

DANIELLE GAVA

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA
CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO 2 E ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA
EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA**

LAGES – SC

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETRINÁRIAS – CAV
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E PATOLOGIA – DLCP**

DANIELLE GAVA

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA
CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO 2 E ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA
EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr.^a Janice Reis Ciacci Zanella

LAGES – SC

2006

DANIELLE GAVA

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA
CIRCOVIRUS SUÍNO TIPO 2 E ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA
EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, no curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, em Lages, 17 de Março de 2006, pela banca examinadora:

Janice Reis Ciacci Zanella

Embrapa Suínos e Aves (Orientador)

Eliana Knackfuss Vaz

CAV – UDESC (Membro)

Rejane Schaefer

Embrapa Suínos e Aves (Membro)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aldo e Roza, pelo carinho, exemplo e empenho. Aos meus irmãos Felipe e Fernando e ao Eduardo, pela amizade acima de tudo, paciência e compreensão.

À minha orientadora Janice Reis Ciacci Zanella, à co-orientadora Eliana Knackfuss Vaz e ao pesquisador Nelson Morés, pela idealização e apoio na elaboração deste estudo; e pela amizade, estímulo e paciência.

Aos demais professores do setor de Patologia do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC.

Aos bolsistas, estagiários e funcionários setor de Patologia do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC e da EMBRAPA Suínos e Aves pela constante ajuda e amizade.

Aos colegas com quem convivi e aos amigos que fiz, pela luta, angústias e alegrias que passamos juntos.

À todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste estudo, obrigada.

O grande rio tem seu trajeto, antes do mar imenso. Copiando-lhe a expressão, a alma percorre igualmente caminhos variados e etapas diversas, também recebe afluentes de conhecimentos, aqui e ali, avoluma-se em expressão e purifica-se em qualidade, antes de encontrar o Oceano Eterno da Sabedoria. (André Luiz)

RESUMO

A Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (SMDS) é uma doença multifatorial, causada pelo *Circovirus* Suíno Tipo 2 (PCV-2). Clinicamente está caracterizada por definhamento, aumento de tamanho dos linfonodos, palidez e/ou icterícia e sinais digestivos e respiratórios. As lesões afetam principalmente tecidos linfóides, pulmão, rim e fígado. Os achados microscópicos consistem principalmente em infiltração linfo-histiocitária em vários órgãos e depleção dos folículos linfóides. Entretanto, para estabelecer o diagnóstico conclusivo da SMDS, é necessário associar sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas, além da demonstração do antígeno ou DNA viral. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar duas técnicas de diagnóstico: imunocitoquímica (ICQ) em duas linhagens celulares (ST e VERO), utilizando dois tipos de anticorpos primários anti PCV-2 (policlonal produzido em coelho e policlonal produzido em suíno) para determinação de anticorpos anti PCV-2 em soro suíno e, imunohistoquímica (IHQ) em diversos tecidos parafinizados de suínos (linfonodo, pulmão, fígado, timo, rim e intestino), utilizando dois tipos de anticorpos primários (monoclonal produzido em camundongo e policlonal produzido em coelho) para demonstração do antígeno viral. Na ICQ, ambos cultivos celulares foram suscetíveis à infecção, podendo-se detectar o antígeno tanto no núcleo quanto no citoplasma das células, com os dois anticorpos primários. A IHQ foi padronizada nos diversos tecidos com os dois anticorpos, sendo que o antígeno foi verificado principalmente em macrófagos, histiócitos e outras células inflamatórias. Com o objetivo de verificar a transmissão via sêmen de PCV-2 e sua capacidade infecciosa para a fêmea e para a progênie, 20 fêmeas negativas para PCV-2 foram inseminadas, 10 com sêmen de macho negativo e 10 com sêmen de macho positivo. Após a inseminação, as 20 fêmeas foram acompanhadas clinicamente e foi coletado sangue para pesquisa de DNA de PCV-2 por “nested-PCR”. Baseado no resultado, 4 fêmeas das 20 foram selecionadas (1 fêmea soronegativa inseminada com sêmen negativo, 2 fêmeas soronegativas inseminadas com sêmen positivo e 1 fêmea soronegativa inseminada com sêmen positivo, mas que soroconverteu ao redor dos 30 dias de gestação). Após o parto, 12 leitões machos, 3 de cada fêmea, foram selecionados e mantidos em isolamento. Amostras de sêmen e soro foram coletadas para pesquisa de DNA de PCV-2 por “nested-PCR”. Para verificar quais órgãos abrigam o PCV-2, os leitões sofreram eutanásia ao redor dos nove meses de idade, e amostras de órgãos linfóides, sistêmicos e reprodutivos foram coletadas para avaliação por “nested-PCR”, histopatologia (HE) e IHQ. Ao avaliar o soro por ICQ, todos os 12 leitões soroconverteram (4 foram fortemente positivos, 3 moderadamente positivos e 5 fracamente positivos). Ao avaliar as amostras por “nested-PCR”, vários tecidos foram positivos em 10 dos 12 suínos. Ao avaliar as mesmas amostras por IHQ, várias foram positivas em 8 dos 12 suínos. No geral, os resultados obtidos nas diferentes amostras nos 4 testes (ICQ, “nested-PCR”, HE e IHQ) colaboraram entre si. Assim, estes resultados evidenciam a provável transmissão do PCV-2 pelo sêmen para a leitegada e também o potencial infeccioso do vírus entre os suínos.

PALAVRAS-CHAVE: Suíno. PCV-2. Sêmen. Imunocitoquímica. Imunohistoquímica. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is a multifactorial disease caused by a Porcine *Circovirus* Type 2 (PCV-2). It is clinically characterized by wasting, enlargement of lymph nodes, pallor, jaundice, and respiratory and digestive signs. The lesions affect mainly lymphoid tissues, lungs, kidneys and liver. Pathological findings consist of lymphohistiocytic infiltration of various organs and depletion of lymphoid follicles. However, to establish the conclusive diagnosis of PMWS, it is necessary the association of clinical signs, gross and microscopic lesions, besides the evidence of the antigen or viral DNA. Thus, the aim of this work was to establish two techniques of diagnosis: immunocitochemistry (ICC) in two cell lines (ST and VERO), using two types of primary antibodies against PCV-2 (a polyclonal produced in rabbit and a polyclonal produced in pig), to determine antibodies against PCV-2 in swine serum, and immunohistochemistry (IHC) in various paraffined swine tissues (lymph node, lung, liver, thymus, kidney and intestine), using two types of primary antibodies (a monoclonal produced in mouse and a polyclonal produced in rabbit) to show the viral antigen. In ICC, both cells cultures were susceptible to infection, where the antigen could be detected in the nucleus as much as in cytoplasm of the cells, with both primary antibodies. The IHC was established in the different tissues with both antibodies, where the antigen was verified mainly in macrophages, histiocytes and others inflammatory cells. Intending to verify the transmission of PCV-2 by semen and its infection power to the sow and to the piglets, 20 negative sows to PCV-2 were inseminated, 10 with a negative boar semen and 10 sows with a positive boar semen. After the insemination, the 20 sows were clinically attended and blood was collected to PCV-2 DNA investigation by nested-PCR. Based on the results, 4 sows between the 20 were selected (1 sow was serum negative inseminated with a negative semen, 2 sows were serum negative inseminated with a positive semen and 1 sow was serum negative inseminated with a positive semen, but serum converted around the 30 days of pregnancy). After the parturition, 12 male piglets, 3 of each sow, were selected and isolated. Samples of semen and serum were collected to PCV-2 DNA investigation by nested-PCR. Intending to verify which organs shelter the PCV-2, the piglets were submitted to euthanasia around 9 months of age, and samples of lymphoid, systemic and reproductive organs were collected to investigation by nested-PCR, histopathology (HE) and IHC. Evaluating the serum by ICC, all 12 piglets serum converted (4 were strongly positive, 3 were moderate positive and 5 were weakly positive). Evaluating the samples by nested-PCR, various tissues were positive in 10 of 12 piglets. Evaluating the same samples by IHC, various samples were positive in 8 of 12 piglets. In general, the results had, in different samples, in the 4 tests (ICC, nested-PCR, HE and IHC) completed themselves. Thus, these results show the probable PCV-2 semen transmission to the piglets and also the infectious potential among pigs.

KEYWORDS: Swine. PCV-2. Semen. Immunocitochemistry. Immunohistochemistry. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organograma esquemático das etapas e animais participantes do experimento.....35

Figura 2- Monocamada de células. **A:** Células ST positivas. **B:** Células VERO positivas. **C:** Células ST negativas. **D:** Células VERO negativas.43

Figura 3- Diversos órgãos positivos para IHQ. **A:** Linfonodo, marcação difusa, AEC. **B:** Linfonodo, marcação ao redor membrana celular, AEC. **C:** Linfonodo, marcação ao redor membrana celular, DAB. **D:** Linfonodo, marcação difusa, DAB. **E:** Pulmão, marcação difusa, DAB. **F:** Pulmão, marcação em infiltrado inflamatório, DAB. **G:** Pulmão, marcação no infiltrado mucocelular no interior do brônquio, AEC. **H:** Pulmão, marcação na mucosa de brônquios, AEC. **I:** Fígado, marcação difusa por todo o lóbulo, AEC. **J:** Fígado, marcação no interior de vaso, AEC. **K:** Timo, marcação difusa, principalmente em células reticulares epiteliais, AEC. **L:** Rim. Marcação de célula do epitélio tubular, AEC. **M:** Intestino. Marcação no tecido linfóide (placa de Peyer), DAB. **N:** Linfonodo negativo, ausência de marcação.....48

Figura 4- Amostras dos diversos órgãos do suíno 10F testadas por “nested-PCR”. **1:** Pênis distal. **2:** Testículo. **3:** Epidídimo medial. **4:** Próstata. **5:** Glândula bulbouretral. **6:** Músculo da glândula bulbouretral. **7:** Linfonodo parotídeo. **8:** Pulmão. **9:** Fígado. **10:** Rim. **11:** Pâncreas. **12:** Controle negativo. **13:** Controle positivo. **14:** Marcador 100 pb.51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Descrição dos suínos participantes do experimento (pais, mães e filhos), de acordo com o resultado obtido por “nested-PCR” para PCV-2.....37
- Tabela 2-** Detecção de DNA de PCV-2 pela técnica de “nested-PCR” em amostras de órgãos dos 12 suínos avaliados durante o experimento.52
- Tabela 3-** Detecção de anticorpos para PCV-2 pela técnica de ICQ em amostras de soro dos 12 suínos avaliados durante o experimento.55
- Tabela 4-** Detecção de PCV-2 pela técnica de IHQ em amostras de órgãos dos 12 suínos avaliados durante o experimento.57
- Tabela 5-** Compatibilidade entre a técnica de “nested-PCR” e IHQ na detecção de PCV-2 em amostras dos 12 suínos experimentados.58
- Tabela 6-** Compatibilidade dos testes virológicos (“nested-PCR” e IHQ) e sorológico (ICQ) entre os 12 suínos experimentados.....59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	13
1.2 DISTRIBUIÇÃO.....	14
1.3 CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS.....	15
1.4 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA	16
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
1.6 LESÕES MACROSCÓPICAS.....	20
1.7 LESÕES MICROSCÓPICAS	21
1.8 DIAGNÓSTICO.....	22
1.9 CONTROLE	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) ...	26
3.1.1 Técnica de imunocitoquímica.....	26
3.1.2 Cultivo celular.....	26
3.1.3 Isolamento e inoculação viral	27
3.1.4 Preparação e fixação da monocamada de células.....	28
3.1.5 Bloqueio da monocamada de células.....	28
3.1.6 Anticorpos primário e secundário.....	29
3.1.7 Revelação e contracoloração.....	29
3.1.8 Leitura e interpretação	30
3.2 PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) .	30
3.2.1 Técnica de imunohistoquímica	30
3.2.2 Tecidos positivos e negativos	31
3.2.3 Preparação das lâminas.....	31
3.2.4 Reidratação.....	31
3.2.5 Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena.....	32
3.2.6 Anticorpos primário e secundário.....	32
3.2.7 Revelação e contracoloração.....	33

3.2.8	Leitura e interpretação	34
3.3	ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	35
3.3.1	Realização do experimento	35
3.3.2	Exames, seleção e monitoramento das fêmeas (mães) e machos (pais) .	35
3.3.3	Exames, seleção e monitoramento dos leitões (filhos)	37
3.3.4	Reação em cadeia da polimerase	38
3.3.5	Histopatologia	39
3.3.6	Imunohistoquímica	40
3.3.7	Imunocitoquímica	40
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ) ...	41
4.2	PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) .	44
4.3	ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	50
5.	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE	87
	APÊNDICE A - Soluções utilizadas na Imunocitoquímica	88
	APÊNDICE B - Soluções utilizadas na Imunohistoquímica	90
	APÊNDICE C - Soluções utilizadas na “nested-PCR”	93

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura apresenta grande importância no setor econômico brasileiro. O país é o terceiro maior produtor de suínos no mundo e possui o quarto maior mercado consumidor. Neste cenário, a região Sul tem grande participação, sendo o estado de Santa Catarina responsável por 45,7% das exportações de carne suína brasileira (ABIPECS, 2005). Devido à posição de destaque que a produção de suínos alcança no país, faz-se necessário manter o plantel em adequado nível sanitário, a fim de que se possa obter também maior ganho de peso e baixa conversão alimentar.

A mudança na forma de produção de suínos, de fluxo contínuo para produção em diferentes sítios de acordo com a idade dos animais, tem ajudado a reduzir o impacto causado pelas doenças crônicas. Ao mesmo tempo, algumas alterações no sistema de produção podem ter favorecido a ocorrência de novas doenças e reemergência de outras, assim como, a amplificação de doenças causadas por patógenos comuns, tudo isto reduzindo a produtividade através de mortalidade, baixo desempenho, desuniformidade dos lotes, má conversão alimentar, condenação de carcaça e gastos com medicação.

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Em 1974 foi descoberta a existência de um pequeno vírus contaminante da linhagem celular PK-15, derivada de rim de suíno (TISCHER, RASCH e TOCHTERMANN, 1974). Em 1982, o vírus foi corretamente classificado como um vírus composto por ácido desoxirribonucléico (DNA), que não pertencia a nenhum dos gêneros conhecidos até o momento. Tratava-se de um vírus com cadeia única de DNA, circular e covalentemente ligada nas extremidades, razão pela qual foi sugerido sua inclusão em um novo gênero, denominado *Circovirus* (TISCHER et al., 1982).

Em 1991 foi descrita, no Canadá, uma doença desconhecida até então, a qual foi denominada Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (SMDS) (HARDING, 1996). Em 1997, apresentou-se uma correlação desta nova doença com o *Circovirus* (CLARK, 1997); esta mesma correlação havia sido estabelecida um ano antes nos Estados Unidos (DAFT et al., 1996). Em 1998, o genoma deste vírus associado à SMDS foi totalmente seqüenciado e diferenças importantes, do ponto de vista genômico entre este e o *Circovirus* associado à linhagem celular PK-15, foram observadas (HAMEL, LIN e NAYAR, 1998). Devido a isto, decidiu-se renomear estes dois tipos de vírus como *Circovirus* Suíno Tipo 1 (PCV-1), o vírus contaminante da linhagem celular, o qual é apatogênico para suínos, e *Circovirus* Suíno Tipo 2 (PCV-2) como o causador da SMDS (ALLAN et al., 1998).

1.2 DISTRIBUIÇÃO

Atualmente, o PCV-2 encontra-se amplamente distribuído nas Américas, Europa, Ásia e Oceania. Entretanto, estudos retrospectivos realizados com soros revelaram a presença do vírus desde 1969 na Bélgica, 1973 na Irlanda do Norte e 1985 no Canadá e Espanha (MAGAR, MÜLLER e LAROCHELLE, 2000; SEGALÉS e DOMINGO, 2002). Da mesma forma, a análise de tecidos de suínos parafinizados determinou a presença do vírus desde 1970 na Inglaterra (GRIERSON et al., 2004), 1986 na Espanha e Suíça (RODRÍGUEZ-ARRIOJA et al., 2003; STAEBLER et al., 2005), 1989 no Japão (MORI et al., 2000), e 1993 na Tailândia (KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA et al., 2002).

