, E.M., *et al.* Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*, v.87, n.10, p.2923-2932, 2006.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X-J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, p.591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; RAMAMOORTHY, D.; MADSON, D.M., *et al.* Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *Journal of General Virology*, v.89, p. 2482-2491, 2008.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAUQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology*, v.265, n.2, p.218-25, 1999.

PALLARES, F.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T., *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, p.515-519, 2002.

PIJOAN, C.; TRIGO, F. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.54, p.16-21, 1990.

PIJOAN, C. Pneumonic Pasteurellosis. *In: Diseases of swine*. 9th ed. STRAW, B.E., *et al.* (Eds.). Ames, IA: Iowa State University Press, p.719-726, 2006.

POGRANICHNIY, R.M.; YOON, K.J.; HARMS, P.A., *et al.* Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.14, n.6, p.449-56, 2002.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C., *et al.* Diagnostic profile of a conventional pig farm with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Record*, v.149, p.357-361, 2001.

RAMAMOORTHY, S.; MENG X-J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Animal Health Research Reviews*, p.1-20, 2008.

REAMS, R.Y.; GLICKMAN, L.T.; HARRINGTON, D.D., *et al.* *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases, part II. Clinical signs,

- lesions, and associated microorganisms. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, p.326-334, 1994.
- REAMS, R.Y.; HARRINGTON, D.D.; GLICKMAN, L.T., *et al.* Fibrinohemorrhagic pneumonia in pigs naturally infected with *Streptococcus suis*. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, p. 406-408, 1995.
- REAMS R.Y.; HARRINGTON D.D.; GLICKMAN L.T., *et al.* Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.8, p.119-121, 1996.
- REIS, R.; NASCIMENTO, E.F.; COELHO, A.M.B., *et al.* Meningoencefalite estreptocócica em leitões desmamados. *Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v.32, p.375-381, 1980.
- REIS, R.; LEMOS, J.M.; CAVALCANTE, J.E. Estudo das lesões pulmonares de suínos de abate. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.44, p.407-418, 1992.
- RISTOW, L.E.; PEREZ JR., A.A.; REIS, M.A. *et al.* Prevalência de bactérias isoladas em suínos apresentando a síndrome da Circovirose no Brasil. *In: XIII Congresso da ABRAVES*, 2007, Florianópolis, 2007.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANADURAN, J., *et al.* Pathological immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of Postweaning multisystemic wasting Syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, v.120, p.59-78, 1999.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.A., *et al.* Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Records*, v.146, p.40-43, 2000a.
- ROVIRA, A.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J., *et al.* Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *The Journal of Virology*, v.76, n.7, p.3232-3239, 2002.
- RYCROFT, A.; GARSIDE, L.H. *Actinobacillus* species and their role in animal disease. *The Veterinary Journal*, v.159, p.18-36, 2000.
- SAKANO, T.; OKADA, M.; TANEDA, A., *et al.* Experimental atrophic rhinitis in 2 and 4 month old pigs infected sequentially with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, v.31, p.197-206, 1992.
- SEGALÉS, J.; PASTOR, J.; CUENCA, R., *et al.* Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Veterinary Record*, v.146, p. 675-676, 2000.
- SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.137-149, 2004a.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F., *et al.* Immunossuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Veterinary Microbiology*, v.98, p.151-158, 2004b.
- SEGALÉS, J.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H., *et al.* PCV-2 genotype definition and nomenclature. *The Veterinary Record*, v.28, p.867-868, 2008.
- SHARP, P.M. In search of molecular Darwinism. *Nature*, v.385, p.111-112, 1997.

- SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J., *et al.* Detection and porcine circovirus type 2 genome in nasal swabs and serum samples from naturally infected pigs using polymerase chain reaction. *In: Proceedings of the European Society Virology, PMWS*, p. 96, 2001.
- SILVA, A.F.; PAGANINI, F.J.; ACOSTA, J.C., *et al.* Programa de gerenciamento de doenças respiratórias em suínos. I – Estudo do perfil das doenças respiratórias nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. *In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos - ABRAVES, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil Anais.... CD Room*, 2001.
- SILVA, A.F.; PAGANINI, F.J.; ACOSTA, J.C., *et al.* Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brazil. *In: Congress of the International Pig Veterinary Society, Ames, Iowa, USA Proceedings. Ames, Iowa, USA: International Pig Veterinary Society Congress (IPVS)*, v. 2, p. 332, 2002.
- SOBESTIANSKY, J.; DALLA COSTA; O.A.; MORÉS, N. *et al.* Estudo ecopatológico das doenças respiratórias: prevalência de rinite atrófica e pneumonia nas fases de crescimento e terminação na região Sul do Brasil. *In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Belo Horizonte - ABRAVES, MG, Brasil. Anais. CD Room*, 1999.
- SORDEN, S.D.; HARMS, P.A.; NAWAGITGUL, P., *et al.* Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 528-530, 1999.
- SORDEN, S.D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting síndrome. *Journal of Swine Health and Production*, v.8, p.133-136, 2000.
- STAATS J.J.; FEDER I.; OKWUMABUA, O., *et al.* *Streptococcus suis* past and present. *Veterinary Research Communications*; v.21, p. 381-407, 1997.
- STEPAN, A.L. Tipificação e sensibilidade de amostras de Pasteurella multocida isoladas a partir de lesões de pleurite em suínos terminados, Rio Grande do Sul. 1995. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- STEVENSON, L.S.; GILPIN, D.F.; DOUGLAS, A.; *et al.* T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2. *Viral Immunology*, v.20, n.3, 2007.
- STEVERINK, P. Type 2 circovirus – critical literature review and assessemant of research that has brought us to the association of ype II circovirus with PMWS. *In: PRRS & type 2 Circovirus: advances in diagnostics, research, and pathogenesis*, 2002, Kansas, 33rd Annual meeting American Association of Swine Veterinarians, Missouri: American Association of Swine Veterinarian, p. 5-11, 2002.
- TAYLOR, J.D. The lungs. *In: Pathology of the pig. A Diagnostic Guide. Sims, L.D., Glastonbury, J.R.W. (Eds.). ACT: Barton: The Pig Research and Development Corporation, Bendigo Mail Centre, Victoria, Australia*, p. 219-238, 1996.
- THACKER, E.L. Porcine respiratory disease complex – what is it and why does it remain a problem? *Pig Journal*, v. 48, p. 66-70, 2001.
- THACKER, E.L.; THANAWONGNUWECH, R. Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC).

