



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
TESE DE DOUTORADO

EDNA MARIA CAVALLINI SANCHES

Pneumocystis sp. e Circovirus (PCV2) em pulmões de suínos de abate, procedentes dos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso e estudo das relações filogenéticas das amostras de *Pneumocystis* sp.

PORTO ALEGRE

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE DE DOUTORADO

EDNA MARIA CAVALLINI SANCHES

***Pneumocystis* sp. e Circovirus (PCV2) em pulmões de suínos de abate, procedentes dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso e estudo das relações filogenéticas das amostras de *Pneumocystis* sp.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Subárea: Microbiologia

Especialidade: Micologia

Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

Co-Orientador: **PROF. DR. DAVID DRIEMEIER**

PORTO ALEGRE

2006

S326p Sanches, Edna Maria Cavallini

Pneumocystis sp. e Circovirus (PCV2) em pulmões de suínos de abate, procedentes dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso e estudo das relações filogenéticas das amostras de pneumocystis sp. / Edna Maria Cavallini Sanches - Porto Alegre: UFRGS, 2006.

125f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2006. Laerte Ferreiro, Orient., David Driemeier, Co-orient.

1. Microbiologia 2. Pneumonia: suínos 3. Filogenia
4. Pneumocystis sp. 5. Circovirus I. Ferreiro, Laerte, Orient.
II. Driemeier, David, Co-orient. III. Título

CDD 616.01

Nenhuma obra é tão perfeita como os filhos...

Aos meus filhos Tassiana e Thiago

AGRADECIMENTOS

Descobrimos que palavras não transmitem tudo que pensamos, não dizem tudo que desejamos e não expressam gratidão, amor e amizade e sim os atos, os momentos, as dificuldades, cada minuto cursado juntos. Cada pessoa aqui citada teve uma grande participação nesta jornada e possibilitou a concretização de um sonho.

Meus agradecimentos a...

Laerte Ferreira & David Driemeier (Orientador e Co-orientador do PPGCV)

Jacques Guillot e Madeleine Berthelemy (École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France).

Edna S. Kaneshiro (Department of Biological Sciences, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA).

Eduardo Dei-Cas e Magali Chabé (Institute Pasteur, Lille, France).

Roberto Medeiros, Judi M. Nóbrega, Plínio L. Lopes, Antônio F. Barbosa Filho, Adriana e Juarez (Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul e Mato Grosso)

Orema Souza, Elsio Augusto Wünder Jr., Andréia Spanemberg e Fabiano Bonfim Carregaro. (Setor de Micologia Veterinária da Faculdade de Veterinária - UFRGS).

Caroline A. Pescador, Ângela R. Belmonte de Souza, Marília Belmonte, Daniela Rozza, Luis Gustavo Corbellini, Mauro R. Borba, Priscila Zlotowski, Sandra Traverso e André Corrêa (Setor de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária -UFRGS).

Ana Paula Ravazzolo e Eliana Franco Lopes (Setor de Imunologia da Faculdade de Veterinária - UFRGS).

David E. S. N. Barcellos (Setor de Suínos da Faculdade de Veterinária - UFRGS).

Clarissa Silveira Luiz Vaz, André Streck, Laura Lopes de Almeida, Cristiana Portz, Marisa Macagnan, Carla Rodenbusch, Ana Cristina Wendelstein e Cláudio Wageck Canal (Setor de Virologia da Faculdade de Veterinária - UFRGS).

Hermides Pinto Jr. (Laboratório de Biologia Molecular e Celular - Porto Alegre/RS).

Edson Colodel Moleta e Clóvis Botelho (Universidade Federal de Mato Grosso).

Márcia Beatriz Cattini de Mello e Margarida Rocha (Laboratório Central da Secretaria de Saúde de Mato Grosso (LACEN)).