Em relação ao Brasil, a SMDS foi diagnosticada primeiramente em 2000 em Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2000; CIACCI-ZANELLA et al., 2001), contudo, estudos retrospectivos indicaram a presença do vírus desde 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2004a). Atualmente, a doença é descrita em outros estados, como Rio Grande do Sul (PESCADOR et al., 2003), Paraná, São Paulo (CASTRO et al., 2003), Rio de Janeiro (FRANÇA et al., 2005a), Espírito Santo (CHIARELLI et al., 2005) e Minas Gerais (PINTO et al., 2003; BARBOSA, 2005). Além disto, assim como em outros países, tanto o PCV-1 quanto o PCV-2 circulam na população suína brasileira (CASTRO et al., 2004).

1.3 CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO VÍRUS

Os vírus incluídos na família *Circoviridae* são vírus pequenos, icosaédricos e não envelopados. De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICVT), a família *Circoviridae* está composta por dois gêneros. O primeiro é o gênero *Circovirus*, onde estão incluídos o PCV-1, o PCV-2 (ALLAN e ELLIS, 2000), o *Circovirus* do pombo (CoCV), o *Circovirus* do canário (CaCV), o *Circovirus* do ganso (GoCV) e o vírus da Doença do bico e penas dos psitacídeos (PBFDV) (TODD, 2004). O outro é o gênero *Gyrovirus*, no qual está inserido o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) (TODD, 2004). Além disso, o *Circovirus* apresenta semelhanças com outros dois vírus humanos, o TT vírus (TTV) e o TTV-like minivírus (TLMV) (BIAGINI, 2004), e também com vírus de plantas, incluindo trevo subterrâneo, côco e banana (MEEHAN et al., 1997).

Os *Circovirus* suínos caracterizam-se por serem pequenos, em torno de 17 a 20 nm de diâmetro, possuem fita simples de DNA, sendo que o PCV-1 apresenta 1759 pares de base de nucleotídeos (pb) e o PCV-2 1768 pb. A homologia dentro dos isolados de PCV-1 ou PCV-2 é maior que 90%, enquanto que a homologia entre o PCV-1 e o PCV-2 está entre 68 e 76% (KIM e LYOO, 2002). Além disto, seu genoma é composto por 7 ORFs (“open reading frames” – regiões abertas de leitura), onde a ORF1 é responsável pela codificação de uma proteína associada à replicação viral, a ORF2 codifica uma proteína imunogênica do capsídeo, a ORF3 está envolvida com a indução de apoptose e as demais ORFs apresentam atividade ainda desconhecida, podendo representar importante papel na replicação viral e/ou na patogenia (LIU, CHEN e KWANG, 2005). Estudos determinaram que algumas

seqüências de aminoácidos nestas ORFs apresentam pequeno número de diferentes resíduos, os quais seriam responsáveis pelas diferentes condições clínicas apresentadas (MEEHAN et al., 2001; LIU, CHEN e KWANG, 2005).

Ao relacionar as propriedades físico-químicas do PCV, foi observado que este não possui atividade hemoaglutinante sobre os eritrócitos, é resistente ao pH 3, ao clorofórmio e a temperaturas entre 56°C e 70°C, seu coeficiente de sedimentação é de 57S e a densidade em CsCl é de 1.37 gm/ml (TISCHER et al., 1982; ALLAN et al., 1994). O vírus resiste também ao congelamento, à luz ultravioleta (SHIBATA et al., 2003) e aos desinfetantes a base de clorexidina, formolaldeído, iodo e álcool. Por outro lado, desinfetantes contendo fenol, amônia quaternária, hidróxido de sódio e outros agentes oxidantes, são capazes de diminuir a carga viral (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). O vírus também se replica em várias linhagens celulares suínas e é dependente de proteínas celulares expressas durante a fase S do ciclo celular, apesar de não causar efeito citopático (TISCHER et al., 1982; TISCHER et al., 1987; ALLAN et al., 1994). Além disto, o vírus possui afinidade por células fagocíticas mononucleares e pode ser verificado em diversos tecidos, como linfonodos, pulmão, tonsila, timo, baço, intestino, fígado, rim e glândula salivar.

1.4 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

O PCV-2 tem sido detectado em secreções nasais, saliva, fezes e soro de suínos afetados (SHIBATA et al., 2003; YANG et al., 2003; SEGALÉS et al., 2005), o

que indica a disseminação horizontal da doença (FERNANDES et al., 2003b). Recentemente, a transmissão vertical, associada com falhas reprodutivas tem sido reportada (PENSAERT et al., 2004; MALDONADO et al., 2005). Estes estudos assinalam a possibilidade de que existam outras vias de contágio, como o sêmen (LAROCHELLE et al., 2000; KIM et al., 2001; CIACCI-ZANELLA et al., 2003b; CIACCI-ZANELLA et al., 2004b; ROSE et al., 2003).

Fatores de risco causadores de estresse como densidade elevada, baixa qualidade do ar, água e ração, mistura de lotes com procedência e idades diferentes e presença de enfermidades concomitantes como a parvovirose suína (PPV), síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), doença de Aujeszky, hepatite E, influenza, dentre outras, podem favorecer o desenvolvimento da doença ou exacerbar sua manifestação clínica (ROSE et al., 2003; ALLAN et al., 2004). Entretanto, alguns estudos reportam a reprodução da SMDS em suínos livres de patógenos específicos (“specific pathogen free” - SPF) (MAGAR et al., 2000) e em leitões derivados de cesariana privados de colostro (“cesarian-derived colostrum-deprived” - CDCD) (OKUDA et al., 2003), o que indica que o PCV-2 é essencial para causar a doença. Além disto, as lesões são mais agudas quando PCV-2 é inoculado juntamente com o PPV (ELLIS et al., 1999; KENNEDY et al., 2000), PRRS (ROVIRA et al., 2002), ou quando os animais são imunoestimulados (GRASLAND et al., 2005; MEERTS et al., 2005). Acredita-se que por estimularem a migração e proliferação de células histiocíticas, bem como a síntese de DNA e citocinas, a presença destes vírus propiciariam condições ideais para desenvolvimento do PCV-2, cujo método de replicação, ainda não bem compreendido, parece ter como único requisito a nova síntese de DNA celular e um tropismo por células de origem histiocítica (KIM e CHAE, 2004).

A SMDS é observada principalmente em suínos entre 8 e 16 semanas de idade. A taxa de morbidade está entre 4 e 25%, enquanto que a mortalidade acomete 70 a 80% dos suínos afetados, podendo alcançar índices de até 100% (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). Contudo, estas taxas variam de acordo com a idade dos suínos, estágio da doença e manejo (ALLAN e ELLIS, 2000). Os níveis de anticorpos maternos começam a declinar entre 4 e 5 semanas após o nascimento, atingindo o nível mais baixo entre 8 e 9 semanas. Entre 13 e 15 semanas, anticorpos anti PCV-2 já podem ser identificados e, a partir das 18 semanas, os títulos encontram-se altos novamente, o que indica uma exposição ao vírus entre 11 e 13 semanas de idade (TISCHER et al., 1986; ALLAN et al., 1994; TISCHER et al., 1995; LAROCHELLE, MAGAR e D'ALLAIRE, 2003; BARBOSA, 2005).

A relação entre o PCV-2 e as células envolvidas na resposta imune difere durante o curso da doença. A presença de macrófagos ativados parece ser um fator essencial no desenvolvimento da doença, enquanto que a imunossupressão é uma consequência em suínos severamente afetados (SEGALÉS et al., 2004). Nestes suínos afetados, o número de monócitos e neutrófilos está aumentado, mas o número de linfócitos B e T (principalmente CD3+) está diminuído. Em consequência, ocorre também a redução de CD4+, CD8+ e IgM+ (MORROW-TESSCH e ANDERSSON, 1994; SEGALÉS et al., 2001; DARWICH et al., 2002; KRAKOWKA, et al., 2002; DARWICH, SEGALÉS e MATEU, 2004; SEGALÉS et al., 2004). Os mesmos resultados foram encontrados por Sarli et al. (2001), utilizando uma técnica de Imunohistoquímica (IHQ) em cortes de linfonodos. Recentemente, evidenciou-se que o PCV-2 induz a apoptose em linfócitos B, levando à severa depleção linfóide e imunossupressão sistêmica (MANDRIOLI et al., 2004; LIU, CHEN e KWANG, 2005).

Suínos com SMDS também apresentam anemia normocítica hipocrômica (DARWICH et al., 2002).

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Apesar da maioria dos sinais clínicos serem inespecíficos e variáveis, os animais afetados apresentam atraso no crescimento com emagrecimento progressivo, palidez corporal, algumas vezes com icterícia, aumento dos linfonodos inguinais e sintomas respiratórios (taquipnéia, dispnéia e tosse) e digestivos (diarréia), os quais não regridem com tratamentos antimicrobianos de uso comum na suinocultura (ALLAN e ELLIS, 2000; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; CIACCIZANELLA e MORÉS, 2003a, 2003b; HARDING, 2004; SARRADELL et al., 2004). Outros sinais, muitos deles relacionados com infecções secundárias por *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* sp, *Salmonella* sp, *Streptococcus suis* entre outros, podem estar presentes (ALLAN e ELLIS, 2000; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; SEGALÉS et al., 2004). Além disto, a presença de agentes secundários habitualmente associados com imunossupressão como o *Pneumocystis carinii*, *Staphylococcus hyicus*, *Aspergillus* spp e *Chlamydia* spp, também têm sido identificados com freqüência em animais com SMDS (SEGALÉS et al., 2004).

O PCV-2 tem sido relacionado também com outras síndromes e doenças, como a síndrome da dermatite e nefropatia suína, doença do complexo respiratório suíno, falhas reprodutivas com presença de natimortos, mumificação fetal e abortos (KIM, JUNG e CHAE, 2004; PENSAERT et al., 2004; MALDONADO et al., 2005; PARK et al., 2005), enterite granulomatosa, epidermite exsudativa, linfadenite necrotizante e tremor congênito (ELLIS et al., 2004; HARDING, 2004; SEGALÉS, ROSELL e DOMINGO, 2004; CHAE, 2005).

1.6 LESÕES MACROSCÓPICAS

Na necropsia, pode-se observar um aumento do tamanho dos linfonodos (inguinal superficial, mesentérico, mediastínico e parotideo), que é uma das lesões predominantes. Os pulmões apresentam-se não-colabados devido ao edema intersticial e nos rins são visualizadas manchas esbranquiçadas de diâmetro variável de distribuição multifocal na região subcapsular, assim como aumento de volume em função do edema. Outras lesões que podem estar presentes são redução ou aumento do fígado e palidez, e aumento de volume do baço. Alguns animais apresentam úlcera gástrica na *pars oesophagea*, podendo causar hemorragia interna, a qual seria responsável pela palidez corporal. Podem-se observar também lesões de pele arredondadas, de coloração vermelho-amarronzadas de distribuição difusa (LUKERT e ALLAN, 1999; ALLAN e ELLIS, 2000; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003a, 2003b; CHAE, 2004; SARRADELL et al., 2004; SEGALÉS,

ROSELL e DOMINGO, 2004). Outras lesões como polisserosite e pneumonias bacterianas, podem estar presentes, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico de SMDS.

1.7 LESÕES MICROSCÓPICAS

Na microscopia (Hematoxilina e Eosina – HE), as lesões histológicas localizam-se de forma regular nos tecidos linfóides (linfonodos, baço, tonsila, placas de Peyer) e pulmão, e de forma menos freqüente no rim, fígado e outros tecidos.

Nos órgãos linfóides observam-se depleção linfocitária com diminuição dos folículos linfóides e infiltração de histiócitos. Outro achado relevante para o diagnóstico é a presença de células multinucleadas e inclusões basofílicas intracitoplasmáticas principalmente nos histiócitos, as quais são patognomônicas da doença. Os pulmões apresentam pneumonia intersticial multifocal com infiltrado de histiócitos. Infiltrados macrofágicos associados aos brônquios, fibrose e bronquiolite obliterante também são observados. No rim verifica-se nefrite intersticial linfocitocitária de distribuição multifocal. O fígado caracteriza-se por infiltração linfocitocitária na zona portal com graus de intensidade variável e necrose multifocal de grupos de hepatócitos (ROSELL et al., 1999; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003a e 2003b; CHAE, 2004; SEGALÉS, ROSELL e DOMINGO, 2004; FRANÇA et al., 2005b). Em alguns casos, especialmente nos quais foi observada diarreia, é detectada a presença de colite ou enterocolite linfo-

plasma-histiocitária. Esporadicamente, são observadas lesões na glândula adrenal (adrenalite linfoplasmocitária na capa fasciculada), pâncreas (pancreatite linfocitocitária multifocal) e encéfalo (meningite fibrino-purulenta, encefalite mononuclear) (ALLAN e ELLIS, 2000; CIACCI-ZANELLA et al., 2003a; PESCADOR et al., 2003).

Em natimortos e leitões, têm sido reportado miocardite, com infiltração de macrófagos e linfócitos, fibrose e degeneração do miocárdio, algumas vezes apresentando células gigantes, além de depleção de linfócitos em órgãos linfóides (MIKAMI et al., 2005). Este tropismo do PCV-2 pelo coração é gradualmente reduzido após o nascimento.

1.8 DIAGNÓSTICO

Na literatura tem sido descritos muitos métodos de diagnóstico para identificação do PCV-2 em suínos. Em estudos sorológicos, o uso das técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) (McNAIR et al., 2004), imunocitoquímica (ICQ) (BALASCH et al., 1999; RODRÍGUEZ-ARRIOJA et al., 2000) e ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA) (McNEILLY et al., 2002; NAWAGITGUL et al., 2002) fornecem informações sobre o perfil sorológico e epidemiológico do rebanho. O isolamento viral (IV) (ELLIS et al., 1998; McNEILLY et al., 2002; KIM e CHAE, 2004) e outras técnicas, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (“Polimerase Chain Reaction” – PCR) (LIU et al., 2000;

CIACCI-ZANELLA et al., 2001; SHIBATA et al., 2003), imunohistoquímica (IHQ) (McNEILLY et al., 1999; RAMOS-VARA et al., 1999; ROSELL et al., 1999; SARLI et al., 2001; CHIANINI et al., 2003; KIM e CHAE, 2004) e hibridização *in situ* (HIS) (CHOI e CHAE, 1999; McNEILLY et al., 1999), são aplicadas para identificar a presença do agente ou de seu ácido nucléico em diferentes tecidos.

O diagnóstico definitivo da SMDS inclui três diferentes critérios: quadro clínico caracterizado por emagrecimento assim como outros sinais respiratórios e digestivos; moderada a severa lesão linfóide, consistentes com depleção linfóide e inflamação granulomatosa; e moderada ou alta quantidade de antígeno ou DNA de PCV-2 nestas lesões linfóides (SEGALÉS e DOMINGO, 2002).

1.9 CONTROLE

Uma vez que não existe qualquer referência específica quanto ao tratamento da infecção pelo PCV-2, as ações devem concentrar-se em medidas preventivas. A minimização dos fatores de risco ainda é a melhor forma de controle da enfermidade (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). O rápido diagnóstico e a remoção dos animais doentes, combinado com boas práticas de manejo, diminui os prejuízos causados pela SMDS (ALLAN e ELLIS, 2000; CIACCI-ZANELLA, GAVA e MORÉS, 2005; GAVA et al., 2005a). Assim, boas medidas de limpeza e desinfecção, qualidade do ar e boa nutrição, redução de fatores estressantes como a mistura de animais, alta

densidade e castração, ajudam a diminuir a pressão de infecção (ROSE et al., 2003).

Embora a soroterapia não possa ser utilizada em escala comercial, ela tem sido demonstrada útil no controle da doença em granjas, principalmente onde a taxa de mortalidade encontrava-se elevada (BORDIN et al., 2004).

As medidas na prevenção da SMDS também envolvem o uso de vacinas, no qual vários tipos têm sido descritos experimentalmente, como a vacina de DNA, vacinas de subunidades da ORF1 e ORF2 do PCV-2 (BLANCHARD et al., 2003), e vacinas recombinantes (FENAUX et al., 2004; JU et al., 2005). Entretanto, não existe ainda nenhuma vacina comercial disponível.

2. OBJETIVOS

1- Padronizar uma Técnica de Imunocitoquímica para pesquisa de anticorpos contra o PCV-2 em soro suíno.

2- Padronizar uma Técnica de Imunohistoquímica para a demonstração do PCV-2 em diferentes tecidos de suínos fixados em formalina tamponada 10% e incluídos em parafina.

3- Verificar a transmissão via sêmen do PCV-2 e sua capacidade infecciosa para a fêmea e para a progênie.