Thai Journal of Veterinary Medicine, v.32 supplement, p.125-134, 2002.

TIMMUSK, S. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein. *Journal of General Virology*, v.87, p.3215-3223, 2006.

TIMMUSK, S.; WALLGREN, P.; BRUNBORG, I.M., *et al.* Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes*, v.36, p.509-520, 2008.

TRUONG, C. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Archives of Virology*, v.146, p.1197-1211, 2001.

URBAIN, B.; GUSTIN, P.; ANSAY, M. Endotoxin-induced microvascular injury in isolated and perfused pig lungs. *Veterinary Research Communications*, v.16, p.453-464, 1992.

VAHLE, J.L.; HAYNES, J.S.; ANDREWS, J.J. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriologic, and morphologic findings. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.7, p.476-480, 1995.

VAHLE, J.L.; HAYNES, J.S.; ANDREWS, J.J. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.61, p.200-206, 1997.

VECHT, U.; WISSELINK, H.J.; VAN DIJK, J.E., *et al.* Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in

newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infection and Immunity*, v.60, p.550-556, 1992.

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

VINCENT, I.E.; CARRASCO, C.P.; HERMANN, B., *et al.* Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *Journal Virology*, v.77, p. 13288-13300, 2003.

WALLGREN, P.; HASSLUNG, F.; BERGSTRÖM, G., *et al.* Postweaning multisystemic wasting syndrome--PMWS. The first year with the disease in Sweden. *Veterinary Quarterly*, v.26, n.4, p.170-187, 2004.

WEI, L.; KWANG, J.; WANG, J., *et al.* Porcine circovirus type 2 induces the activation of nuclear factor kappa B by I κ B α degradation. *Virology*, v.378, p.177-184, 2008.

WEN, L.; GUO, X.; YANG, H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Veterinary Microbiology*, v.110, n.1-2, p.141-146, 2005.

YANG, Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *CABIOS*, v.13, p.555-556, 1997.

YANG, Z.; NIELSEN, R.; GOLDMAN, N., *et al.* Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, v.155, n.1, p.431-449, 2000.

YANG, Z-Z.; HABIB, M.; SHUAI, J-B., *et al.* Detection of PCV2 DNA by SYBR Green I-based quantitative PCR.

Journal of Zhejiang University SCIENCE B, v.8, n.3, p.162-169, 2007.

11 ANEXOS

Anexo 1

Correlação entre genogrupos da ORF3 e seus subtipos com a classificação das lesões microscópicas em 89 amostras do estudo