Carmen Belmonte, Vera Luiza Martins Saraiva da Rocha, Jociane Oliveira da Silva, Maria Colete Lorini, Ana Vera Finardi Rodrigues, Alice Belmonte, David Sengik Ribeiro, Pedrolina de Oliveira Leão, Carla Vasques Silveira e Liliane Lykwka (Equipe Administrativa da Pós-Graduação, Secretaria e Biblioteca da Faculdade de Veterinária (UFRGS).

Luiza Amaral de Castro e Carolina Pereira Silveira (Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Ana Ondina Wallwitz de Araújo, Martha Merighi, Ludovico Antonio Merighi, Fabiana Merighi, Alexandre Merighi, Edna Massae Yokoo, Aline Schmitt, Judith Scliar, Marina Venturini Copetti, Ubirajara Costa, Dilmara Reischak, Jânio Santurio, Sydney Hartz Alves, Adriana Muschner e Izamara de Oliveira (amigos e colegas).

E, muito especialmente, aos meus queridos Familiares:

Oswaldo Cavallini, Nympha Galassi Cavallini, Odenir José Sanches, Thiago Cavallini Sanches, Tassiana Cavallini Sanches Rangel, Marlon Rangel, Edgar Cavallini, Ângela Vitorino Cavallini, Neuda Galassi Miranda e Luzia Galassi Scarpini.

“... e descobrimos que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida”.

RESUMO

As doenças respiratórias constituem um sério problema em sistemas intensivos de criação de suínos, causando enormes prejuízos à indústria suína no Brasil e no mundo. Estes prejuízos estão frequentemente relacionados à redução de peso, mortalidade, maior predisposição a doenças entéricas, gastos com vacinas e medicamentos.

Os distúrbios respiratórios em suínos são manifestados através de um complexo de doenças, com envolvimento de agentes virais, bacterianos e fúngicos. Dentre estes, a presença do circovírus (PCV2) e o *Pneumocystis* sp. começa a ser gradativamente caracterizada como uma associação entre um agente causador de imunossupressão e um organismo de ação oportunista.

O trabalho objetivou diagnosticar *Pneumocystis* sp. através das técnicas de imunohistoquímica, Grocott e nested-PCR, em suínos abatidos nos Estados do Rio Grande do Sul (RS) e Mato Grosso (MT), diagnosticar a ocorrência de PCV2 na mesma população de suínos, verificar a associação entre *Pneumocystis* sp. e PCV2, e determinar as relações filogenéticas entre as amostras de *Pneumocystis* sp.

O estudo avaliou um total de 591 pulmões, 297 com alterações macroscópicas (pneumonia) e 294 normais obtidos em frigoríficos. Foram analisados 292 pulmões procedentes do RS e 299 pulmões do MT

Para diagnóstico do *Pneumocystis* sp. as amostras foram analisadas através das técnicas de Grocott, Imunohistoquímica e nested-PCR (mtLSU e mtSSU rRNA). Do total das amostras, 36,9% foram positivas para *Pneumocystis*. O índice de positividade para o vírus PCV2 foi de 32,7% na amostra total. Os resultados revelaram uma alta prevalência do vírus (PCV2) em pulmões sem lesões macroscópicas. A co-infecção (PCV2 e *Pneumocystis* sp.), foi detectada em 28,0% em 564 pulmões examinados.

As análises das seqüências dos nucleotídeos dos produtos de PCR dos genes mtLSU e mtSSU do rRNA do *Pneumocystis* sp. nos pulmões analisados, sugerem a presença até o presente momento de 2 espécies diferentes de *Pneumocystis* no Brasil.

Este estudo evidencia a ocorrência da co-infecção de dois agentes (*Pneumocystis* sp. e PCV2) em animais hígidos, fato que, indica a necessidade de planejamento e implementação de medidas de controle para melhorar a produtividade na suinocultura.

Palavras chaves: *Pneumocystis* sp., PCV2, suínos, pneumonia, mtLSU rRNA, mtSSU rRNA, filogenia.