4- Verificar quais órgãos abrigam o PCV-2 através da técnica de “nested-PCR” (reação interna) a partir de tecidos de machos suínos, filhos de pai soropositivo e mães soronegativas, relacionando as possíveis lesões histológicas com os resultados da IHQ e ICQ.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)

3.1.1 Técnica de imunocitoquímica

A padronização da técnica de ICQ para demonstração de anticorpos contra o PCV-2 seguiu a metodologia descrita nos trabalhos de Balasch et al. (1999) e Rodríguez-Arriola et al. (2000), com modificações.

3.1.2 Cultivo celular

Células da linhagem ST (testículo de suíno) e VERO (rim de macaco africano - *Cercopithecus aethiops*), respectivamente na 38^a e 51^a passagens, negativas para PCV-1 e PCV-2 pela técnica de “nested-PCR”, foram inicialmente cultivadas em garrafas com área de crescimento de 25 cm². Para as células ST foi utilizado o meio RPMI (Gibco BRL) e, para as células VERO, o meio F10-199 (Cultilab), ambos suplementados com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), antibióticos

(gentamicina 0,2%, neomicina 0,1%) e antifúngico (fungizon 0,2%). As garrafas foram mantidas em estufa à temperatura de 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂.

3.1.3 Isolamento e inoculação viral

Metade das garrafas de cada linhagem celular (ST e VERO) foram inoculadas com PCV-2 isolado de pool de órgãos (linfonodos, pulmão e tonsila) de suíno positivo para PCV-2 pela técnica de “nested-PCR”. Os órgãos do suíno onde foi identificado o PCV-2 foram retirados do estoque a -70°C, e fragmento destes tecidos, pesando aproximadamente um grama, foram macerados e homogeneizados em 5 ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,2-7,4, contendo cinco vezes a concentração em uso de penicilina (100 UI/ml), neomicina (14 mg/ml) e anfotericina B (1 mg/ml). A suspensão foi centrifugada a 10000 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos a 4°C e o *pellet* desprezado. O sobrenadante, após ter sido filtrado em membrana estéril de 0,22 µm, foi então inoculado na metade das garrafas de cultivo celular, contendo as duas linhagens celulares. Os cultivos celulares foram incubados a 37°C por uma hora para adsorção do vírus. Em seguida, foi adicionado o meio correspondente, associado ao SFB, antibióticos e antifúngico, cultivados a 37°C por 24 horas. A outra metade das garrafas de cada linhagem permaneceu sem a inoculação do vírus para o controle da técnica.

3.1.4 Preparação e fixação da monocamada de células

Após três passagens virais (a cada 48 horas cada uma), o meio das garrafas foi retirado, as células foram tripsinizadas com solução tripsina 2,5% + versene 10% em PBS, e distribuídas em placas de cultivo de 96 poços, na quantidade de $3,5 \times 10^6$ ml/placa. Cada placa foi dividida em duas partes. Metade continha células controle livres de PCV-2 e a outra metade continha células inoculadas com PCV-2, previamente testadas por “nested-PCR”. Após 24 horas de incubação a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂, o meio foi removido das placas e descartado em solução de hipoclorito de sódio 3%. Em seguida, as células foram lavadas com TBS 0,05% Tween 20 pH 7,6 e fixadas com metanol 100%, (100 µl/poço). Após a secagem, as placas foram armazenadas em sacos plásticos à temperatura -20 °C até o momento da realização dos testes.

3.1.5 Bloqueio da monocamada de células

Para realização do teste, as placas foram primeiramente estabilizadas a 37 °C. O bloqueio, com intuito de minimizar as reações inespecíficas, foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% em água destilada por 10 minutos. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com TBS 0,05% Tween 20 e foi acrescentado 100 µl por poço de soro normal de coelho 10% ou leite em pó 5%, por 1 hora a 37 °C seguido por tripla lavagem.

3.1.6 Anticorpos primário e secundário

Como controle positivo foram testados 2 tipos de anticorpo primário: anticorpo policlonal anti PCV-2 produzido em coelho (cedido por David Driemeier - UFRGS), e anticorpo policlonal anti PCV-2 produzido em suíno (VRMD, Inc. 211-P-PCR), ambos foram utilizados nas diluições de 1:50, 1:100, 1:150 e 1:200.

Para controle negativo utilizou-se TBS no lugar do anticorpo primário, soro de suíno SPF livre de PCV-1 e PCV-2, proveniente do rebanho suíno SPF da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC, além de células não inoculadas com PCV-2.

A incubação das células com os diferentes anticorpos primários foi realizada durante a noite a 4 °C, em câmara úmida, seguido novamente por tripla lavagem.

A seguir, conjugado anti IgG de coelho com peroxidase (Sigma, A-6154) foi adicionado nas diluições 1:100, 1:150, 1:300 e 1:600, sob as diferentes combinações do anticorpo primário produzido em coelho. O conjugado anti IgG de suíno com peroxidase (Sigma, A-7042), foi utilizado nas mesmas diluições anteriores, nas placas onde foi utilizado o anticorpo primário produzido em suíno. Após a adição do conjugado, as placas foram incubadas a 37 °C em câmara úmida durante 1 hora e lavadas em seguida.

3.1.7 Revelação e contracoloração

A solução do substrato foi previamente preparada dissolvendo-se 20 mg de 3-amino-9-dietilcarbazol (AEC) (Sigma, A-5754) em 2,5 ml de dimetilformamida. A solução foi alíquotada e estocada a 4 °C.

Imediatamente antes do uso, acrescentou-se 500 µl da solução estoque de AEC em 9,5 ml de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0 e 100 µl de peróxido de hidrogênio 3% em água destilada. Aplicou-se 100 µl da solução em cada poço da placa, incubando-se por 5 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com água destilada e após aplicou-se 100 µl/poço de hematoxilina de Mayer por 2 minutos, seguida por tripla lavagem em água destilada.

3.1.8 Leitura e interpretação

A leitura das placas foi realizada em microscópio óptico de luz invertido. Para interpretação do teste, os resultados sorológicos foram classificados em negativos ou reativos (fortemente positivos: +++, moderadamente positivos: ++ e fracamente positivos: +), de acordo com a diluição.

3.2 PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

3.2.1 Técnica de imunohistoquímica

A padronização da técnica de IHQ para demonstração de antígeno de PCV-2 seguiu a metodologia descrita nos trabalhos de Sarli et al. (2001) e Chianini et al. (2003), com modificações.

3.2.2 Tecidos positivos e negativos

Para a padronização do teste de IHQ foram utilizadas amostras de tecidos (linfonodo, pulmão, fígado, timo, rim e intestino) de suínos com lesões microscópicas sugestivas de circovirose e positivos para PCV-2 pela técnica de “nested-PCR”. Como controle negativo utilizou-se linfonodos de animais SPF, livres de PCV-1 e PCV-2 pela técnica de “nested-PCR”, provenientes da Embrapa Suínos e Aves.

3.2.3 Preparação das lâminas

Primeiramente, as lâminas foram limpas com solução álcool-ácido (etanol 70% com 1% HCl), sendo deixadas de molho nesta solução por 12 horas. Após, foram secas em estufa a 60°C e imersas em solução de poly-L-lisina (Sigma P-8920) 10% em água destilada por 5 minutos e secas em estufa a 60°C.

As lâminas de vidro revestidas com poly-L-lisina, contendo os cortes histológicos seccionados em 2 µm, foram colocadas em estufa a 60°C por 20 minutos e desparafinadas em dois banhos de xilol por 10 minutos em cada um.

3.2.4 Reidratação

Em seguida, os cortes foram reidratados em soluções de álcool etílico com concentração decrescente (100%, 90%, 80% e 70%), por 5 minutos em cada concentração. Essa etapa foi finalizada por lavagem por 5 minutos em TBS 0,05%

Tween 20 pH 7,6, sucedida por drenagem e secagem das bordas dos cortes histológicos.

3.2.5 Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena

Para recuperação antigênica foram testados quatro protocolos: proteinase K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), tripsina 1%, pepsina 0,04% em HCl 0,01N, todos por 10 minutos em quantidade suficiente para cobrir os tecidos; e microondas (submersas em tampão citrato 10mM, pH 6,0, por 2 ciclos de 5 minutos em potência 700W). Em seguida, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em solução TBS 0,05% Tween 20.

Após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, através da imersão das lâminas, durante 5 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio 3%, seguido novamente por lavagem por 5 minutos e secagem das lâminas.

3.2.6 Anticorpos primário e secundário

Como anticorpo primário utilizou-se um anticorpo monoclonal anti PCV-2 específico para a ORF2, produzido em camundongo (cedido por Fernando Osório, University of Nebraska, EUA), nas diluições 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 e 1:250, e anticorpo policlonal anti PCV-2, produzido em coelho (cedido por David Driemeier - UFRGS), testado nas diluições 1:800, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500 e 1:3000. Todos os tecidos foram testados em duplicata, na qual uma lâmina continha o anticorpo primário e a outra TBS no lugar do anticorpo. As lâminas foram incubadas

em câmara úmida a 37°C durante uma hora e meia. Após a incubação, os tecidos foram lavados em TBS 0,05% Tween 20, seguido por drenagem e secagem.

Para coloração dos tecidos foi utilizado o Kit “ExtrAvidin Peroxidase Staining[®]” (Sigma E-8386) anti IgG de coelho, onde utilizou-se anticorpo policlonal e anti IgG de camundongo onde utilizou-se anticorpo monoclonal. O anticorpo secundário biotinizado foi utilizado na diluição 1:15 e a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois da lavagem e secagem, os cortes foram incubados com o conjugado com extravidina-peroxidase na diluição 1:15 por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Os mesmos procedimentos de lavagem e secagem foram realizados como descrito em etapas anteriores.

3.2.7 Revelação e contracoloração

Dois protocolos foram testados:

- AEC: A solução estoque foi previamente preparada dissolvendo-se 20 mg de AEC (Sigma, A-5754) em 2,5 ml de dimetilformamida. A solução foi alíquotada e estocada a 4°C.

Imediatamente antes do uso, acrescentou-se 100 µl da solução estoque de AEC em 1,9 ml de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0 e 20 µl de peróxido de hidrogênio 3% em água destilada. Os tecidos foram cobertos com a solução e a reação foi monitorada em microscópio ótico. Após, os cortes foram lavados em água destilada por 5 minutos e, em seguida, contracorados com hematoxilina de Mayer por 2 minutos e novamente lavados em água destilada durante 5 minutos. As lâminas foram montadas com solução gelatina-glicerol.

- DAB: A solução de tetra-hidrocloreto de 3,5-diamino-benzidina (DAB) (Vector, Peroxidase Substrat Kit DAB) foi misturada imediatamente antes do uso de acordo com a recomendação do fabricante, em 2,5 ml de água destilada. Quantidade suficiente da solução foi acrescentada para cobrir os tecidos e a reação foi monitorada em microscópio ótico. Os cortes foram lavados em água destilada por 5 minutos e, em seguida, contracorados com hematoxilina de Harris por 1 minuto e novamente lavados em água destilada durante 5 minutos. Após, as lâminas foram desidratadas rapidamente em soluções com concentração crescente de álcool etílico (80%, 90% e 100%) e montadas com Entellan.

3.2.8 Leitura e interpretação

A leitura do teste foi feita em microscópio ótico em diversas objetivas, avaliando-se detalhes da morfologia celular, presença e distribuição do antígeno.

Para se obter um padrão de interpretação foram adotados os seguintes parâmetros: reação negativa (-), ausência de antígeno viral, ausência de marcação; reação positiva fraca (+), quantidade mínima do antígeno viral, marcação em menos de 25% do tecido; reação positiva moderada (++) , quantidade moderada de antígeno viral, marcação entre 25 a 50% do tecido; reação positiva forte (+++), quantidade abundante do antígeno viral, marcação em mais de 50% do tecido.

3.3 ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

3.3.1 Realização do experimento

O experimento foi conduzido na Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC, no Complexo de Sanidade Animal, setores de Virologia e Histopatologia. O resumo das etapas e animais participantes do experimento está evidenciado na figura 1.

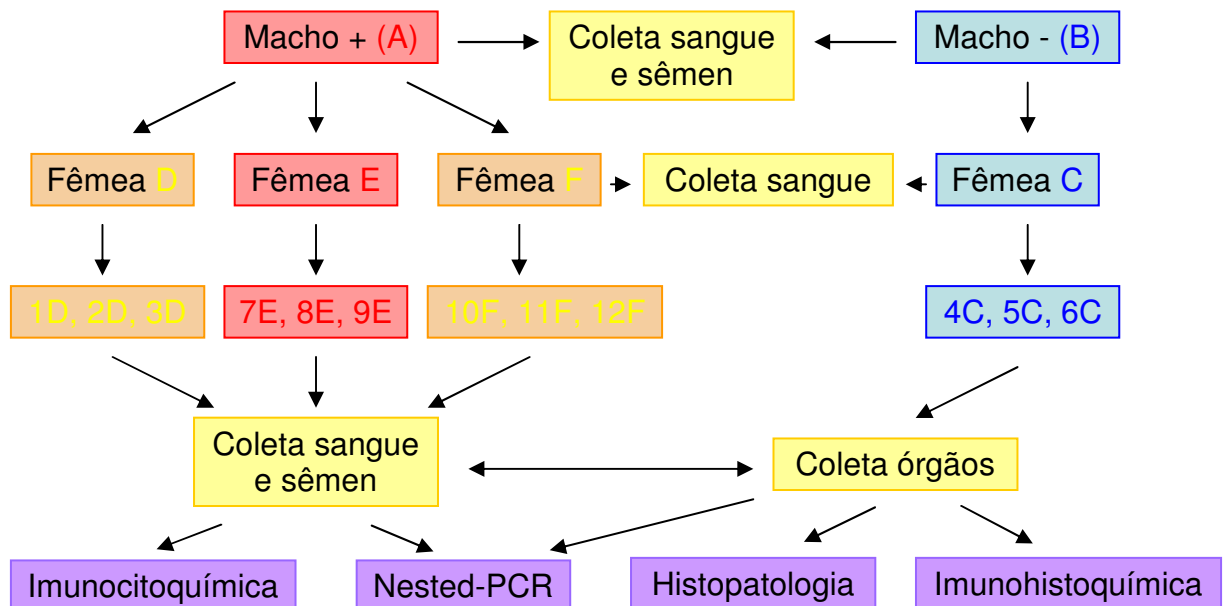


Figura 1- Organograma esquemático das etapas e animais participantes do experimento.

3.3.2 Exames, seleção e monitoramento das fêmeas (mães) e machos (pais)

Amostras de sêmen de diversos suínos foram obtidas por colheita manual, centrifugadas a 12.000 rpm por 30 segundos. O DNA viral foi extraído e purificado do fluido seminal (sobrenadante) pelo método da DNAzol®, conforme orientações do

fabricante (Invitrogen). O diagnóstico virológico foi realizado através da técnica de “nested-PCR” utilizando uma seqüência de primers específica para ampliar a seqüência da ORF2 do PCV-2 (KIM et al., 2001).

A partir do resultado, quatro suínos foram selecionados, sendo um macho positivo (MS 60) e três negativos (MS 60) para PCV-2 por “nested-PCR”, destinados à cobertura de vinte fêmeas negativas para PCV-2 (Landrace), provenientes do Sistema de Produção de Suínos (SPS) da Embrapa Suínos e Aves. Destas fêmeas, dez foram inseminadas com sêmen negativo para PCV-2 (controle) e dez fêmeas foram inseminadas com sêmen de macho positivo para PCV-2. Cabe salientar que, apesar de positivo para PCV-2, o macho selecionado encontrava-se em boas condições sanitárias e não apresentava manifestação clínica da doença. Todos os suínos envolvidos no experimento eram soronegativos para doença de Aujeszky e PPV.

Cinco dias antes das coberturas, foi realizada a coleta de sangue dos machos e das fêmeas e coleta de sêmen dos machos para detecção do PCV-2 por “nested-PCR”. Foram realizadas mais quatro coletas de sangue nas fêmeas (15, 30, 45 dias de gestação e uma semana após o parto), além de monitoramento diário dos animais. De acordo com o resultado destes exames, foram selecionadas quatro fêmeas (C- soronegativa coberta com sêmen negativo, D- soronegativa coberta com sêmen positivo, E- soropositiva a partir da 2ª coleta coberta com sêmen positivo, F- soronegativa coberta com sêmen positivo), das vinte previamente inseminadas.