Amostras	Estado	Data coleta	Grupos SG	Classificação à Microscopia	Genogrupos e subtipos	Resíduos aa 102 a 104	
SG1							
1431	SC	nov/07	SG1	Discreta	SG1	FHQ	
992	SC	ago/07	SG1	Discreta		FDQ	
1373	SP	nov/07	SG1	X		FDQ	
SG2							
872	GO	jul/07	SG2	moderada	SG2A	LNK	
1127	MT	set/07	SG2	X		FNK	
488	SP	abr/07	SG2	Discreta		FNK	
1359	SC	nov/07	SG2	X		FNK	
993	MG	ago/07	SG2	Severa		FNK	
1429	SC	nov/07	SG2	Discreta		SG2B	FNQ
1471	SP	dez/06	SG2	X		SG2C	FNK
886	ES	jul/07	SG2	Discreta		FNK	
610	MT	mai/07	SG2	Discreta		LNK	
991	MT	ago/07	SG2	X		SG2D	LNK
907	GO	jul/07	SG2	Discreta	LNK		
SG3							
965	MG	jul/07	SG3	Severa	SG3A	LHQ	
1125	MG	set/07	SG3	Moderada		LDO	
1322	MG	nov/06	SG3	Moderada		LDO	
1222	MG	out/07	SG3	Moderada		LDO	
666	RS	mai/07	SG3	X		LDO	
1240	MG	out/07	SG3	Severa		LDO	
1343	MG	nov/06	SG3	Severa		LDO	
1169	MG	set/07	SG3	X		LDO	
200	ES	set/07	SG3	X		LDO	
1144	SC	set/07	SG3	X		LDO	
1088	GO	ago/07	SG3	X		LDO	
893	MG	jul/07	SG3	X		LDO	
1025	MG	ago/07	SG3	Severa		LDO	
1327	RS	out/07	SG3	Moderada		LDO	
955	MG	set/06	SG3	Moderada		LDO	
1034	GO	ago/07	SG3	Severa		LDO	
839	PR	jun/07	SG3	Discreta		LHQ	
722	SP	jun/07	SG3	X		LHQ	
600	MT	mai/07	SG3	X		LHQ	
1039	MT	ago/07	SG3	X		LHQ	
866	SC	jul/07	SG3	X		LHQ	
1029	MG	ago/07	SG3	Discreta		LHQ	
765	MG	jun/07	SG3	Discreta		LHQ	
1350	MG	out/07	SG3	X		LHQ	
295	ES	mar/07	SG3	Moderada		LHQ	
1042	MG	ago/07	SG3	Severa		LHQ	
1171	MG	set/07	SG3	Moderada		LHQ	
1164	MG	set/07	SG3	X		LHQ	
1061	MG	ago/07	SG3	Moderada		LHQ	
1163	MG	set/07	SG3	X		LHQ	
1285	MG	out/07	SG3	X	LHQ		
1050	MG	ago/07	SG3	X	LHQ		
1306	GO	out/07	SG3	Severa	LHQ		
873	MG	jul/07	SG3	X	LHQ		
1396	RS	nov/07	SG3	X	LHQ		
880	MG	jul/07	SG3	X	LHQ		
837	MT	jun/07	SG3	X	LHQ		
727	MG	jun/07	SG3	X	LHQ		
1107	MG	out/06	SG3	X	LHQ		
987	MG	set/06	SG3	X	LHQ		
532	MG	abr/07	SG3	Severa	LHQ		
78	MG	jan/07	SG3	X	LHQ		
526	ES	abr/07	SG3	Discreta	LHQ		
1422	MG	dez/06	SG3	X	LHQ		
549	SC	abr/07	SG3	Discreta	LHQ		
1066	MG	out/06	SG3	Severa	LHQ		
679	MG	mai/07	SG3	Moderada	LHQ		
1162	MG	set/07	SG3	X	LHQ		
648	MG	jun/06	SG3	Moderada	LHQ		
297	MG	fev/07	SG3	X	LHQ		
876	MG	jul/07	SG3	X	LHQ		
1231	MG	out/07	SG3	X	LHQ		
927	GO	set/06	SG3	Discreta	LHQ		
678	SP	mai/07	SG3	Moderada	LHQ		
974	SP	jul/07	SG3	Discreta	LHQ		
1238	SP	out/07	SG3	X	LHQ		
916	PR	jul/07	SG3	Moderada	LHQ		
408	MG	mar/07	SG3	X	LHQ		
958	MT	jul/07	SG3	Moderada	LHQ		
966	MT	jul/07	SG3	Moderada	LHQ		
1329	RS	out/07	SG3	X	LHQ		
988	MG	ago/07	SG3	X	LHQ		
348	MG	mar/07	SG3	X	LHQ		
1167	MG	out/06	SG3	Severa	LHQ		
664	RS	mai/07	SG3	X	LHQ		
1022	PR	ago/07	SG3	X	LHQ		
655	MG	jul/06	SG3	Moderada	LHQ		
80	MG	jan/07	SG3	X	LHQ		
461	MG	abr/07	SG3	Discreta	LHQ		
1149	MS	out/06	SG3	Discreta	LHQ		
137	MG	fev/07	SG3	X	LHQ		
1473	MG	dez/06	SG3	X	LHQ		
622	MT	mai/07	SG3	X	LHQ		
1045	MT	ago/07	SG3	X	LHQ		
906	GO	jul/07	SG3	Discreta	LHQ		

Anexo 2

Distribuição temporal de 89 amostras no período de coleta de setembro de 2006 a novembro de 2007

206

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Estado												
MT												
MS										14/09/06		
GO									27/09/06			
MG									31/09/06	10/10/06	12/10/06	14/10/06
										16/10/06	18/10/06	17/10/06
ES												
SP												17/11/07
PR												
SC												
RS												

207

	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Estado												
MT					60/09/06	58/09/06		90/10/06	12/11/06			
MS					60/09/06	96/09/06		10/10/06				
GO					62/09/06			18/10/06		13/10/06		
						52/09/06		18/10/06		13/10/06		
						90/09/06		18/10/06				
						96/09/06						
MG	78/09/06	27/10/06		52/10/06	69/10/06	96/10/06		9/11/06	12/11/06			
	80/09/06	17/10/06		46/10/06		81/10/06		10/11/06	14/11/06			
						83/10/06		12/11/06	13/11/06			
						80/10/06		10/11/06	15/11/06			
						85/10/06		10/11/06	13/11/06			
						65/10/06		10/11/06	16/11/06			
ES				56/10/06		88/10/06		9/11/06	11/11/06			
SP				48/10/06	63/10/06	94/10/06			13/11/06	13/11/06		
PR						96/10/06		12/11/06				
SC				59/10/06		86/10/06		9/11/06	14/11/06			
RS					66/10/06					17/11/06		
					66/10/06					19/11/06		