ABSTRACT

Respiratory diseases are a major problem in intensive systems of swine husbandry. They are a cause for high losses in the swine industry in Brazil and in the world. These losses are often related to weight reduction, mortality, higher vulnerability to enteric diseases, and expenses with vaccines and drugs.

Respiratory diseases in swine appear through a complex of diseases, caused by virus, bacteria and fungi; among these, the porcine circovirus 2 (PCV2) and *Pneumocystis* sp., the former an agent which causes immunosuppression and the latter an opportunistic microorganism. Both are being recognized as capable of being associated.

The objectives of this study were to: identify *Pneumocystis* sp. through immunohistochemistry techniques, Grocott and nested-PCR in swine slaughtered in the States of Rio Grande do Sul and Mato Grosso (MT); investigate PCV2 in the same swine population; investigate the association between *Pneumocystis* sp. and PCV2, and establish a filogenetic relationship between isolated of *Pneumocystis* sp.

The study was carried out with a total of 591 lungs, 297 with macroscopic alterations characteristic of pneumonia, and 294 normal lungs from the industry. 292 lungs came from RS and 299 lungs came from MT.

In order, to diagnose *Pneumocystis* infection, samples were analysed through Grocott technique, immunohistochemistry and nested-PCR (mtLSU and mtSSU rRNA). Among all samples 36,9% were positive for *Pneumocystis* sp.. PCV2 virus was found in 37,2% of the samples. Results revealed a high prevalence of the PCV2 virus in lungs without macroscopic lesions. Co-infection (PCV2 and *Pneumocystis* sp.) was found in 28,0% of 564 lungs examined.

So far, the analyses of the sequences of nucleotides from the products of PCR from the genes mtLSU rRNA and mtSSU rRNA from *Pneumocystis* obtained from the examined lungs suggest that, it is possible the existence of two different species of *Pneumocystis* in Brazil.

This study shows co-infection by two agents (*Pneumocystis* sp. and PCV2) in apparently healthy animals. This fact points out the necessity planning and implementation of control measures in order to improve productivity in swine husbandry and industry.

Key words: *Pneumocystis* sp., PCV2, swines, pneumonia, mtLSU rRNA, mtSSU rRNA, phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo evolutivo.....	27
Artigo 1		
Figura 1-	Tissue section of pig lung showing <i>Pneumocystis</i> organism (Grocott's methenamine silver stain, x 1000).	57
Figura 2-	Interstitial pneumonia in a pig associated with <i>Pneumocystis</i> cysts strongly labeled by an anti- <i>Pneumocystis</i> monoclonal antibody (Lung tissue section, x 1000).	58
Figura 3-	Interstitial pneumonia with well visible type-2 epithelial alveolar cell hyperplasia and non suppurative mononuclear infiltrates (H&S, x 400).	59
Artigo 2		
Figura 1-	PCR products of DNA extracted from swine lungs infected with <i>Pneumocystis</i>	63
Figuras suplementares		
Figura A-	Imunohistoquímica <i>Pneumocystis carinii</i> – Controle.....	67
Figura B-	<i>Pneumocystis</i> sp. – Imunohistoquímica – X 1000.....	67
Figura C-	<i>Pneumocystis</i> sp. - Imunohistoquímica X 400.....	68
Figura D-	<i>Pneumocystis carinii</i> sp. – Imunohistoquímica x 200.....	68
Figura E-	PCV2- Controle- Imunohistoquímica x 200.....	69
Figura F-	PCV2- Imunohistoquímica – x 400.....	69
Figura G-	PCV2- Imunohistoquímica- x 400.....	70
Figura H-	Histopatológico (HE) – Pneumonia Instersticial difusa x 200.....	70
Estudo 3		
Figura 1-	Seqüências de nucleotídeos de mtLSU rRNA do <i>Pneumocystis</i> sp.....	77
Figura 2-	Seqüências de nucleotídeos de mtSSU rRNA do <i>Pneumocystis</i>	

sp. 79

Figura 3- Árvore filogenética do *Pneumocystis* sp. a partir do fragmento
do gene mtLSU
rRNA..... 81