3.3.3 Exames, seleção e monitoramento dos leitões (filhos)

Após o parto, foram selecionados três leitões do sexo masculino de cada uma das quatro fêmeas escolhidas, totalizando 12 leitões (1D, 2D, 3D, 4C, 5C, 6C, 7E, 8E, 9E, 10F, 11F, 12F), os quais foram separados da mãe após mamar o colostro. Destes leitões, três eram filhos de pai positivo (A) no sêmen e soro e mãe positiva (E) no soro a partir da 2ª coleta (7E, 8E, 9E), seis eram filhos de pai positivo (A) no sêmen e soro e mãe negativa (D e F) no soro (1D, 2D, 3D, 10F, 11F, 12F) e três eram filhos de pai negativo (B) no sêmen e soro e mãe negativa (C) no soro (4C, 5C, 6C), os quais funcionaram como animais sentinelas (Tabela 1). Os leitões foram alojados em salas de isolamento compostas de aberturas protegidas por tela, piso de cimento, comedouro e bebedouro. Os suínos filhos das fêmeas D, E e F ficaram alojados em uma sala, no qual os suínos da mesma leitegada encontravam-se na mesma baia, separados dos demais suínos por um muro de concreto e uma baia vazia entre cada grupo. Os suínos filhos da fêmea C foram alojados em uma baia, numa sala separada dos demais suínos.

Tabela 1- Descrição dos suínos participantes do experimento (pais, mães e filhos), de acordo com o resultado obtido por “nested-PCR” para PCV-2.

FÊMEAS (MÃES)	RESULTADOS “nested-PCR”	
	MACHOS (PAIS)	FILHOS
C (negativa)	B (negativo)	4C, 5C, 6C
D (negativa)	A (positivo)	1D, 2D, 3D
E (positiva 2ª coleta)	A (positivo)	7E, 8E, 9E
F (negativa)	A (positivo)	10F, 11F, 12F

Assim que os suínos atingiram a maturidade sexual (ao redor dos seis meses de idade), foram realizadas duas coletas de sêmen de cada animal, bem como coleta de sangue, além de monitoramento diário dos animais. As amostras de

sangue sem anticoagulante foram centrifugadas, e o soro armazenado a -80°C para teste por ICQ e por “nested-PCR”. As amostras de sêmen também foram centrifugadas e avaliadas por “nested-PCR”. Ao completarem nove meses de idade, os doze animais foram eutanasiados conforme o seguinte protocolo: sedação com xilazina 10% (2mg/Kg via intramuscular), anestesia com tiopental sódico 5% (20mg/Kg via intramuscular) e finalmente, cloreto de potássio ($2\mu\text{mol/Kg}$ via endovenosa) (AVMA, 2001). Amostras de diversos órgãos foram coletadas como: tonsila, traquéia, coração, pulmão, fígado, baço, pâncreas, linfonodos (parotídeo, mediastínico, mesentérico e inguinal), estômago, intestino delgado, rim, ureter, bexiga, pênis (proximal e distal), testículo, epidídimo (proximal, medial e distal), próstata, glândula bulbouretral, músculo da glândula bulbouretral, vesícula seminal, canal deferente e medula óssea. Uma parte de cada amostra foi acondicionada em saco plástico e em seguida congelada a -80°C para realização de “nested-PCR” e outra parte, fixada em formol 10%, destinada para histopatologia (HE e IHQ).

3.3.4 Reação em cadeia da polimerase

As amostras coletadas, após maceradas, foram digeridas com proteinase K (Invitrogen) por 4 horas a 56°C , seguida por extração do DNA viral com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3M pH 5,2 e etanol 100% gelado, permanecendo 12 horas a -20°C . Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o *pellet* lavado com etanol 75% gelado. O DNA viral foi ressuscitado em TE (Tris 100 mM; EDTA 10 mM pH 8,0) (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

A reação “outer-PCR” (externa) foi realizada com um par de iniciadores nas posições 771-797 (5' -GGT GGA ACT GTA CCT TTT TTG GCC CGC-3') e 1304-1282 (5' -CTC CTC CCG CCA TAC AAT CCC CC-3'), que amplificou um produto de 481 pb. A partir deste produto procedeu-se a reação “nested-PCR” (interna), utilizando um par de iniciadores nas posições 831-859 (5' -GAA TGG TAC TCC TCA ACT GCT GTC CCA GC -3') e 1268-1242 (5' -CCA CTC CCG TTA ATT CAC ACC CAA ACC-3'), que amplificou um produto final de 225 pb, contido no fragmento anteriormente amplificado. Ambas as reações abrangeram uma fase de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, num total de 35 ciclos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% e a visualização dos fragmentos foi realizada por transiluminação do gel em luz ultravioleta. O peso molecular do fragmento amplificado foi comparado com um marcador de peso molecular de 100 pb disposto no gel juntamente com as amostras e com os controles positivo e negativo da reação.

3.3.5 Histopatologia

Após a fixação em formalina tamponada 10%, os fragmentos de órgãos foram processados em equipamento histotécnico automático, seguindo as etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados a 4 µm de espessura, corados pela técnica de HE (LUNA, 1968) e observados em microscópio ótico.

3.3.6 Imunohistoquímica

As amostras dos diversos tecidos foram submetidas à técnica de IHQ como descrita no item 3.2, só que utilizando como soro primário o anticorpo policlonal anti PCV-2 produzido em coelho e revelação com DAB.

3.3.7 Imunocitoquímica

As amostras de soro foram submetidas à técnica de ICQ como descrita no item 3.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)

Os dois tipos de cultivo celulares (ST e VERO) mostraram-se suscetíveis à inoculação pelo PCV-2, com partículas virais visualizadas no núcleo e no citoplasma das células infectadas, e nenhum efeito citopático foi observado. Rodríguez-Arriola et al. (2000), também verificaram a presença viral principalmente no núcleo, e em menor quantidade no citoplasma. A presença de PCV-2 no citoplasma indica a suscetibilidade da cultura à infecção viral. Contudo, a replicação viral só é determinada com a demonstração do vírus no núcleo das células e a produção da infecção, através da passagem celular, com subsequente titulação viral (ALLAN et al., 1994). De acordo com Allan et al. (1994) todos os cultivos celulares (primário, semi-contínuo e contínuo) derivados de suíno (rim, pulmão e testículo) e células VERO são suscetíveis à infecção pelo PCV-2, podendo-se detectar o vírus em grande quantidade tanto no núcleo quanto no citoplasma após a segunda passagem. Em células de bovino e ovino somente identificou-se vírus no citoplasma após a segunda passagem, porém numa quantidade bem menor. Entretanto, em células HEP (fígado humano) e HELA (fibroblasto humano), identificou-se o vírus

somente no citoplasma, em baixa quantidade e só na primeira passagem. Células de galinha (fibroblasto e fígado) não foram suscetíveis à infecção.

Quanto à fixação da monocamada, o metanol 100% foi eficiente na promoção da adesão celular. Ao comparar diferentes protocolos de ICQ, McNair et al. (2004) verificaram que a fixação das células com acetona apresentou uma coloração não específica, resultando em falso positivo. Já a fixação com paraformolaldeído e também em álcool etílico expressaram os melhores resultados, com redução da coloração inespecífica. O uso somente de paraformolaldeído aumentou os títulos sorológicos, superestimando os valores, além de ser mais tóxico que os demais fixadores.

Com relação aos anticorpos primários utilizados, os dois mostraram-se eficientes na detecção de anticorpos contra o PCV-2. A diluição ideal para ambos e também para o anticorpo secundário foi de 1:100. Verificou-se que nas diluições menores de 1:100, ambos os anticorpos testados apresentavam coloração de fundo muito intensa; e que diluições maiores de 1:100 determinaram fraca coloração celular. As demais diluições testadas dificultaram a leitura e interpretação dos resultados.

O controle positivo (células ST e VERO infectadas pelo PCV-2) revelou células coradas de vermelho no núcleo e citoplasma, caracterizando uma reação fortemente positiva (+++) (Figura 2 - A e B). O controle negativo com TBS, soro suíno SPF e as células não inoculadas com PCV-2 mostraram cor azulada em decorrência da coloração pela hematoxilina de Mayer, caracterizando a reação negativa (-) (Figura 2 - C e D).

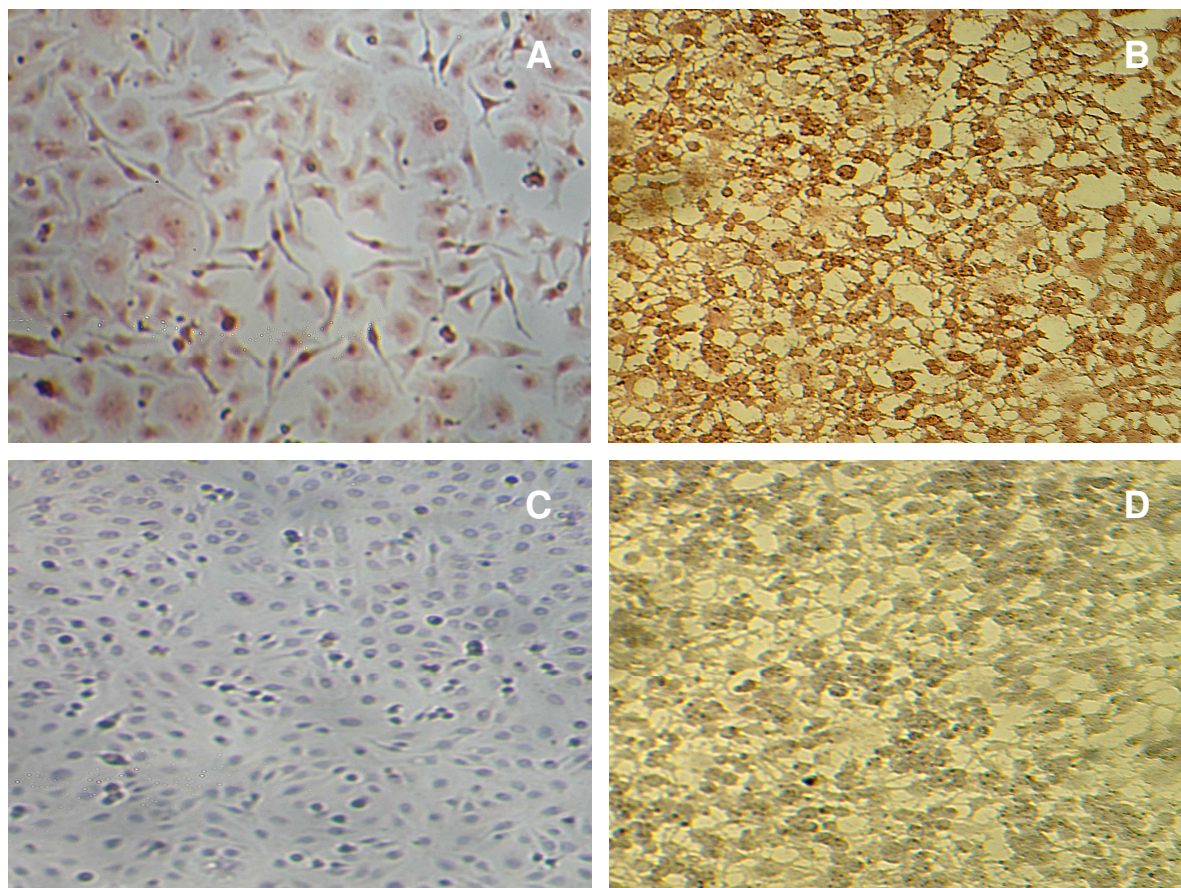


Figura 2- Monocamada de células. **A:** Células ST positivas. **B:** Células VERO positivas. **C:** Células ST negativas. **D:** Células VERO negativas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa (2005), entretanto neste trabalho foram utilizadas células PK-15 e indução com D-glucosamina. No presente estudo, contudo, fez-se uso de outras linhagens celulares e, de acordo com Fernandes et al. (2003a), o tratamento com D-glucosamina como indutora de ciclo celular não deve ser empregada neste tipo de célula (ST e VERO), pois a mesma provoca significativa degeneração e morte celular. Da mesma forma, Tischer et al. (1987) e Allan e Ellis (2000), observaram que o tratamento com D-glucosamina aumenta a carga viral, entretanto, deve-se ter cuidado com este procedimento devido à sua toxicidade para as células.

Técnicas como IV, IF e ICQ exigem experiência, não somente na preparação do cultivo celular, mas também na acurácia de interpretação dos resultados. Além

disto essas técnicas consomem tempo na diferenciação de coloração das placas. Por outro lado, a técnica de ELISA pode ser automatizada, o que facilita a precisão e diminui o tempo para a liberação dos resultados, apesar de parecer menos sensível do que a IF (NAWAGITGUL et al., 2002).

Assim, a importância da técnica de ICQ está relacionada à obtenção de resultados que auxiliam o entendimento do padrão de infecção dentro do rebanho, sendo possível traçar estratégias de controle e realizar estudos epidemiológicos.

4.2 PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Lesões microscópicas foram encontradas nos órgãos linfóides, pulmão, fígado, rim e intestino dos suínos afetados. Variados graus de depleção linfóide e infiltração difusa de histiócitos foram lesões características. Células multinucleadas e inclusões basofílicas intracitoplasmáticas também foram observadas.

Após analisar todas as baterias de lâminas, verificou-se que o melhor método de recuperação antigênica para PCV-2 foi obtido com o uso de tripsina 1% durante 10 minutos, pois não alterou a morfologia dos tecidos e melhorou a evidência do antígeno. A recuperação antigênica faz-se necessária, pois a fixação em formalina, o pH e a temperatura podem modificar a conformação ou constituição do antígeno, diminuindo a intensidade da reação final. Os fixadores também podem fazer com que o antígeno se associe com outras proteínas ou macromoléculas, tornando-se um obstáculo no processo de ligação antígeno-anticorpo (SRINIVASAN, SEDMAK e JEWELL, 2002; MONTERO, 2003).

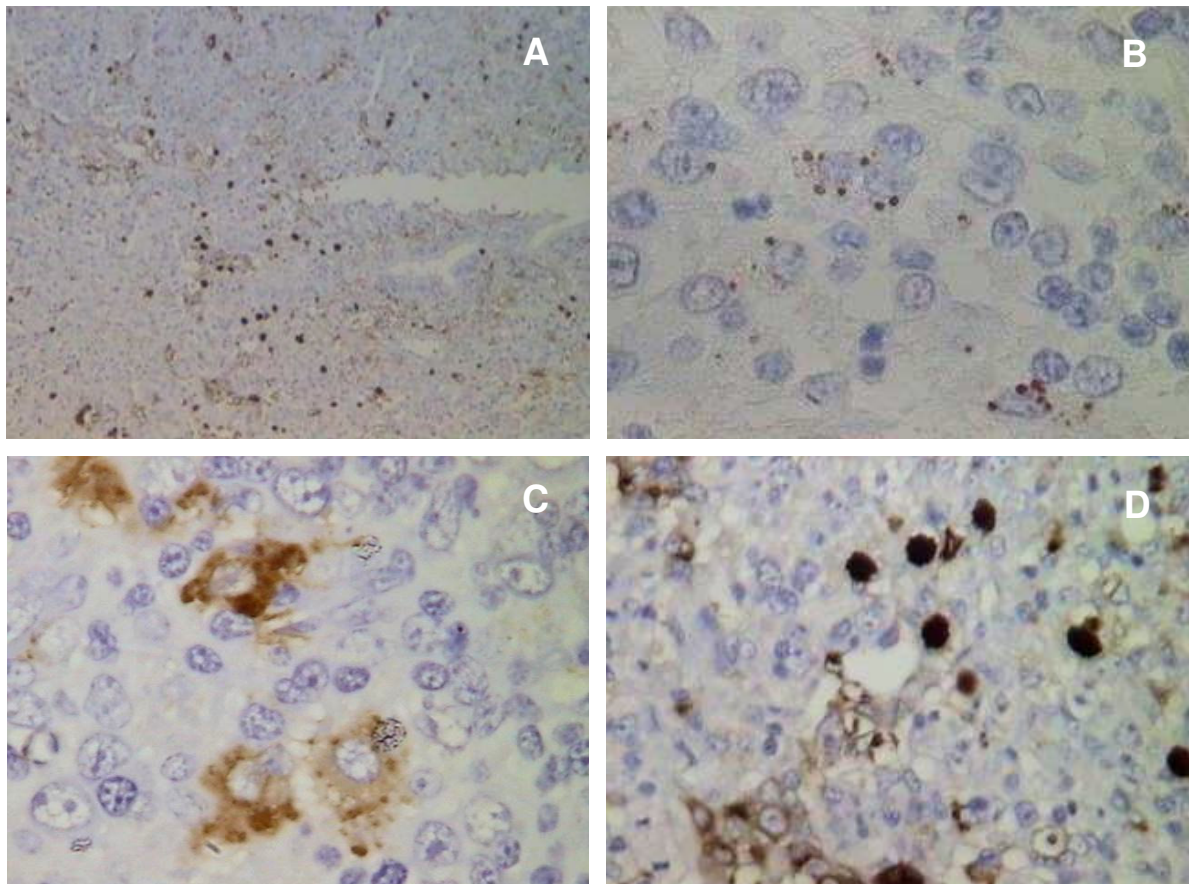
Várias diluições do anticorpo primário monoclonal e policlonal foram avaliadas, constatando-se ótima marcação quando os cortes histológicos foram