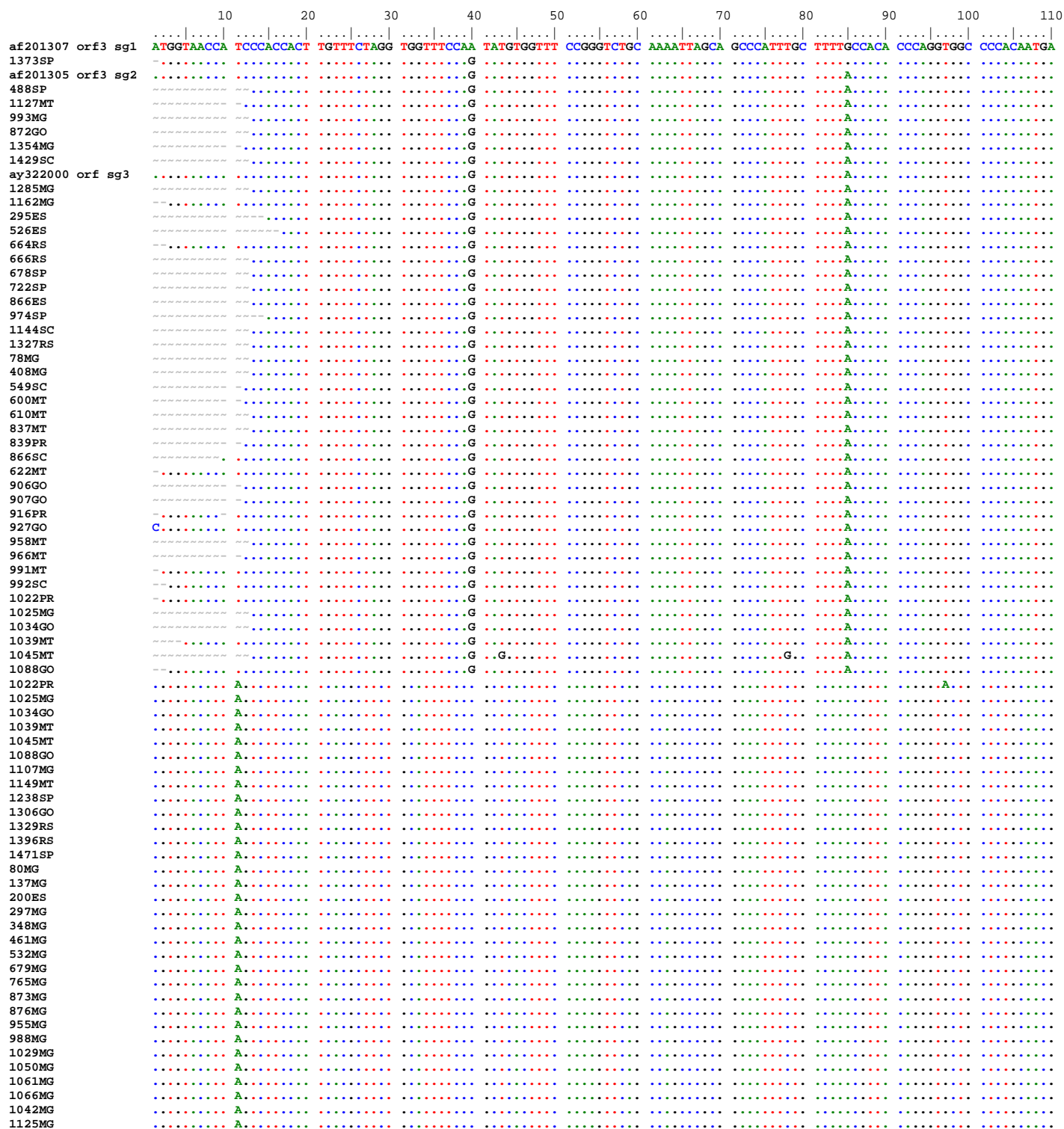
Anexo 3

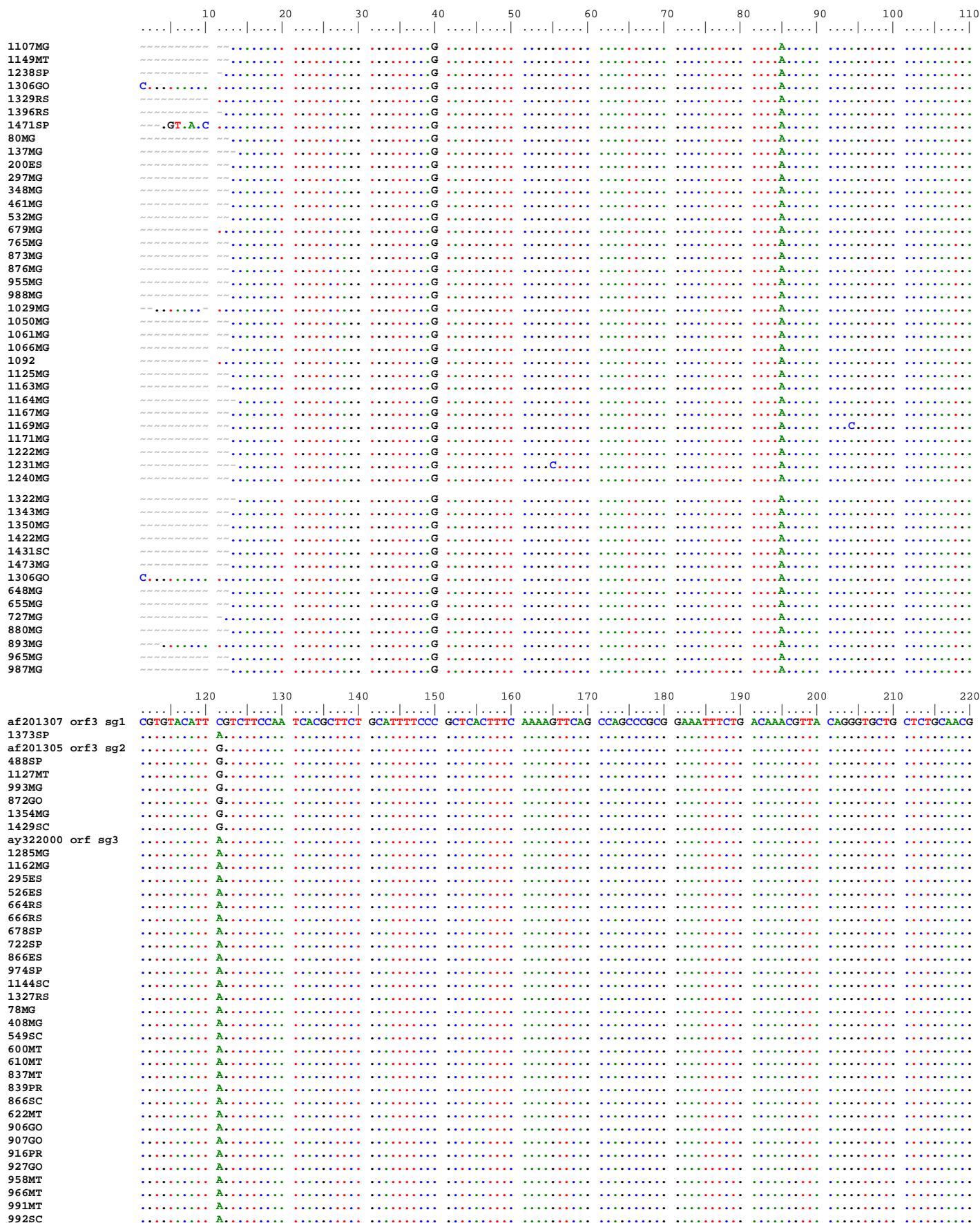
Distribuição espaço temporal de 33 amostras coletadas em uma mesma propriedade em diferentes datas de coleta