Figura 4 - Árvore filogenética do *Pneumocystis* sp. a partir do fragmento
do gene mtLSU
rRNA..... 82

LISTAS DE TABELAS

Artigo 1		
Tabela 1-	Prevalence of <i>Pneumocystis</i> sp. in slaughterhouse pigs with and without pulmonary lesions in the states of Rio Grande do Sul (RS) and Mato Grosso (MT), Brazil, from February to March, 2003.....	55
Tabela 2-	Histopathological findings in lungs positively identified with <i>Pneumocystis</i> sp. in slaughterhouses pigs in the states of Rio Grande do Sul (RS) and Mato Grosso (MT), Brazil, from February to March, 2003.....	56
Artigo 2		
Tabela 1-	Prevalence of PCV2 in pig lungs with and without lesions. ...	63
Tabela 2-	<i>Pneumocystis carinii</i> f. sp.suis and PCV2 in the lungs of pigs from two sites in Brazil. Values represent the number of specimens.....	63
Tabelas		
Suplementares		
Tabela A-	Co-infecção entre PCV2, <i>Pneumocystis</i> sp. em suínos de abate nos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso.....	65
Tabela B-	Co-infecção entre PCV2, <i>Pneumocystis</i> sp. em pulmões com e sem lesões macroscópicas em suínos de abate no Estado do Rio Grande do Sul.....	65
Tabela C-	Co-infecção entre PCV2, <i>Pneumocystis</i> sp. em pulmões com e sem lesões macroscópicas em suínos de abate no Estado de Mato Grosso.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CAV	Vírus da anemia dos frangos
DHPS	Dihydropteroate synthetase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IPMA	Imunoperoxidase em monocamada
ITS	Espaçador intergênico transcrito
kDa	Kilodaton
LDH	Desidrogenase láctica
mtLSU rRNA	subunidade maior mitocondrial do RNA ribossômico
mtSSU rRNA	subunidade menor mitocondrial do RNA ribossômico
nm	Nanômetros
pb	Par de bases
PCP	Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Circovírus suíno
PCV1	Circovirus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PPV	Parvovírus suíno
PRRS	Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
PRRS	Síndrome Respiratória e reprodutiva porcina
rDNA	Ácido desoxirribonucléico ribossômico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDM	Síndrome de Definhamento Multissistêmico
SDMSD	Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SRM	Síndrome da Refugagem Multissistêmica
SSCP	Técnica de polimorfismo conformação de cadeia simples

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TTV	TT vírus
TLMV	TTV-like mini vírus
UPL	Unidade produtora de leitão
SRRS	Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Pneumocistose.....	18
2.1.1	Epidemiologia em humanos.....	19
2.1.2	Epidemiologia em animais.....	21
2.1.2.1	Epidemiologia em suínos.....	23
2.1.3	Taxonomia.....	24
2.1.3.1	Heterogeneidade genética do <i>Pneumocystis</i> spp.....	25
2.1.4	Ciclo evolutivo.....	26
2.1.5	Patogenia.....	28
2.1.6	Manifestações clínicas em animais.....	29
2.1.7	Diagnóstico.....	30
2.1.7.1	Diagnóstico em humanos.....	30
2.1.7.2	Diagnóstico em animais.....	31
2.1.7.3	Diagnóstico por colorações convencionais.....	31
2.1.7.4	Diagnóstico por métodos moleculares.....	33
2.1.7.5	Diagnóstico por anticorpo monoclonais.....	33
2.1.7.6	Diagnóstico macroscópico nos pulmões.....	34
2.1.7.7	Diagnóstico histopatológico nos pulmões.....	34
2.1.7.8	Cultivo.....	34
2.1.8	Modelos animais.....	34
2.2	Circovirose em suínos.....	35
2.2.1	Epidemiologia.....	36
2.2.2	Taxonomia.....	39
2.2.3	Patogenia.....	39
2.2.4	Manifestações clínicas.....	40
2.2.5	Diagnóstico.....	40
	CAPÍTULO 1.....	43