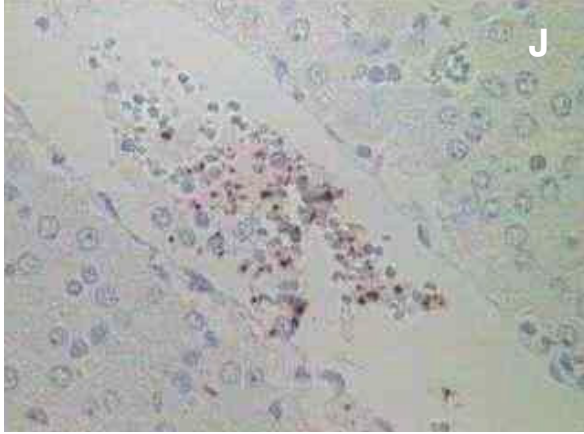
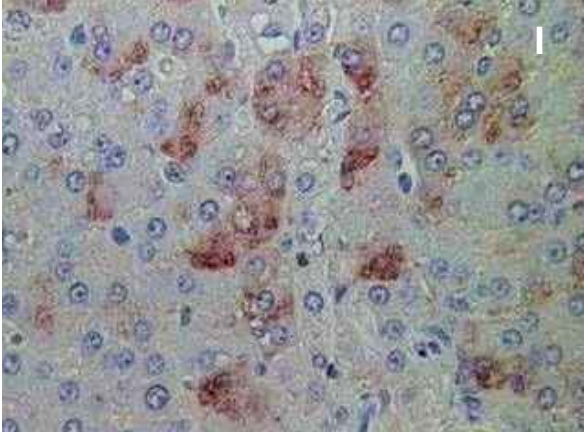
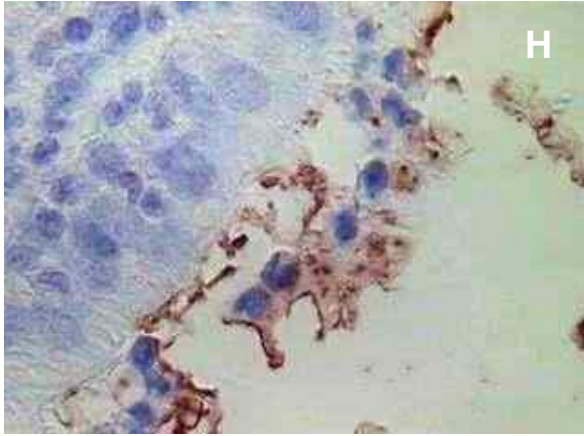
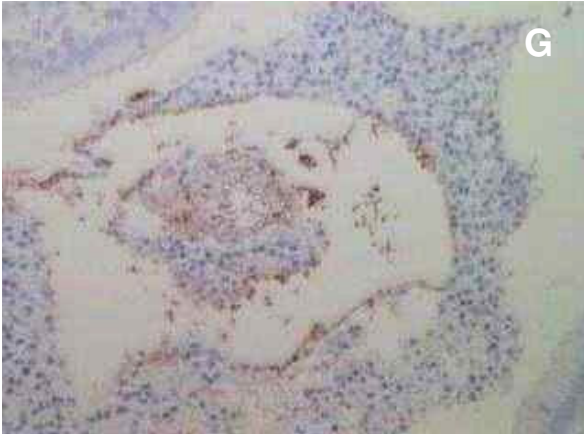
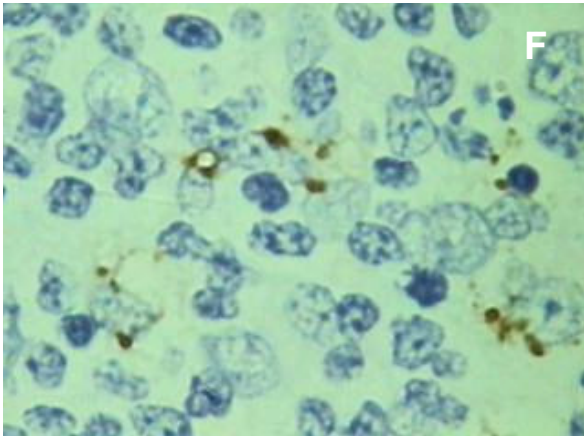
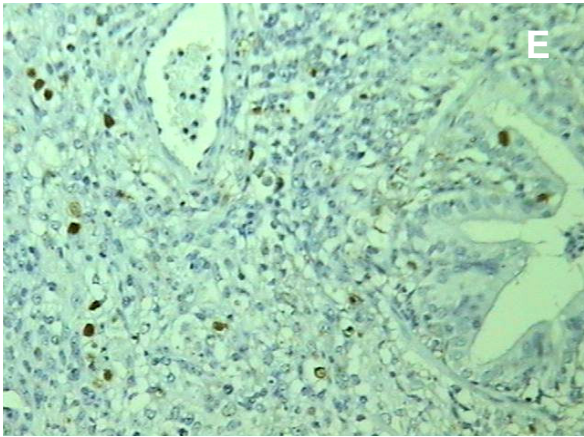
incubados nas diluições de 1:200 para o anticorpo monoclonal e 1:2000 para o anticorpo policlonal. Nas diluições inferiores foram observadas colorações de fundo muito intensa; e em diluições maiores fraca coloração celular. A IHQ, apesar de ser uma técnica sensível, possui limitação quando se utiliza um anticorpo monoclonal devido à dificuldade de produção destes anticorpos (McNEILLY et al., 2001). Ao comparar esta técnica com HIS, ambas utilizando tecidos parafinizados, a IHQ mostrou ser muito mais sensível para detectar PCV-2, entretanto a sonda utilizada na HIS era baseada na seqüência genômica do PCV-1 (McNEILLY et al., 1999).

O tempo ideal da revelação, tanto para AEC quanto para DAB, foi de 5 minutos a temperatura ambiente. Com a padronização destas etapas foi possível minimizar a coloração inespecífica e a verificação de células positivas foi aperfeiçoada.

Os cortes de tecidos positivos foram corados em vermelho quando utilizado AEC e em marrom quando utilizado DAB, variando de intensidade e local de acordo com o tecido selecionado. Em todos os órgãos, as células positivas encontravam-se nos infiltrados inflamatórios, principalmente em macrófagos, e nos corpúsculos de inclusão quando estavam presentes. No linfonodo, foi observada reação positiva tanto nas regiões foliculares quanto nas parafoliculares, afetando principalmente histiócitos e células dendríticas (Figura 3 - A, B, C e D). No pulmão destacou-se reação positiva nos histiócitos infiltrados nos septos alveolares, na mucosa de brônquios e bronquíolos e no exsudato mucocelular dos mesmos (Figura 3 - E, F, G e H), o que sugere a eliminação do vírus pela via respiratória (MAGAR et al., 2000). No fígado, as células coradas estavam dispersas por todo o lóbulo, em alguns hepatócitos, nos infiltrados no espaço interlobular, interstício e, às vezes, no interior de vasos (Figura 3 - I e J). No timo, as células positivas estavam difusamente

distribuídas, destacando-se, principalmente, nas células reticulares epiteliais e, às vezes, nos macrófagos (Figura 3 - K). Nos rins, o antígeno foi observado nas células do epitélio tubular e no infiltrado mononuclear (Figura 3 - L). No intestino, detectou-se antígeno no tecido linfóide presente (placas de Peyer) e ocasionalmente no epitélio das vilosidades (Figura 3 - M). Resultados semelhantes foram encontrados por Rosell et al. (1999) e Chianini et al. (2003). Nos controles negativos não foi observado nenhum sinal de marcação (Figura 3 - N). Cabe salientar que a diferença da intensidade de coloração nos diversos órgãos pode variar de acordo com a fase evolutiva da doença, tropismo do vírus por alguns tecidos, além da qualidade e diluição dos anti-soros usados.





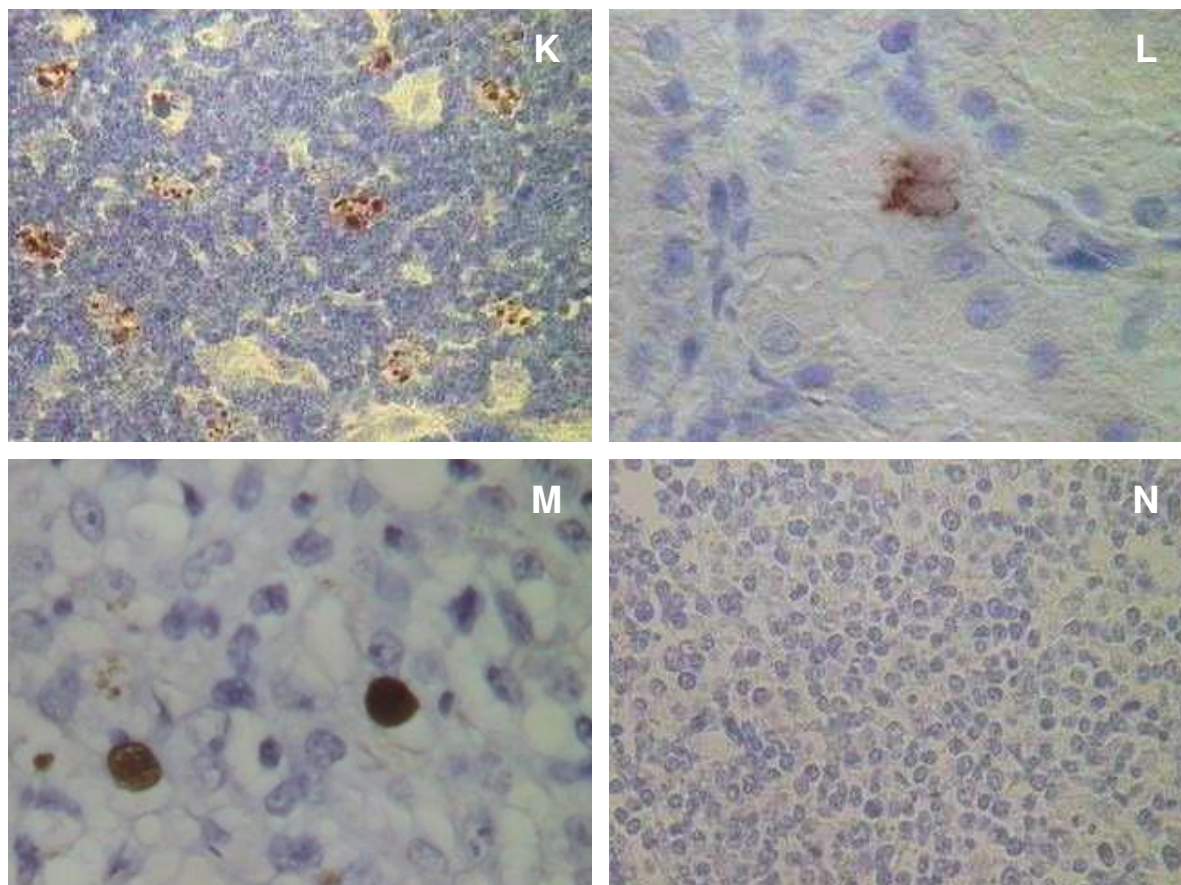


Figura 3- Diversos órgãos positivos para IHQ. **A:** Linfonodo, marcação difusa, AEC. **B:** Linfonodo, marcação ao redor membrana celular, AEC. **C:** Linfonodo, marcação ao redor membrana celular, DAB. **D:** Linfonodo, marcação difusa, DAB. **E:** Pulmão, marcação difusa, DAB. **F:** Pulmão, marcação em infiltrado inflamatório, DAB. **G:** Pulmão, marcação no infiltrado mucocelular no interior do brônquio, AEC. **H:** Pulmão, marcação na mucosa de brônquios, AEC. **I:** Fígado, marcação difusa por todo o lóbulo, AEC. **J:** Fígado, marcação no interior de vaso, AEC. **K:** Timo, marcação difusa, principalmente em células reticulares epiteliais, AEC. **L:** Rim. Marcação de célula do epitélio tubular, AEC. **M:** Intestino. Marcação no tecido linfóide (placa de Peyer), DAB. **N:** Linfonodo negativo, ausência de marcação.

McNeilly et al. (2001) e Gilpin et al. (2003), verificaram que anticorpos monoclonais para a ORF1 do PCV-2 coram principalmente o núcleo celular e para a ORF2 coram tanto núcleo quanto citoplasma. Allan e Ellis (2000) e Ciacci-Zanella e Morés (2003), verificaram também que as células infectadas com PCV-2 coram tanto o núcleo quanto o citoplasma. Chang et al. (2005), observaram a presença de antígeno viral e DNA viral em macrófagos alveolares e células dendríticas derivadas de monócitos ou medula óssea, principalmente no citoplasma. Ellis et al. (1998); (1999) e Krakowka et al. (2002); (2005), verificaram que o vírus está

preferencialmente distribuído nos histiócitos, monócitos, macrófagos, células gigantes e outros tipos celulares. Ácido nucléico ou antígeno de PCV-2 são usualmente encontrados no citoplasma de histiócitos, células multinucleadas, macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas de tecido linfóide. Esporadicamente, também são detectados no citoplasma do epitélio renal e respiratório, endotélio vascular e linfócitos e no núcleo de linhagens celulares macrófago/monócito, células musculares, hepatócitos e enterócitos (SEGALÉS, ROSELL e DOMINGO, 2004). Gilpin et al. (2003), sugerem que a atividade fagocítica dos macrófagos é amplamente responsável pela presença do vírus no citoplasma. Todavia, Rossel et al. (1999), sugerem que a grande quantidade de vírus encontrada nos macrófagos em animais doentes pode ser resultado do acúmulo de partículas virais liberadas durante a infecção prolongada.

Vários autores (ROSELL et al., 1999; DARWICH et al., 2002; CHIANINI et al., 2003), mostraram que há uma correlação positiva entre a quantidade de vírus ou material genético detectado nos tecidos e a severidade da depleção linfóide, e que o grau de depleção linfóide está diretamente associado ao estágio da infecção.

Além disto, a IHQ é extremamente útil em estudos retrospectivos, a fim de determinar a quanto tempo um novo vírus identificado está associado à doença clínica (McNEILLY et al., 1999; MORI et al., 2000; KIATIPATTANASAKULBANLUNARA et al., 2002; RODRÍGUEZ-ARRIOJA et al., 2003; GRIERSON et al., 2004; STAEBLER et al., 2005).

4.3 ESTUDO DO PAPEL DO MACHO NA EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

Todas as fêmeas (mães) mostraram-se negativas em todas as coletas para a presença do DNA viral do PCV-2, pela técnica de “nested-PCR” realizada a partir de amostras de sangue, com exceção de uma fêmea (E), que se tornou positiva ao redor dos 15 dias de gestação, conforme verificado na segunda coleta de sangue após a cobertura. Esta fêmea pode ter sido contaminada pelo sêmen ou por alguma das outras vias de contágio citadas anteriormente. Os machos negativos identificados no início do experimento também permaneceram negativos após a análise de todas as amostras de sêmen e soro coletados. O macho selecionado como positivo para PCV-2 (A), foi positivo em todas as coletas de soro e sêmen. Todavia, todos os animais estiveram clinicamente sadios durante todo o experimento. Durante o parto das fêmeas, não foi observada a ocorrência de natimortos nem de fetos mumificados, ficando uma média de 11 leitões nascidos vivos por fêmea.

As amostras de soro e sêmen dos filhos, testadas por “nested-PCR”, foram todas negativas para a presença do DNA do PCV-2, durante todo o experimento, com exceção dos leitões 10F, 11F, 12F que foram positivos na última coleta de soro antes de serem sacrificados. Resultados negativos no sêmen podem ser causados possivelmente pelo DNA das células espermáticas que funcionam como inibidores da PCR, levando a resultados falso negativos (KIM et al., 2001).