Amostra	Data	Grupo (ES/Slp)	Est/Hab	Andar	Data	Grupo (ES/Slp)	Est/Hab	Andar	Data	Grupo (ES/Slp)	Est/Hab	Andar	Data	Grupo (ES/Slp)	Est/Hab	Andar	Data	Grupo (ES/Slp)	Est/Hab	
81	10/07	SI	SC	10	10/07	SB	SC													
92	07/07	SI	SC	10	10/07	SCA	SC													
171	06/06	SC	P	72	10/07	SB	P													
60	10/07	SD	M	91	07/07	SD	M													
97	10/07	SD	0	108	07/07	SCA	0													
55	06/06	SCA	MG	98	07/07	SB	MG													
89	10/07	SB	R	112	07/07	SB	R													
60	10/07	SB	M	119	07/07	SB	M													
167	06/06	SB	MG	38	10/07	SB	MG	76	10/07	SB	MG									
117	06/06	SB	MG	171	07/07	SB	MG													
143	06/06	SB	MG	164	07/07	SB	MG													
62	10/07	SB	M	87	10/07	SB	M	98	10/07	SB	M	116	07/07	SB	M					
116	06/06	SB	MG	80	10/07	SB	MG													
68	10/06	SB	MG	27	07/07	SB	MG													

Anexo 4

Alinhamento da sequência do gene ORF3 do CVS-2 nas 89 amostras do estudo. Pontos (.) indicam identidade de nucleotídeos