Artigo 1.....	44
CAPÍTULO 2.....	60
Artigo 2.....	61
CAPÍTULO 3.....	71
Estudo 3.....	72
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÕES.....	89
PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	106

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Pneumocystis*, atualmente é considerado como um importante patógeno oportunista, responsável por uma pneumonia fatal em hospedeiros imunodeprimidos e a infecção causada pelo mesmo, tem sido intensamente estudada em seres humanos, em animais de laboratório e recentemente também em alguns animais domésticos (LAAKKONEN, 1998).

As doenças respiratórias constituem um sério problema em sistemas intensivos de criação de suínos, causando enormes prejuízos à indústria suinícola no Brasil e no mundo. Estes prejuízos estão freqüentemente relacionados à redução de peso, mortalidade, maior predisposição a doenças entéricas, gastos com vacinas e medicamentos (SILVA *et al.*, 2002).

Em rebanhos suínos com menos de 12 meses, a pneumocistose é observada associada com dispnéia e crescimento retardado. O fungo é encontrado nos linfonodos brônquicos, fígado, baço, rins, nódulos linfáticos mesentéricos e intestinos (BILLE - HANSEN *et al.*, 1990).

A pneumonia associada com *Pneumocystis* ocorre em suínos expostos a fatores estressantes como desmame precoce, novo ambiente, troca de dieta e desnutrição (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; KONDO *et al.*, 2000).

Da mesma forma, devido a imunossupressão causada pelo circovírus (PCV2) observa-se associação entre pneumocistose, síndrome multissistêmica e emagrecimento pós-desmame ou síndrome de refugagem multisistêmica (SRM) (Clark, 1997; SATO *et al.*, 2000) e síndrome viral respiratória (PRRSV) (KONDO *et al.*, 1997).

A transmissão horizontal aérea já foi comprovada entre leitões desmamados e em amamentação, que compartilhavam o mesmo local. Quando esses grupos eram mantidos separados, observou-se uma diminuição da ocorrência de pneumocistose (KONDO *et al.*, 2000).

Além do caráter multifatorial das doenças respiratórias, vários microorganismos bacterianos, virais e fúngicos podem estar envolvidos simultaneamente nestes quadros. Dentre várias possibilidades, é sabido que o *Pneumocystis* e o circovírus (PCV2), podem ser responsáveis por doenças respiratórias e, portanto, causar sérios problemas em granjas de criação. Até o presente, se desconhece a ocorrência pneumocistose, como também, sua associação com circovirose em rebanhos de suínos no Brasil.

Em decorrência das situações anteriormente mencionadas, **os objetivos do trabalho foram:**

- Diagnosticar *Pneumocystis* sp através das técnicas de imunohistoquímica, Grocott e nested-PCR, em suínos abatidos nos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso.
- Diagnosticar a ocorrência de PCV2 na mesma população de suínos.
- Verificar a associação entre *Pneumocystis* sp. e PCV2.
- Avaliar as relações filogenéticas entre as amostras de *Pneumocystis* sp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pneumocistose

O *Pneumocystis carinii* foi identificado por Carlos Chagas em 1909, que encontrou formas císticas em pulmão de ratas infectadas com *Trypanosoma cruzi*, acreditando que estas formas eram estágios císticos do protozoário (CHAGAS, 1909; CHAGAS, 1911). Em 1910, Antonio Carinii, no Brasil, encontrou formas císticas em pulmão de ratas infectadas com *Trypanosoma lewisi* (CARINII, 1910) sendo este resultado, confirmado por Vianna em 1911; seguida por relatos, também em animais infectados com *Trypanosoma evansi*, por Walker em 1912 (WALKER, 1912).