Os animais foram examinados clinicamente e não apresentaram nenhuma sintomatologia característica da SMDS. Ao exame macroscópico também não foi observada nenhuma alteração patológica significativa. O fato dos animais estarem em ambiente relativamente controlado, sem estarem expostos a vários fatores do

meio, práticas de manejo, microflora exógena ou outros patógenos que poderiam ser importantes co-fatores, pode ter modificado o desenvolvimento da infecção.

Ao avaliar as amostras dos diversos órgãos por “nested-PCR” dos 12 suínos (Tabela 2), 10 dos 12 suínos foram positivos para PCV-2 em vários tecidos, amplificando um produto de 225 pb (Figura 4). Contudo, os suínos 1D e 9E foram negativos para o DNA viral em todas as amostras.

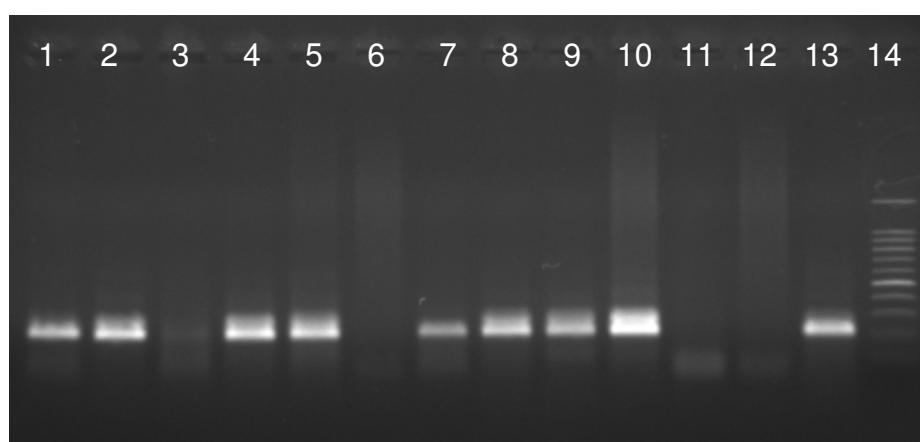


Figura 4- Amostras dos diversos órgãos do suíno 10F testadas por “nested-PCR”. 1: Pênis distal. 2: Testículo. 3: Epidídimo medial. 4: Próstata. 5: Glândula bulbouretral. 6: Músculo da glândula bulbouretral. 7: Linfonodo parotídeo. 8: Pulmão. 9: Fígado. 10: Rim. 11: Pâncreas. 12: Controle negativo. 13: Controle positivo. 14: Marcador 100 pb.

De acordo com Magar et al. (2000), o PCV-2 pode muitas vezes, ser isolado na ausência de sinais clínicos e lesões histológicas evidentes, sugerindo a ocorrência de infecção subclínica ou variação na virulência.

Amostras de tecido do trato reprodutivo como pênis (proximal e distal), epidídimo (proximal, medial e distal), testículo, próstata, vesícula seminal, glândula bulbouretral, músculo da glândula bulbouretral, além de linfonodo inguinal e prepucial resultaram positivos. Outros órgãos, como linfonodos parotídeo, mediastínico e mesentérico, baço, tonsila, intestino, traquéia, pulmão, coração, fígado, rim, medula óssea, bexiga e ureter também foram positivos em vários

animais. Os órgãos em que o DNA do PCV-2 foi verificado com maior frequência entre os suínos testados foram linfonodo parotideo (10/12), linfonodo inguinal (8/12), medula óssea (8/12), linfonodo mesentérico (7/12) e baço (7/12). Não houve detecção do DNA viral em nenhuma das amostras de pâncreas e canal deferente.

Tabela 2- Detecção de DNA de PCV-2 pela técnica de “nested-PCR” em amostras de órgãos dos 12 suínos avaliados durante o experimento.

SUÍNO AMOSTRAS	Animais positivos	1D	2D	3D	4C	5C	6C	7E	8E	9E	10F	11F	12F
Pênis proximal	1/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Pênis distal	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Testículo	2/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Epidídimo proximal	4/12	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Epidídimo medial	1/12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Epidídimo distal	4/12	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Canal deferente	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Próstata	2/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Vesícula seminal	2/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Glândula bulbouretral	3/12	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Músculo glândula bulbouretral	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ureter	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bexiga	2/12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Linfonodo prepucial	6/12	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Linfonodo inguinal	8/12	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Linfonodo parotideo	10/12	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Linfonodo mediastínico	6/12	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Linfonodo mesentérico	7/12	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Tonsila	5/12	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Traquéia	3/12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Medula óssea	8/12	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Pulmão	6/12	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Coração	5/12	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
Fígado	6/12	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Pâncreas	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	7/12	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Rim	3/12	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Intestino	4/12	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-

-: Amostra negativa

+: Amostra positiva

A variação da predileção do vírus por determinados órgãos está relacionada com a suscetibilidade do hospedeiro e/ou fatores ambientais. Apesar da técnica de PCR ser rápida, sensível e específica, esta não permite a localização nem identificação do vírus no tecido ou células, e tampouco permite fazer uma diferenciação entre suínos infectados subclínicamente dos clinicamente doentes (BRUNBORG, MOLDAL e JONASSEN, 2004). Liu et al. (2000) mostraram que os níveis de DNA presentes em animais clinicamente doentes são significativamente maiores do que em animais clinicamente saudáveis. Esta observação sugere que para o desenvolvimento da SMDS é necessária uma quantidade mínima do PCV-2.

De acordo com Bielanski et al. (2004); Bielanski, Larochele e Magar (2004) e Mateusen et al. (2004), o PCV-2 é capaz de infectar embriões suínos nos estágios de mórula e blastocisto, aumentando a suscetibilidade do embrião à infecção com o desenvolvimento embrionário. Por ser de difícil inativação, o vírus pode infectar o embrião vários dias após a inseminação nos estágios iniciais da clivagem, devido à contaminação do sêmen. Pensaert et al. (2004) e Park et al. (2005) observaram que o vírus, uma vez em contato com tecidos fetais, pode causar morte fetal, com ou sem resposta imune, dependendo da idade da gestação. Nestes fetos, o vírus coexiste com anticorpos, mas a disseminação viral intra-uterina ocorre muito lentamente, por isto nem todos os animais da leitegada são afetados, o que explica a diferente distribuição do PCV-2 em suínos da mesma leitegada (YOON et al., 2004).

Kim et al. (2003) descreveram que o DNA viral pode persistir no organismo suíno durante muito tempo após a infecção, sem manifestação de sinais clínicos. Desta forma, o vírus pode ser detectado no sangue muito tempo após a infecção. Em saliva e fezes, o período de detecção do vírus é menor (SHIBATA et al., 2003).

Este resultado sugere que a resistência individual, ou até a influência genética dos suínos (LOPÉZ-SORIA et al., 2004) talvez seja um fator provável para a não infecção de todos os animais.

Como os animais do experimento estavam separados em baias, não foram expostos diretamente a secreções como saliva, urina, fezes, mas a disseminação do vírus para o grupo sentinela pode ter ocorrido através de aerossóis, equipamentos de limpeza e/ou botas, confirmando a eliminação do vírus pelos demais animais. De acordo com Krakowka et al. (2005), suínos contaminados com o PCV-2, mas sem manifestação clínica da doença, eliminam o vírus e/ou DNA viral intermitentemente, servindo como potente fonte de infecção para outros animais, pois o mesmo é estável e pode sobreviver no ambiente por muitos meses.

Ao analisar as amostras por HE, o animal 8E apresentou no linfonodo, infiltrado histiocitário na região centro-folicular e os folículos linfóides apresentaram redução de linfoblastos. Além disto, também foi observada no coração, discreta infiltração mononuclear ao redor dos vasos sangüíneos. O suíno sentinela 6C apresentou no linfonodo, infiltrado histiocitário na região centro-folicular, formando células multinucleadas.

Dos 12 soros analisados em duplicata pela ICQ, todos foram reativos, no qual 4 foram fortemente positivos, 3 moderadamente positivos e 5 fracamente positivos, na diluição 1:100 (Tabela 3). Os controles negativos não reagiram. Estes resultados indicam que, apesar de alguns animais resultarem negativos na técnica de “nested-PCR”, em algum momento do desenvolvimento, todos os animais tiveram contato com o vírus, no qual os fatores citados anteriormente determinaram ou não a proliferação viral. Da mesma forma, estes fatores podem ter influenciado na intensidade da reação, que reflete a presença de anticorpos.

Tabela 3- Detecção de anticorpos para PCV-2 pela técnica de ICQ em amostras de soro dos 12 suínos avaliados durante o experimento.

AMOSTRAS	REAÇÕES NA IMUNOCITOQUÍMICA			
	Negativa	Positiva fraca	Positiva moderada	Positiva forte
1D				X
2D		X		
3D			X	
4C		X		
5C		X		
6C		X		
7E				X
8E			X	
9E				X
10F				X
11F		X		
12F			X	

Em geral, para o PCV-2, altos níveis de vírus infeccioso ($>10^6$ unidades infecciosas por grama de tecido) são associados com a doença clínica. Títulos abaixo de 10^5 unidades infecciosas por grama de tecido parecem ser característicos da doença subclínica (KRAKOWKA et al., 2005). Entretanto, a titulação viral é trabalhosa, e não é empregada na rotina diagnóstica. De acordo com Meerts et al. (2005), somente suínos com alto nível de PCV-2 na fase de replicação são capazes de desenvolver lesões histológicas características, enquanto que suínos com pouco vírus em fase de replicação raramente desenvolvem a doença. Da mesma forma, um importante mecanismo que contribui para a variação da replicação viral parece ser a eficiência da resposta imune adaptativa individual.

Segundo Krakowka et al. (2005), os animais podem infectar-se a partir das 4 - 6 semanas de idade, provavelmente devido ao declínio dos anticorpos maternos. Em infecção experimental, anticorpos específicos contra o PCV-2 começam a aparecer entre 10 - 14 dias após a infecção, já anticorpos neutralizantes são detectados a partir de 28 dias após a infecção (MEERTS et al., 2005). A ICQ é capaz de detectar todos os anticorpos que reagem contra o PCV-2, não discriminando entre anticorpos

neutralizantes ou não neutralizantes. Os anticorpos neutralizantes somente são detectados em testes de soroneutralização. Assim, a presença de altos títulos de anticorpos anti PCV-2 na ICQ nem sempre significa a existência de uma imunidade protetora para o hospedeiro e, a presença de antígeno nos tecidos sugere que os anticorpos provavelmente não são protetores. Krakowka et al. (2002), verificaram que vírus infeccioso pode coexistir com a presença de anticorpos, o que sugere a formação de imunocomplexos durante o curso da infecção.

O fato de que o PCV-2 é ubíquo e que a soroconversão é relativamente semelhante em animais afetados e não afetados, torna difícil o uso de técnicas sorológicas para o diagnóstico da doença.

Ao avaliar as amostras dos diversos órgãos dos 12 suínos por IHQ, 8 suínos (2D, 4C, 6C, 7E, 8E, 10F e 11F) apresentaram o antígeno viral em pelo menos 1 dos órgãos. Nos órgãos positivos, as reações variaram de positiva fraca a positiva moderada. Contudo, os suínos 1D, 3D, 5C e 12F foram negativos em todas as amostras. Os resultados estão demonstrados na Tabela 4. Amostras de tecido da glândula bulbouretral (5/12), linfonodo (5/12) e tonsila (5/12) foram os órgãos em que o PCV-2 foi verificado com maior frequência, seguido por rim (3/12), pulmão (2/12), fígado (2/12), intestino (2/12) e finalmente testículo (1/12), próstata (1/12), vesícula seminal (1/12), músculo da glândula bulbouretral (1/12) e baço (1/12). Os demais órgãos testados foram todos negativos, além dos controles negativos. Para verificar com maior precisão quais as células realmente afetadas, principalmente nos tecidos não linfóides, as diversas amostras devem ser avaliadas pela técnica de HIS.

Tabela 4- Detecção de PCV-2 pela técnica de IHQ em amostras de órgãos dos 12 suínos avaliados durante o experimento.

SUÍNO AMOSTRAS	Animais positivos	1D	2D	3D	4C	5C	6C	7E	8E	9E	10F	11F	12F
Pênis	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testículo	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Epidídimo	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canal deferente	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Próstata	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Vesícula seminal	1/12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glândula bulbouretral	5/12	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Músculo glândula bulbouretral	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ureter	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bexiga	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfonodo	5/12	-	-	-	+	-	+	-	++	-	++	+	-
Tonsila	5/12	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Traquéia	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medula óssea	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmão	2/12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Coração	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	2/12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Pâncreas	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	1/12	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rim	3/12	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Intestino	2/12	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

-: Reação negativa

+: Reação positiva fraca

++: Reação positiva moderada

+++: Reação positiva forte

Ao correlacionar os resultados obtidos nas diferentes técnicas, somente o suíno 1D foi negativo em todas as amostras, tanto pela técnica de “nested-PCR” quanto pela IHQ. Já o animal 10F foi o que apresentou o maior número de amostras positivas nas duas técnicas. Os órgãos dos suínos 6C e 8E, que apresentaram alterações histológicas, manifestaram concordância com os resultados verificados por “nested-PCR” e IHQ. Em geral, as respostas obtidas nos tecidos frente à IHQ colaboraram com os resultados por “nested-PCR” (Tabela 5 e 6).

Tabela 5- Compatibilidade entre a técnica de “nested-PCR” e IHQ na detecção de PCV-2 em amostras dos 12 suínos experimentados.

SUÍNO AMOSTRAS	TÉCNICA	1D	2D	3D	4C	5C	6C	7E	8E	9E	10F	11F	12F
Pênis	PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testículo	PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Epidídimo	PCR	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canal deferente	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Próstata	PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Vesícula seminal	PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glândula bulbouretral	PCR	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Músculo glândula bulbouretral	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ureter	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bexiga	PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linfonodo	PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	IHQ	-	-	-	+	-	+	-	++	-	++	+	-
Tonsila	PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
	IHQ	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Traquéia	PCR	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Medula óssea	PCR	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
	HQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pulmão	PCR	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Coração	PCR	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	PCR	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Pâncreas	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Baço	PCR	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	IHQ	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rim	PCR	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Intestino	PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
	IHQ	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

-: Reação negativa

+: Reação positiva (“nested-PCR”)

+: Reação positiva fraca (IHQ)

++: Reação positiva moderada (IHQ)

Tabela 6- Compatibilidade dos testes virológicos (“nested-PCR” e IHQ) e sorológico (ICQ) entre os 12 suínos experimentados.

TÉCNICA SUÍNO	“Nested-PCR”	Imunohistoquímica	Imunocitoquímica
1D	-	-	+++
2D	+	+	+
3D	+	-	++
4C	+	+	+
5C	+	-	+
6C	+	+	+
7E	+	+	+++
8E	+	++	++
9E	-	+	+++
10F	+	++	+++
11F	+	+	+
12F	+	-	++

-: Reação negativa
 +: Reação positiva (“nested-PCR”)
 +: Reação positiva fraca (IHQ e ICQ)
 ++: Reação positiva moderada (IHQ e ICQ)
 +++: Reação positiva forte (ICQ)

O fato de algumas amostras serem positivas por “nested-PCR”, mas não apresentarem lesões histológicas, nem positividade diante da IHQ, indicam que o DNA viral está presente na amostra, mas sem causar a doença (GAVA et al., 2005b). Isso também alerta que o diagnóstico da circovirose suína não pode ser baseado em uma técnica laboratorial, mas deve, além da verificação da presença do agente, reunir a existência de sinais clínicos e lesões. A presença de anticorpos contra o PCV-2 em animais clinicamente saudáveis indica que os suínos foram infectados pelo PCV-2, porém conseguiram debelar esta infecção viral. Além disso, vários autores demonstraram que apesar da presença do PCV-2 ser essencial para causar a doença, a existência de outros fatores concomitantes faz-se necessária para o desenvolvimento da SMDS.

Os resultados aqui encontrados com as diferentes técnicas utilizadas vão ao encontro dos resultados descritos por Quintana et al. (2001), Chianini et al. (2003) e Krakowka et al. (2005). Estes autores determinaram que a severidade e distribuição

das lesões histológicas estão diretamente correlacionadas com os escores atribuídos à IHQ e a quantidade de vírus presente em cada órgão. Da mesma forma, o estágio no qual a doença se encontra reflete também a presença ou ausência de lesões específicas. Entretanto, também é possível encontrar antígeno ou ácido nucléico de PCV-2 em tecidos de animais clinicamente saudáveis, e neste caso, a quantidade de vírus e a intensidade de lesões estão muito baixas ou nulas.