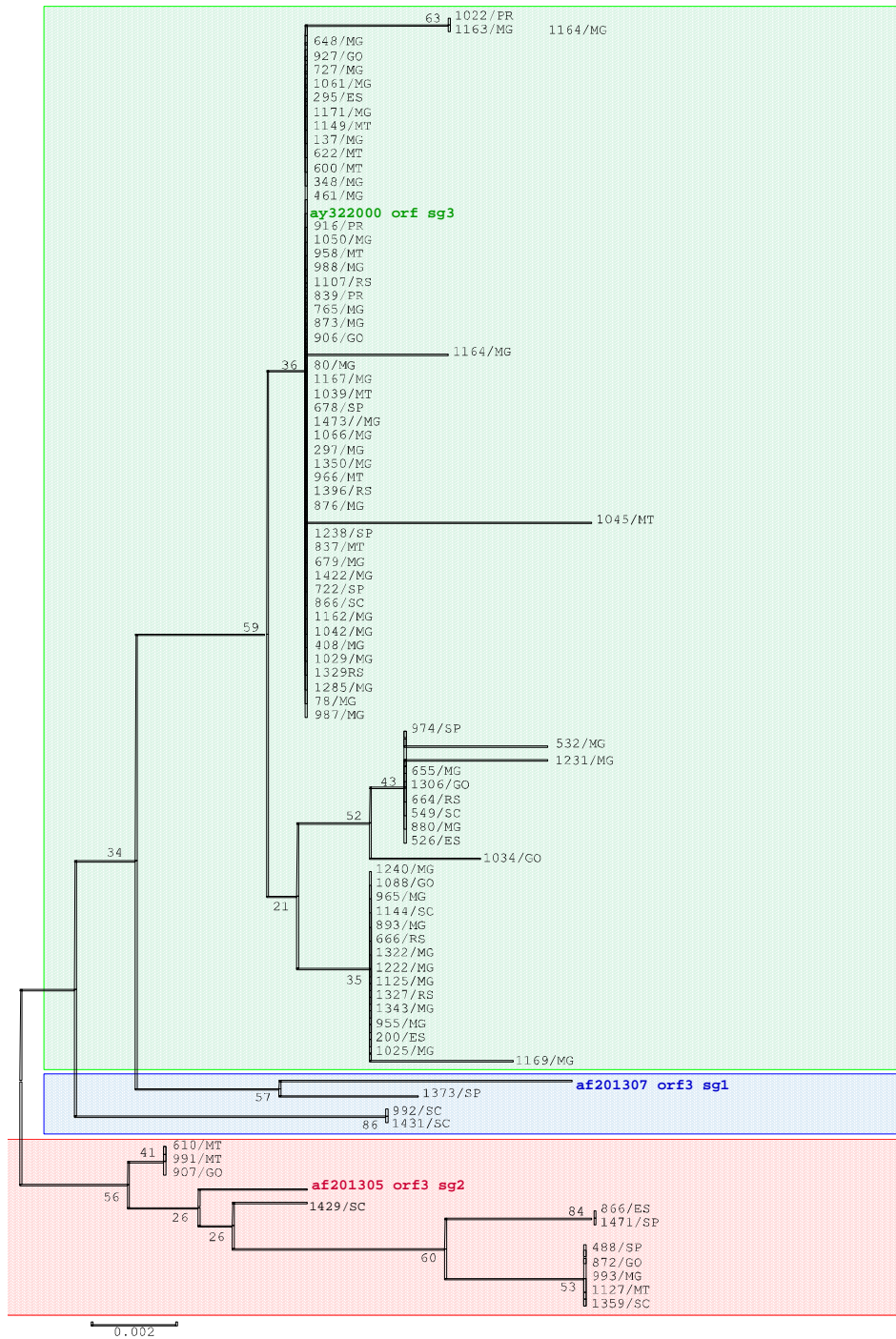




	230	240	250	260	270	280	290	300	310
1240MG									C.G
1322MG									C.G
1343MG									C.G
1350MG									C.G
1422MG									C.G
1431SC		G				T			G
1473MG									C
1306GO									C.C
648MG									C
655MG									C.C
727MG									C
880MG									C.C
893MG									C.G
965MG									C.G
987MG									C
916PR									C
927GO									C
958MT									C
966MT									C
991MT							T		C.A.A
992SC		G				T			G
1022PR									C
1025MG									C.G
1034GO									C.G.C
1039MT									C
1045MT									C
1088GO									C.G
1107MG									C
1149MT									C
1238SP									C
1306GO									C.C
1329RS									C
1396RS									C
1471SP					A	T	G		A.A
80MG									C
137MG									C
200ES									C.G
297MG									C
348MG									C
461MG									C
532MG							T		C.C
679MG									C
765MG									C
873MG									C
876MG									C
955MG									C.G
988MG									C
1029MG									C
1050MG									C
1061MG									C
1066MG									C
1092									C
1125MG									C.G
1163MG									C
1164MG									C
1167MG									C
1169MG									C.G
1171MG									C
1222MG									C.G
1231MG									C.C

Anexo 5

Árvore Filogenética baseada no método de *Neighbor-joining* (NJ) para sequência de nucleotídeos da ORF3 do CVS-2 nas amostras analisadas. Os números dispostos ao longo dos ramos referem-se a porcentagem de confiança na análise NJ. Os genogrupos SG1, SG2 e SG3 estão destacados



Anexo 6

Distribuição geográfica, identificação e número de acesso no GenBank das 89 amostras com histórico da SACS identificadas no estudo da ORF3 do CVS-2

Número de acesso GenBank	Ano	Idade (dias)	Estado do Brasil	Genogrupo da ORF3
GU017329	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017330	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG2D
GU017331	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG2A
GU017332	2007	93 a 108	Mato Grosso do Sul	SG2A
GU017333	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017334	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017335	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017336	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017337	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017338	2007	75 a 110	Mato Grosso	SG3B
GU017339	2006	90 a 100	Mato Grosso	SG3B
GU017353	2007	90 a 100	Goiás	SG2A
GU017354	2007	90 a 100	Goiás	SG2D
GU017355	2006	90 a 100	Goiás	SG3B
GU017356	2007	40	Goiás	SG3B
GU017357	2007	90 a 100	Goiás	SG3A
GU017358	2007	90 a 100	Goiás	SG3B
GU017359	2007	40 a 90	Goiás	SG3A
GU017365	2007	90 a 100	Espírito Santo	SG2C
GU017366	2007	75 a 115	Espírito Santo	SG3B
GU017367	2007	75 a 110	Espírito Santo	SG3B
GU017392	2007	90 a 110	Espírito Santo	SG3A
GU017346	2007	90 a 100	São Paulo	SG1
GU017347	2007	90 a 100	São Paulo	SG2A
GU017348	2006	90 a 100	São Paulo	SG2C
GU017349	2007	72	São Paulo	SG3B
GU017350	2007	88 a 94	São Paulo	SG3B
GU017351	2007	75 a 110	São Paulo	SG3B
GU017352	2007	75 a 110	São Paulo	SG3B
GU017340	2007	75 a 110	Santa Catarina	SG1
GU017341	2007	90	Santa Catarina	SG1
GU017342	2007	60	Santa Catarina	SG2B
GU017343	2007	90 a 110	Santa Catarina	SG3A
GU017344	2007	75 a 110	Santa Catarina	SG3B
GU017345	2007	75 a 110	Santa Catarina	SG3B
GU017368	2007	75 a 110	Santa Catarina	SG2A
GU017326	2007	75 a 110	Paraná	SG3B
GU017327	2007	75 a 110	Paraná	SG3B
GU017328	2007	90 a 120	Paraná	SG3B
GU017360	2007	75 a 110	Rio Grande do Sul	SG3A
GU017361	2007	75 a 110	Rio Grande do Sul	SG3A
GU017362	2007	75 a 110	Rio Grande do Sul	SG3B
GU017363	2007	75 a 110	Rio Grande do Sul	SG3B
GU017364	2007	90 a 120	Rio Grande do Sul	SG3B

[continuação] Anexo 6

Distribuição geográfica, identificação e número de acesso no GenBank das 89 amostras com histórico da SACS identificadas no estudo da ORF3 do CVS-2

Número de acesso GenBank	Ano	Idade (dias)	Estado do Brasil	Genogrupo da ORF3
GU017369	2007	100	Minas Gerais	SG2A
GU017370	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017371	2007	90	Minas Gerais	SG3B
GU017372	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017373	2007	130	Minas Gerais	SG3B
GU017374	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017375	2006	70 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017376	2006	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017377	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017378	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017379	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017380	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017381	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017382	2007	63	Minas Gerais	SG3B
GU017383	2006	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017384	2007	90 a 120	Minas Gerais	SG3B
GU017385	2006	80 a 130	Minas Gerais	SG3B
GU017386	2006	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017387	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017388	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017389	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017390	2006	90	Minas Gerais	SG3B
GU017391	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3A
GU017393	2007	70 a 90	Minas Gerais	SG3A
GU017394	2006	110	Minas Gerais	SG3A
GU017395	2007	63	Minas Gerais	SG3A
GU017396	2007	70 a 110	Minas Gerais	SG3A
GU017397	2006	70 a 110	Minas Gerais	SG3A
GU017398	2006	70 a 110	Minas Gerais	SG3A
GU017399	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3A
GU017400	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3A
GU017401	2007	85	Minas Gerais	SG3A
GU017402	2007	78	Minas Gerais	SG3B
GU017403	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017404	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017405	2007	75 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017406	2007	100 a 117	Minas Gerais	SG3B
GU017407	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017408	2007	80 a 90	Minas Gerais	SG3B
GU017409	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017410	2007	40 a 100	Minas Gerais	SG3B
GU017411	2006	50 a 70	Minas Gerais	SG3B
GU017412	2006	54	Minas Gerais	SG3B
GU017413	2007	90 a 110	Minas Gerais	SG3B
GU017414	2007	90	Minas Gerais	SG3B

Anexo 7

Análise estatística realizada pelo Teste Exato de Fisher entre os grupos de extratos de pulmões com isolamento bacteriano (n=37) e sem isolamento bacteriano (n=34)

O valor de P é 0,6944, considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,7778
Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,3428 – 1,765
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Médio

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,4444

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,5714

Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,3405 - 0,7818
Diferença entre as frações: 0,1270

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Sem Isolamento Bacteriano	Com isolamento Bacteriano	Total
Alto	4 13%	5 17%	9 30%
Médio	12 40%	9 30%	21 70%
Total	16 53%	14 47%	30 100%

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,8677
Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,3941 - 1,911
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Baixo

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,4444

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,5122

Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,3512 – 0,6712
 Diferença entre as frações: 0,06775

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Sem Isolamento Bacteriano	Com isolamento Bacteriano	Total
Alto	4 8%	5 10%	9 18%
Baixo	21 42%	20 40%	41 82%
Total	25 50%	25 50%	50 100%

O valor de P é 0,7895 considerado não significativo.
 A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 1,116
 Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,6931 - 1,796
 (usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio)
 Fração na coluna da esquerda: 0,5714
 Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,3405 - 0,7818

Porção Baixa da fileira (Baixo)
 Fração na coluna da esquerda: 0,5122
 Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,3512 - 0,6712

Diferença entre as frações: 0,05923
 Erro padrão da diferença: 0,1339
 Intervalo de Confiança de 95% da diferença: -0,2033 – 0,3217

Análise de dados

	Sem Isolamento Bacteriano	Com isolamento Bacteriano	Total
Médio	12 19%	9 15%	21 34%
Baixo	21 34%	20 32%	41 66%
Total	33 53%	29 47%	62 100%

RELAÇÃO INTER GRUPOS SEM E COM ISOLAMENTO BACTERIANO

SEM ISOLAMENTO BACTERIANO

Discreta x Moderada **Alto x Médio**

Uma fileira está preenchida com zeros. Nesta situação a análise de Qui-quadrado é impossível. Pelo menos um dos valores deve ser positivo

* * *

Discreta x Moderada **Alto x Baixo**

Uma fileira está preenchida com zeros. Nesta situação a análise de Qui-quadrado é impossível. Pelo menos um dos valores deve ser positivo

* * *

Discreta x Moderada **Médio x Baixo**

O valor de P é 1,6000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 1,000
Intervalo de Confiança de 95% da fração: 0,1040 – 9,619
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333
Diferença entre as frações: 0,000

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Moderada	Total
Médio	1 17%	2 33%	3 50%
Baixo	1 17%	2 33%	3 50%
Total	33 33%	29 67%	62 100%

Discreta x Severa
Alto x Médio

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0.000
Intervalo de Confiança de 95%: -Infinito a Infinito
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Médio

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0.000

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 1.000

Diferença entre as frações: 1.000

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Severa	Total
Alto	0 0%	1 50%	1 50%
Médio	1 50%	0 0%	1 50%
Total	1 50%	1 50%	2 100%

Discreta x Severa
Alto x Baixo

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,000
Intervalo de Confiança de 95%: -Infinito a Infinito
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Baixo

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,000

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,1667

Diferença entre as frações: 0,1667

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Severa	Total
Alto	0 0%	1 14%	1 14%
Baixo	1 14%	5 71%	6 86%
Total	1 14%	6 86%	7 100%

Discreta x Severa Médio x Baixo

O valor de P é 0,2857 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 6,000
Intervalo de Confiança de 95%: 1,002 – 35,924
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio):
Fração na coluna da esquerda: 1,000

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,1667

Diferença entre as frações: 0.8333

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Severa	Total
Médio	1 14%	0 0%	1 14%
Baixo	1 14%	5 71%	6 86%
Total	2 29%	5 71%	7 100%

Moderada x Severa
Alto x Médio

O valor de P é 0,3333 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,000
Intervalo de Confiança de 95%: -Infinito a Infinito
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Médio

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,000

Porção Média da fileira (Médio):
Fração na coluna da esquerda: 1,000

Diferença entre as frações: 1,000

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Moderada	Severa	Total
Alto	0 0%	1 33%	1 33%
Médio	2 67%	0 0%	2 67%
Total	2 67%	1 33%	3 100%

Moderada x Severa
Alto x Baixo

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,000
Intervalo de Confiança de 95%: -Infinito a Infinito
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Baixo

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,000
Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,2857

Diferença entre as frações: 0,2857

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Moderada	Severa	Total
Alto	0 0%	1 13%	1 13%
Baixo	2 25%	5 63%	7 88%
Total	2 25%	6 75%	8 100%

Moderada x Severa

Médio x Baixo

O valor de P é 0,1667 considerado não significativo.