Chianini et al. (2003) e Krakowka et al. (2005), caracterizaram também que a infecção subclínica está definida por ausência de sinais clínicos e por mínima ou nenhuma lesão no tecido linfóide e parenquimatoso. Contudo, podem ser verificados nos linfonodos hiperplasia linfóide muito leve e alguns histiócitos, embora a hiperplasia linfóide seja mais proeminente em casos leves e moderados de circovirose. O timo apresenta mínima proliferação de histiócitos e os demais órgãos podem apresentar células inflamatórias. A infecção pré-clínica (leve) é marcada por ausência de sinais clínicos ou leve palidez e perda de peso, embora os animais permaneçam ativos. Os linfonodos apresentam intensa proliferação de histiócitos e macrófagos, depleção linfóide difusa, podendo apresentar células gigantes. O timo demonstra moderada redução da espessura da região cortical, podendo apresentar células gigantes e até corpúsculos de inclusão. No fígado, estão presentes infiltrado inflamatório mononuclear difuso e granulomas multifocais no parênquima. O pulmão caracteriza-se por pneumonia intersticial. Na doença clínica (moderada a severa), os animais apresentam sinais clínicos típicos da SMDS, com depleção linfóide sistêmica, formação de células gigantes e presença de corpúsculos de inclusão nos tecidos linfóides. A presença de infecção disseminada é evidenciada pela presença de infiltrados inflamatórios em tecidos não linfóides, principalmente no fígado, que também apresenta moderada a severa degeneração e necrose. Os pulmões

apresentam pneumonia intersticial e broncopneumonia supurativa secundária. As serosas do fígado, rim e intestino podem evidenciar inflamação fibrinopurulenta decorrente à septicemia e peritonite.

Desta maneira, a alta incidência de infecção subclínica e a estabilidade do vírus dificultam os procedimentos de diagnóstico e medidas de controle da doença. A sorologia sozinha não deve ser utilizada nem como ferramenta de diagnóstico nem como prognóstico da infecção. Similarmente, a detecção do DNA viral em amostras por “nested-PCR” pode superestimar o risco de desenvolvimento da doença, uma vez que animais subclínicamente infectados podem estar virêmicos, e também porque o DNA pode estar presente em excreções e secreções de suínos clinicamente normais. Por estas razões, para a detecção do diagnóstico definitivo da doença devem ser levados em conta a presença de lesões macroscópicas e microscópicas, associadas com a demonstração de proteína viral ou DNA viral por IHC ou HIS.

5. CONCLUSÕES

1- A técnica de ICQ, que permitiu a verificação de anticorpos anti PCV-2 em suínos, foi padronizada. Desta forma, verificou-se que o estudo sorológico é uma ferramenta auxiliar no diagnóstico, indicando que os suínos entraram em contato com o vírus. Assim, a técnica de ICQ pode ser aplicada em rebanhos para conhecer o perfil sorológico, podendo assim aplicar ações de controle frente ao desafio viral.

2- A técnica de imunohistoquímica, utilizando o Kit ExtrAvidin Peroxidase[®] para PCV-2 foi padronizada. Desta forma, ela poderá ser aplicada em diversos tecidos, como ferramenta auxiliar no diagnóstico da circovirose e também em estudos retrospectivos.

3- O DNA de PCV-2 foi amplificado por “nested-PCR” em diversos órgãos de machos suínos, filhos de cachaço positivo e mãe negativa. Estes resultados evidenciam que esta técnica é eficiente na detecção de DNA de PCV-2, levando a fortes indícios da transmissão do PCV-2 via sêmen para a leitegada, através de inseminação artificial.

4- Testes sorológicos realizados por ICQ permitiram a verificação de anticorpos anti PCV-2 em machos suínos, filhos de pai positivo e mãe negativa. Da mesma forma, a IHQ também foi capaz de detectar o antígeno viral, apesar de que o estágio subclínico da doença influenciou na presença do PCV-2 nos tecidos.

5- A associação das técnicas de “nested-PCR”, HE e IHQ, determinou que o PCV-2 está localizado em órgãos linfóides, sistêmicos e também do aparelho reprodutivo, podendo representar uma possível fonte de contaminação.

6- Para o diagnóstico definitivo da SMDS, é necessário combinar os sinais clínicos, lesões macroscópicas, microscópicas e detectar o agente (PCV-2) nos diversos órgãos por “nested-PCR” ou IHQ.

REFERÊNCIAS

ABIPECS – Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 30 jan. 2006.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: Informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

ALLAN, G.M.; PHENIX, K.V.; TODD, D.; McNULTY, M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Journal of Veterinary Medicine**. v.41, n.6, p.17-26, 1994.

ALLAN, G.M.; MEEHAN, B.; TODD, D.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; CLARK, E.G.; HARDING, J.; ESPUNA, E.; BOTNER, A.; CHARREYRE, C. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndrome. **Veterinary Record**. v.142, n.17, p.467-468, 1998.

ALLAN, G.M. e ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.12, n.1, p.3-14, 2000.

ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; BOTNER, A.; McCULLOUGH, K.; NAUWYNCK, H.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; CHARREYRE, C. PMWS: experimental model and co-infections. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.165-168, 2004.

AVMA. Report of the AVMA Panel of Euthanasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.218, n.5, p.669-696, 2001.

BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M.; MANKERTZ, A.; URNIZA, A.; PLANA-DURÁN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**. v.121, n.2, p.139-48, 1999.

BARBOSA, C.N. **Circovirus suíno-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunoistoquímica e estudos sorológicos**. 2005. 96p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

BIAGINI, P. Human circoviruses. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.95-101, 2004.

BIELANSKI, A.; LAROCHELLE, R.; ALGIRE, J.; MAGAR, R. Distribution of PCV-2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV-2 antibody-positive pigs. **Veterinary Record**. v.155, n.19, p.597-598, 2004.

BIELANSKI, A.; LAROCHELLE, R. e MAGAR, R. An attempt to render oocytes and embryos free from the porcine circovirus type 2 after experimental in vitro exposure. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.68, n.3, p.222-225, 2004.

BLANCHARD, P.; MAHE, D.; CARIOLET, R.; KERANFLEC'H, A.; BAUDOULARD, M.A.; CORDIOLI, P.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins. **Vaccine**. v.21, n.31, p.4565-4575, 2003.

BORDIN, L.C.; MORÉS, N.; CIACCI-ZANELLA, J.; MORI, A.; BARIONI JÚNIOR, W. Aplicação da soroterapia no controle da circovirose em um rebanho suíno. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2, 2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** 2004, p.451-452.

BRUNBORG, I.M.; MOLDAL, T. e 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, n.2, p.171-178, 2004.

CASTRO, A.M.M.G.; RUIZ, V.L.A.; CASTRO, Jr.F.G.; BERSANO, J.G.; MORENO, A.M.; CORTEZ, A.; VILLALOBOS, E.M.C.; LEOMIL, H.; RICHTZENHAIN, L.J. Detecção e diferenciação de circovirus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos abatidos no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003, p.107-108.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; RUIZ, V.L.A.; LEOMIL, H.; MORENO, A.M.; DOTO, D.S.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection and differentiation of porcine circovirus in Brazilian pigs. **Veterinary Record**. v.154, n.26, p.728-729, 2004.

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**. v.168, n.1, p.41-49, 2004.

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **The Veterinary Journal**. v.169, n.3, p.326-336, 2005.

CHANG, H.W.; JENG, C.R.; LIU, J.J.; LIN, T.L.; CHANG, C.C.; CHIA, M.Y.; TSAI, Y.C.; PANG, V.F. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. **Veterinary Microbiology**. v.108, n.3-4, p.167-177, 2005.

CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J.; DOMINGUÉZ, J.; DOMINGO, M. Immunohistochemical characterisation of PCV-2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.94, n.1-2, p.63-75, 2003.

CHIARELLI, O.; CASTRO, L.A.; SILVA, F.M.F.; BONFÁ, G.; SILVA JÚNIOR, A.; MORAES, M.P.; ALMEIDA, M.R. Isolation of porcine circovirus type 2 (PCV2) in animals from Espírito Santo state. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 16, 2005, Salvador. **Anais...** 2005, p.99.

CHOI, C. e CHAE, C. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**. v.121, n.3, p.265-270, 1999.

CIACCI-ZANELLA, J.R. e MORÉS, N. Síndrome multissistêmica do definhamento do leitão desmamado (SMDLD) causada pelo circovirus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Memoria...** 2000, p.16.

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

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; FERNANDES, L.T.; BASSI, S.S.; TROMBETTA, C.; SCHIOCHET, M.F. Ocorrência de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em suínos ou materiais com suspeita clínica de síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) enviados para diagnóstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003a, p.95-96.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; BASSI, S.S.; ASCOLI, K.; DAHMER, A.; ZANELLA, E.L.
Detecção de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em sêmen de suínos. In: CONGRESSO
BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003,
Goiânia. **Anais...** 2003b, p.97-98.

CIACCI-ZANELLA, J.R. e MORÉS, N. Circovirose suína. Circular técnica 37,
Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, 2003a.

CIACCI-ZANELLA, J.R. e MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic
wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo
Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.5, p.522-527, 2003b.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; ASCOLI, K.; SIMON, N.; MORÉS, N.; OLIVEIRA, S.R.;
KRAMER, B. Porcine circovirus type 2 (PCV2): a pathogenic emerging disease virus
identified in archived tissues from brazilian swine herds. In: ENCONTRO NACIONAL
DE VIROLOGIA, 15, 2004, São Pedro. **Anais...** 2004a, p.99-100.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; BASSI, S.S.; ASCOLI, K.; SIMON, N.L.; DAHMER, A.;
ZANELLA, E.L. Detecção de DNA de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em órgãos de
macho suíno. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2,
2004, Foz do Iguaçu. **Anais...** 2004b, p.456-457.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; GAVA, D. e MORÉS, N. Use of histopathology (HE) and
immunohistochemistry (IHC) to detect porcine circovirus type 2 (PCV-2) in swine

clinically sick, kept in two different environments. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 16, 2005, Salvador. **Anais...** 2005, p.101.

CLARK, E.G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 28, 1997, Quebec. **Proceedings...** 1997, p.409-501.

DAFT, B.; NORDHAUSEN, R.W.; LATIMER, K.S.; NIAGRO, F.D. Interstitial pneumonia and lymphadenopathy associated with circoviral infection in a six week-old pig. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY DIAGNOSTIC LABORATORIES, 39, 1996, Little Rock. **Proceedings...** 1996, p.32-34.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.9, n.2, p.236-242, 2002.

DARWICH, L.; SEGALÉS, J. e MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. **Archives of Virology**. v.149, n.5, p.857-874, 2004.

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Canadian Veterinary Journal**. v.39, n.1, p.44-51, 1998.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.11, n.1, p.3-14, 1999.

ELLIS, J.; CLARK, E.; HAINES, D.; WEST, K.; KRAKOWKA, S.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.159-163, 2004.

FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. **Journal of Virology**. v.78, n.12, p.6297-6303, 2004.

FERNANDES, L.T.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C. Estudo da permissibilidade de linhagens de cultivo celular à infecção por circovirus suíno tipo 2 (PCV2). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003a, p.91-92.

FERNANDES, L.T.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; TROMBETTA, C.; SCHIOCHET, M.F.; KRAMER, B.; SOBESTIANSKY, J. Estudo da transmissão horizontal de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) entre suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...2003b**, p.93.

FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F.; MORES, N.; ZANELLA, J.; DRIEMEIER, D. Surto de circovirose (síndrome multissistêmica de suínos desmamados) no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, n.1, p.39-53, 2005a.

FRANÇA, T.N.; RIBEIRO, C.T.; CUNHA, B.M.; PEIXOTO, P.V. Circovirose suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.25, n.2, p.59-72, 2005b.

GAVA, D.; MORÉS, N.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; TRIQUES, N.J.; OLIVEIRA, S.R. Estudo comparativo entre histopatologia, imunocitoquímica (ICQ) e imunohistoquímica (IHQ) em suínos infectados por circovírus suíno tipo 2 (PCV2). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12, 2005, Fortaleza. **Anais...2005a**, p.119-120.

GAVA, D.; ZANELLA, J.R.C.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in tissues by polimerase chain reaction (PCR) and by histopathology (HE) – a comparative study. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 16, 2005, Salvador. **Anais... 2005b**, p.99.

GILPIN, D.F.; McCULLOUGH, K.; MEEHAN, B.M.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; STEVENSON, L.S.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. 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, n.3-4, p.149-161, 2003.

GRASLAND, B.; LOIZEL, C.; BLANCHARD, P.; OGER, A.; NIGNOL, A.C.; BIGARRE, L.; MORVAN, H.; CARIOLET, R.; JESTIN, A. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. **Veterinary Research**. v.36, n.5-6, p.685-697, 2005.

GRIERSON, S.S.; KING, D.P.; SANDVIK, T.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; DREW, T.W.; BANKS, M. 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, 2004.

HAMEL, A.L.; LIN, L.L. e NAYAR, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**. v.72, n.6, p.5262-5267, 1998.

HARDING, J.C.S. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. In: WESTERN CANADIAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 21, 1996, Quebec. **Proceedings...** 1996, p.21.

HARDING, J.C.S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.131-135, 2004.

JU, C.; FAN, H.; TAN, Y.; LIU, Z.; XI, X.; CAO, S.; WU, B.; CHEN, H. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**. v.109, n.3-4, p.179-190, 2005.

KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**. v.122, n.1, p.9-24, 2000.

KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA, W.; TANTILERTCHAROEN, R.; SUZUKI, K.; ALBARENQUE, S.M.; THANAWONGNUWECH, R.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.64, n.5, p.449-452, 2002.

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

KIM, J.H. e 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. e CHAE, C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.16, n.1, p.45-50, 2004.

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

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; McNEILLY, F.; GILPIN, D.; MEEHAN, B.; McCULLOUGH, K.; ALLAN, G. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection. **Viral Immunology**. v.15, n.4, p.567-582, 2002.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; McNEILLY, F.; WALDNER, C.; ALLAN, G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, n.3, p.213-222, 2005.

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

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. e D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.67, n.2, p.114-120, 2003.

LIU, Q.; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L.A. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, n.9, p.3474-3477, 2000.

LIU, J.; CHEN, I. e 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.

LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; NOFRARÍAS, M.; CALSAMIGLIA, M.; RAMIREZ, H.; MINGUEZ, A.; SERRANO, I.M.; MARIN, O.; CALLEN, A. Genetic influence on the expression of PCV disease. **Veterinary Record**. v.155, n.16, p.504, 2004.

LUCKERT, P.D. e ALLAN, G.M. Porcine Circovirus. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 8.ed. Iowa State University Press: Ames, 1999. Cap.8, p.119-124.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. McGraw Hill Book Company: New York, 1968, 260p.

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

MAGAR, R.; MÜLLER, P. e LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.64, n.3, p.184-186, 2000.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Veterinary Journal**. v.169, n.3, p.454-456, 2005.

MANDRIOLI, L.; SARLI, G.; PANARESE, S.; BALDONI, S.; MARCATO, P.S. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.97, n.1-2, p.25-37, 2004.

MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.E.; VAN SOOM, A.; MEERTS, P.; MAES, D.G.; NAUWYNCK, H.J. Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. **Theriogenology**. v.61, n.1, p.91-101, 2004.

McNAIR, I.; MARSHALL, M.; McNEILLY, F.; BOTNER, A.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; VINCENT, I.; HERRMANN, B.; SANCHEZ, R.; RHODES, C. Interlaboratory testing of porcine sera for antibodies to porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.16, n.2, p.164-166, 2004.

McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.M.; FOSTER, J.C.; CLARK, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. A comparison

of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virological Methods**. v.80, n.2, p.123-128, 1999.

McNEILLY, F.; McNAIR, I.; MACKIE, D.P.; MEEHAN, B.M.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. **Archives of Virology**. v.146, n.5, p.909-922, 2001.

McNEILLY, F.; McNAIR, I.; O'CONNOR, M.; BROCKBANK, S.; GILPIN, D.; LASAGNA, C.; BORIOSI, G.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.14, n.2, p.106-112, 2002.

MEEHAN, B.M.; CREELAN, J.L.; McNULTY, M.S.; TODD, D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. **The Journal of General Virology**. v.78, n.1, p.221-227, 1997.

MEEHAN, B.M.; McNEILLY, F.; McNAIR, I.; WALKER, I.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Archives of Virology**. v.146, n.4, p.835-842, 2001.

MEERTS, P.; VAN GUCHT, S.; COX, E.; VANDEBOSCH, A.; NAUWYNCK, H.J.

Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. **Viral Immunology**. v.18, n.2, p.333-341, 2005.

MIKAMI, O.; NAKAJIMA, H.; KAWASHIMA, K.; YOSHII, M.; NAKAJIMA, Y.

Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.67, n.7, p.735-738, 2005.

MONTERO, C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v.51, n.1, p.1-4, 2003.

MORI, M.; SATO, K.; AKACHI, S.; ASAHI, S.; TANIGUCHI, S.; NARITA, M.

Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. **Veterinary Pathology**. v.37, n.6, p.667-669, 2000.

MORROW-TESCH, J. e ANDERSSON, G. Immunological and hematological characterizations of the wasting pig syndrome. **Journal of Animal Science**. v.72, n.4, p.976-983, 1994.

NAWAGITGUL, P.; HARMS, P.A.; MOROZOV, I.; THACKER, B.J.; SORDEN, S.D.;

LEKCHAROENSUK, C.; PAUL, P.S. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked

immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clinical and Diagnostic**

Laboratory Immunology. v.9, n.1, p.33-40, 2002.

OKUDA, Y.; ONO, M.; YAZAWA, S.; SHIBATA, I. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.15, n.2, p.107-114, 2003.

PARK, J.S.; KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; LIM, J.K.; KIM, S.H.; CHAE, C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal of Comparative Pathology**. v.132, n.2-3, p.139-144, 2005.

PENSAERT, M.B.; SANCHEZ, R.E.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.M.; NAUWYNCK, H.J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus type 2 infection. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.175-183, 2004.

PESCADOR, C.A.; ROZZA, D.B.; ZLOTOWSKI, P.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.; DRIEMEIER, D. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003, p.105-106.

PINTO, F.F.; LOBATO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; ROCHA, M.A.; BARBOSA, C.N. Detecção do circovirus suíno tipo 2 (PCV-2) em tecidos coletados de suínos do estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003, p.109-110.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J.M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**. v.149, n.12, p.357-361, 2001.

RAMOS-VARA, J.A.; SEGALÉS, J.; DURAN, C.O.; CAMPBELL, K.; DOMINGO, M. Diagnosing infectious porcine diseases using immunohistochemistry. **Swine Health and Production**. v.7, n.2, p.85-91, 1999.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALÉS, J.; BALASCH, M.; ROSELL, C.; QUINTANT, J.; FOLCH, J.M.; PLANA-DURÁN, J.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. **Veterinary Record**. v.146, n.26, p.762-764, 2000.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; ROVIRA, A.; PUJOLS, J.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**. v.50, n.2, p.99-101, 2003.

ROSE, N.; LAROUB, G.; LE DIGUERHER, G.; EVENO, E.; JOLLY, J.P.; BLANCHARD, P.; OGER, A.; LE DIMNA, M.; JESTIN, A.; MADEC, F. Risk factors

for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v.61, n.3, p.209-225, 2003.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; LATIMER, K.S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal of Comparative Pathology**. v.120, n.1, p.59-78, 1999.

ROVIRA, A.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; GARCIA, L.; PLANA-DURÁN, J.; ROSELL, C.; ELLERBROK, H.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. **Journal of Virology**. v.76, n.7, p.3232-3239, 2002.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1989.

SARLI, G.; MANDRIOLI, J.; LAURENTINI, M.; SIDOLI, L.; CERATI, C.; ROLLA, G.; MARCATO, P.S. Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.83, n.1-2, p.53-67, 2001.

SARRADELL, J.; PEREZ, A.M.; COMBA, E.; PEREIRA, N.; ANTHONY, L.; ANDRADA, M.; SEGALÉS, J. Hallazgos patológicos en cerdos afectados con el síndrome del desmedro multisistémico postdestete de la República Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**. v.36, n.3, p.118-124, 2004.

SEGALÉS, J.; ALONSO, F.; ROSELL, C.; PASTOR, J.; CHIANINI, F.; CAMPOS, E.; LOPEZ-FUERTES, L.; QUINTANA, J.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.; CALSAMIGLIA, M.; PUJOLS, J.; DOMINGUEZ, J.; DOMINGO, M. Changes in peripheral leukocyte blood populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.81, n.1-2, p.37-44, 2001.

SEGALÉS, J. e DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**. v.24, n.3, p.109-124, 2002.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F.; MAJO, N.; DOMINGUEZ, J.; DARWICH, L.; MATEU, E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.151-158, 2004.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C. e DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.137-149, 2004.

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

SHIBATA, I.; OKUGA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and faeces from experimentally infected pigs and field cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.65, n.3, p.405-408, 2003.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D. e JEWELL, S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. **American Journal of Pathology**. v.161, n.6, p.1961-1971, 2002.

STAEBLER, S.; SYDLER, T.; BUERGI, E.; McCULLOUGH, K.; McNEILLY, F.; ALLAN, G.; POSPISCHIL, A. PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. **Veterinary Journal**. v.170, n.1, p.132-134, 2005.

TISCHER, I.; RASCH, R. e TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig**. v.226, n.2, p.153-167, 1974.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**. v.295, n.1, p.64-66, 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**. v.91, n.3-4, p.271-276, 1986.

TISCHER, I.; PETERS, D.; RASCH, R.; POCIULI, S. Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. **Archives of Virology**. v.96, n.1-2, p.39-57, 1987.

TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D.; POCIULI, S.; GERMANN, B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. **Archives of Virology**. v.140, n.4, p.737-743, 1995.

TOOD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. **Veterinary Microbiology**. v.98, n.2, p.169-174, 2004.

YANG, J.S.; SONG, D.S.; KIM, S.Y.; LYOO, K.S; PARK, B.K. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polimerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.15, n.4, p.369-373, 2003.

YOON, K.J.; JEPSEN, R.J.; POGRANICHNIY, R.M.; SORDEN, S.; STAMMER, R.;
EVANS, L.E. A novel approach to intrauterine viral inoculation of swine using PCV
type 2 as a model. **Theriogenology**. v.61, n.6, p.1025-1037, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Soluções utilizadas na Imunocitoquímica

APÊNDICE B- Soluções utilizadas na Imunohistoquímica

APÊNDICE C- Soluções utilizadas na “nested-PCR”

APÊNDICE A - Soluções utilizadas na Imunocitoquímica

1- PBS (SALINA TAMPÃO FOSFATO)

1.a. Solução estoque: (Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4)

- Fosfato de sódio dibásico (NaHPO_4) $7\text{H}_2\text{O}$: 11,4 g
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $2\text{H}_2\text{O}$: 3,3 g
ou (NaH_2PO_4) H_2O : 2,54 g ou 2,92 g

*Manter a solução estoque refrigerada.

1.b. Solução trabalho: (Tampão fosfato salino 0,01 M pH 7,2-7,4)

- Solução estoque: 100 ml
- Cloreto de sódio: 8,5 g
- Água destilada: 900 ml

2- TVS (SOLUÇÃO TRIPSINA-VERSENE)

- PBS: 97,5 ml
- Tripsina 2,5%: 2 ml (2,5 g tripsina em 100 ml de PBS)
- Versene 10%: 0,25 ml (10 g EDTA dissódico em 100 ml água destilada)

3- TBS

- Tris base: 5,9 g
- NaCl: 8,7 g

Completar com 1 litro de água destilada (pH 7,6)

Para TBS 0,05% Tween, somente adicione 0,5 ml de Tween 20 a solução acima.

4- AEC

4.a. Solução estoque

- AEC: 20 mg
- Dimetilformamida: 2,5 ml (manter a 4°C)

4.b. Solução trabalho

Solução estoque: 0,1 ml

- Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0: 1,9 ml

4.c. Solução de H_2O_2 1%

Adicionar 20 µl de H₂O₂ 1%, imediatamente antes do uso na solução trabalho.

- H₂O₂ 30v: 100 µl
- H₂O destilada: 900 µl

5- TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,05 M pH 4

- Acetato de sódio 0,05 M: 0,68 g
- Água destilada: 1000 ml

*para corrigir o pH até 4 usar ácido acético glacial 0,1 M.

6- HEMATOXILINA MAYER

- Hematoxilina: 1 g
- Iodato de sódio: 0,2 g
- Alúmen de potássio ou amônia: 50 g
- Ácido cítrico: 1 g
- Cloral hidratado: 50 g
- Água destilada: 1 l

Dissolver o alúmen depois a hematoxilina, o iodato, o ácido cítrico e por último o cloral.

Cor final: Vermelho violeta.

APÊNDICE B - Soluções utilizadas na Imunohistoquímica

1- TBS

- Tris base: 5,9 g
- NaCl: 8,7 g

Completar com 1 litro de água destilada (pH 7,6)

Para TBS 0,05% Tween, somente adicione 0,5 ml de Tween 20 a solução acima.

2- PBS (SALINA TAMPÃO FOSFATO)

2.a. Solução estoque: (Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4)

- Fosfato de sódio dibásico (NaHPO_4) $7\text{H}_2\text{O}$: 11,4 g
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $2\text{H}_2\text{O}$: 3,3 g
ou (NaH_2PO_4) H_2O : 2,54 g ou 2,92 g

*Manter a solução estoque refrigerada.

2.b. Solução trabalho: (Tampão fosfato salino 0,01 M pH 7,2-7,4)

- Solução estoque: 100 ml
- Cloreto de sódio: 8,5 g
- Água destilada: 900 ml

3- TRIPSINA 0,1%

- Tripsina: 10 mg
- TBS: 10 ml

Diluir em gelo, armazenar no congelador e aquecer a 37°C na hora de utilizar.

4- DILUENTE SOROS

- PBS: 99,9 ml
- BSA (albumina bovina) 1%: 1 g

5- TAMPÃO CITRATO pH 6, 10 mM.

- Ácido cítrico monohidratado ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$): 2,1 g
- Água destilada: 1000 ml

Ajustar o pH para 6 com NaOH 2 N.

6- AEC**6.a. Solução estoque**

- AEC: 20 mg
- Dimetilformamida: 2,5 ml (manter a 4°C)

6.b. Solução trabalho

- Solução estoque: 0,1 ml
- Tampão acetato de sódio 0,05M pH 4,0: 1,9 ml

6.c. Solução de H₂O₂ 1%

Adicionar 20 µl de H₂O₂ 1%, imediatamente antes do uso na solução trabalho.

- H₂O₂ 30v: 100 µl
- H₂O destilada: 900 µl

7- TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,05 M pH 4

- Acetato de sódio 0,05 M: 0,68 g
- Água destilada: 1000 ml

*para corrigir o pH até 4 usar ácido acético glacial 0,1 M.

8- DAB

- Água destilada: 2,5 ml
- 1 gota de buffer pH 7,5
- 2 gotas de solução de DAB
- 1 gota de peróxido de hidrogênio

9- HEMATOXILINA MAYER

- Hematoxilina: 1 g
- Iodato de sódio: 0,2 g
- Alúmen de potássio ou amônia: 50 g
- Ácido cítrico: 1 g
- Cloral hidratado: 50 g
- Água destilada: 1 l

Dissolver o alúmen depois a hematoxilina, o iodato, o ácido cítrico e por último o cloral.

Cor final: Vermelho violeta.

10-HEMATOXILINA HARRIS

Dissolver 1 g de hematoxilina em 10 ml de álcool 100% (em becker).

Dissolver 20 g de sulfato de alumínio e potássio em 200 ml de água destilada (em erlenmeyer), com ajuda de calor (fogão), adicionar à solução de hematoxilina (fora do fogo). Levar a mistura à fervura rápida, e em seguida, adicionar 0,5 g de óxido de mercúrio levando novamente à fervura rápida esfriar rapidamente em banho-maria 56°C, por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, colocar o becker em água corrente para acelerar o resfriamento da solução. Armazenar em frasco âmbar.

APÊNDICE C - Soluções utilizadas na “nested-PCR”

1- Álcool 75% gelado

- 75 ml de etanol
- 25 ml de água ultra pura estéril

Misturar os dois reagentes e aliquotar em frascos de centrífuga de 50 ml e conservar a 20°C.

2- Proteinase K

Proteinase K deve ser ressuspendida de modo a apresentar concentração final de 20 µg/µl. Assim quando a proteinase apresenta 100 mg deve ser ressuspendida em 5 ml do tampão próprio para ressuspende Proteinase K.

3- Tampão Tris/CaCl₂ para ressuspende Proteinase K

Concentração final	Estoque	Quantidade
Invitrogen		
10 mM tris pH 7,5	Tris pH 7,5 1 M	1 ml
20 mM cloreto de cálcio	CaCl ₂ 1 M	2 ml
50% glicerol	Glicerol	50 ml
	Água ultra pura estéril	47 ml
USB		
20 mM tris pH 7,5	Tris HCl pH 7,5 1 M	2 ml
1 mM CaCl ₂	CaCl ₂ 1 M	100 µl
50% glycerol	Glicerol	50 ml
	Água ultra pura estéril	47,9 ml

4- Tampão de lise 2x

Misturar em um frasco de 500 ml

- 4 ml de NaCl 5 M
- 10 ml de Tris 1 M pH 7,5
- 4 ml EDTA 0,5 M pH 8,0
- 5 ml de SDS 20%

- 77 ml de água ultra pura estéril
- Estocar temperatura ambiente

5- Tris 1 M pH 7,5

- 48,44 g Tris Base
- 350 ml de água ultra pura
- Misturar, com barra magnética, até entrar em solução
- Ajustar pH para 7,5 com HCl concentrado (de 28 a 30 ml)
- Completar volume, até 400 ml com água ultra pura
- Autoclavar 30 minutos a 121°C
- Estocar temperatura ambiente

6- EDTA 0,5 M pH 8,0

- 74,44 g de EDTA \times 2H₂O
- 300 ml de água ultrapura
- Medir o pH. **Obs.:** o EDTA não entra em solução até que chegue a pH 8,0, assim, começar a misturar com barra magnética adicionando NaOH 10 N até chegar a pH 8,0.
- Completar a solução para 400 ml
- Autoclavar 121°C por 15 minutos
- Armazenar a temperatura ambiente

7- SDS 20%

- 40g de SDS
- 150 ml de água ultra pura
- Aquecer em banho maria 56°C alguns minutos
- Misturar com barra magnética, e aquecer/misturar até entrar em solução
- Filtrar em membrana de 0,45µm
- Armazenar a temperatura ambiente

8- NaCl 5 M

- 116,90 g de NaCl;
- 380 ml de água ultrapura
- Agitar com barra magnética até entrar em solução

- Completar com água ultrapura até 400 ml
- Autoclavar
- Armazenar a temperatura ambiente

9- Fenol equilibrado

- Descongelar 500 g de fenol a 65°C (500 g = 500 ml)
- Adicionar 0,5 g de 8 - hidroxyquinoline - misturar;
- Colocar 500 ml de Tris 1 M pH 8,0
- Acrescentar 500 ml da solução de fenol
- Misturar delicadamente
- Deixar repousar por aproximadamente 15 minutos para separar as fases
- Coletar o fenol em um becker
- Descartar a fase aquosa
- Colocar o fenol no funil de decantação
- Adicionar 500 ml de Tris base 0,1 M
- Misturar delicadamente
- Deixar em repouso por aproximadamente 15 minutos para separar as fases
- Coletar o fenol em beker
- Medir o pH da fase aquosa que precisa estar maior que 7,5
- Distribuir o fenol em frascos de 50 ml (25 ml de fenol e 25 ml de tris 0,1 ml)
- Armazenar a -20°C.

10- Tris Base 1 M pH 8,0

- 121,14 g de tris base;
- 850 ml de água ultra pura
- Misturar até entrar em solução
- Ajustar o pH com HCl concentrado para 8,0
- Completar a solução para 1000 ml
- Autoclavar a 121°C, por 15 minutos
- Armazenar a temperatura ambiente

Tris Base 0,1 M pH 8,0

Fazer diluição 1:10 da solução Tris base 1 M pH 8,0 (100 ml de Tris Base 1 M e 900 ml de água ultrapura estéril).

11- Acetato de sódio 3 M pH 5,2

- 163,24 g de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ e 98,40g de $C_2H_3O_2Na$ anidro
- 350 ml de água ultra pura
- Misturar com barra magnética até entrar em solução
- Ajustar pH com ácido acético glacial (± 50 ml)
- Completar solução para 400 ml com água ultrapura
- Autoclavar
- Estocar temperatura ambiente

12- Tampão TE (Tris - EDTA)

Misturar em um frasco de 250 ml

- 1 ml de Tris 1 M pH 7,5
- 0,2 ml EDTA 0,5 M pH 8,0
- 98,8 ml de água ultra pura estéril

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)