A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 3,500

Intervalo de Confiança de 95%: 1,085 – 11,295

(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio)

Fração na coluna da esquerda: 1,000

Porção Baixa da fileira (Baixo)

Fração na coluna da esquerda: 0,2857

Diferença entre as frações: 0,7143

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Moderada	Severa	Total
Médio	2 22%	0 0%	2 22%
Baixo	2 22%	5 56%	7 78%
Total	4 44%	5 56%	9 100%

COM ISOLAMENTO BACTERIANO

Discreta x Moderada Alto x Médio

O valor de P é 0,2262 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,4000
Intervalo de Confiança de 95%: 0,07757 – 2,063
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Médio

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,8333

Diferença entre as frações: 0,5000

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Moderada	Total
	1	2	3
Alto	11%	22%	33%
	5	1	6
Médio	56%	11%	67%
	6	3	9
Total	67%	33%	100%

Discreta x Moderada Alto x Baixo

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,8889
Intervalo de Confiança de 95%: 0,1590 - 4,970
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Baixo

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Porção Baixa da fileira (Baixo)

Fração na coluna da esquerda: 0,3750
Intervalo de Confiança de 95% de cada fração: 0,1520 to 0,6459
Diferença entre as frações: 0,04167

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Moderada	Total
	1	2	3
Alto	5%	11%	16%
Baixo	6	10	16
	32%	53%	84%
Total	7	12	19
	37%	63%	100%

Discreta x Moderada Médio x Baixo

O valor de P é 0,1486 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 2,222
Intervalo de Confiança de 95%: 1,074 to 4,597
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,8333

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,3750

Intervalo de Confiança de 95% de cada fração: 0,1520 – 0,6459
Diferença entre as frações: 0,4583

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Moderada	Total
Médio	5 23%	1 5%	6 27%
Baixo	6 27%	10 45%	16 73%
Total	11 50%	11 50%	22 100%

Discreta x Severa Alto x Médio

O valor de P é 0,5000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,4667
Intervalo de Confiança de 95%: 0,08803 – 2,474
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Médio

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,7143

Diferença entre as frações: 0,3810

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Severa	Total
Alto	1 10%	2 20%	3 30%
Médio	5 50%	2 20%	7 70%
Total	6 60%	4 40%	10 100%

Discreta x Severa Alto x Baixo

O valor de P é 0,5227 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,5000
Intervalo de Confiança de 95%: 0,09449 – 2,646
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Baixo

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,6667
Diferença entre as frações: 0,3333

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Severa	Total
Alto	1 8%	2 17%	3 25%
Baixo	6 50%	3 25%	9 75%
Total	7 58%	5 42%	12 100%

Discreta x Severa
Médio x Baixo

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significante.

Risco Relativo = 1,071
Intervalo de Confiança de 95%: 0,5548 - 2,069
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,7143

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,6667

Diferença entre as frações: 0,04762
O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Discreta	Severa	Total
Médio	5 31%	2 13%	7 44%
Baixo	6 38%	3 19%	9 56%
Total	7 69%	5 31%	12 100%

Moderada x Severa

Alto x Médio

O valor de P é 1,0000 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 1,500
Intervalo de Confiança de 95%: 0,2296 - 9,801
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Médio

Topo da fileira (Alto)

Fração na coluna da esquerda: 0,5000

Porção Média da fileira (Médio)

Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Diferença entre as frações: 0,1667

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Moderada	Severa	Total
Alto	2 29%	2 29%	4 57%
Médio	1 14%	2 29%	3 43%
Total	3 43%	4 57%	7 100%

Moderada x Severa

Alto x Baixo

O valor de P é 0,5378 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significativa.

Risco Relativo = 0,6500
Intervalo de Confiança de 95%: 0,2333 – 1,811
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Alto x Baixo

Topo da fileira (Alto)
Fração na coluna da esquerda: 0,5000

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,7692

Diferença entre as frações: 0.2692

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Moderada	Severa	Total
Alto	2 12%	2 12%	4 24%
Baixo	10 59%	3 18%	13 76%
Total	12 71%	5 29%	17 100%

Moderada x Severa

Médio x Baixo

O valor de P é 0,2143 considerado não significativo.
A associação entre fileira/coluna não é estatisticamente significante.

Risco Relativo = 0,4333
Intervalo de Confiança de 95%: 0,08506 - 2,208
(usando a aproximação de Katz)

Diferença entre duas proporções: Médio x Baixo

Porção Média da fileira (Médio)
Fração na coluna da esquerda: 0,3333

Porção Baixa da fileira (Baixo)
Fração na coluna da esquerda: 0,7692

Diferença entre as frações: 0,4359

O erro padrão e o intervalo de confiança da diferença entre proporções apenas pode ser calculado quando cada célula for maior que cinco.

Análise de dados

	Moderada	Severa	Total
Médio	1 6%	2 13%	3 19%
Baixo	10 63%	3 19%	13 81%
Total	11 69%	5 31%	16 100%