Em 1912, o casal Delanöe, do Instituto Pauster, observou as mesmas formas do parasita em ratas de esgoto de Paris. Porém, não infectadas com *Trypanosoma* e evidenciou as mesmas formas nos filhotes, concluindo a ocorrência da transmissão via placentária (DELANÖE & DELANÖE, 1912). Estes pesquisadores sugeriram o nome do microorganismo, *Pneumocystis carinii*, indicando o tropismo pelo pulmão, a morfologia característica de cistos e a homenagem ao Dr. Antonio Carinii (ARMENGOL, 1995; CUSHION, 1998).

Suspeitou-se que aqueles organismos pudessem ter afinidade com os coccídeos. Assim, em 1913, propôs-se que o nome do organismo fosse colocado no gênero *Protozoa*, *Klosiella* (CUSHION, 1998).

Durante as duas décadas seguintes, *P. carinii* permaneceu como um microorganismo cujas características e potencial patogênico precisavam ser elucidados. Em 1940, uma forma de pneumonia por este agente foi descrita em, crianças prematuras e desnutridas na Europa, durante e após a Segunda Guerra Mundial. Desde então, têm-se encontrado casos em todos os continentes, começando com relatos esporádicos, e tornando-se cada vez mais freqüentes nos anos seguintes (ROSSEL & GOTTLIEB, 1985; WALZER, 1998).

Em 1950 Vanek e Jirovec estabeleceram o *Pneumocystis carinii* como agente causal de uma pneumonia intersticial plasmocitária, e sugerem classificá-lo na família *Sporozoa*, ordem *Haplosporidia*. (VANEK *et al* , 1955).

Em 1958, Ivady e Paldy identificaram a pentamidina como terapia eficaz para pneumonia causada pelo *Pneumocystis carinii* e em 1975, Hughes e colaboradores descreveram a eficácia do

trimetropim-sulfametoxazol contra o organismo, fortalecendo assim, a idéia do organismo ser um protozoário, aliado ao fato de não se obter o crescimento do mesmo em cultivo. Durante esta década muitos trabalhos foram publicados considerando o *P. carinii* como levedura ou como protozoário (ODDÓ, 1990; ARMENGOL, 1995; CAILLIEZ *et al.*, 1996; CUSHION & WALZER, 1996; HANANO & KAUFMANN, 1998).

Na década de 80, o *Pneumocystis carinii* adquiriu importância na patologia humana, principalmente devido a imunodepressão oncológica, iatrogênica e com o surgimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que levam os pacientes a desenvolver infecções oportunistas, entre elas a pneumocistose (FELDMAN, 1992; WALZER, 1998).

Com o avanço dos métodos moleculares, o *Pneumocystis carinii* foi considerado como fungo, devido possuir estrutura similar e colorações características semelhantes a este grupo. Foi classificado dentro dos *Ascomycetos*, na família *Pneumocystidaceae* e ordem *Pneumocystidales*. Embora classificado como fungo, segue ainda recomendações do grupo que trabalha com *Pneumocystis* usando os nomes das subespécies, usando *formale speciales* (f. sp) (BARTLETT *et al.* 1994), e em 2001 (STRINGER *et al.* 2001) e HUGOT *et al.* (2003), renomeia o *Pneumocystis* sem a designação “f. sp.”(HUGOT *et al.*, 2003).

Atualmente em humanos o fungo foi classificado como *Pneumocystis jirovecii* (FRENKEL, 1999), em homenagem a Otto Jirovec.

2.1.1 Epidemiologia em humanos

A epidemiologia da pneumonia por *P. jirovecii* recebeu pouca atenção até 1952, quando esse microrganismo foi evidenciado como causa de pneumonia em prematuros e crianças desnutridas. Após estes achados, foi frequentemente encontrado em pacientes imunocomprometidos, com malignidades, com tratamentos quimioterápicos ou com administração de corticóides. Posteriormente se tornou altamente prevalente na era da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (ROSSEL & GOTTLIEB, 1985; WALZER, 1998). A epidemiologia tem mostrado mudanças devido à descoberta de técnicas diagnósticas mais evoluídas em materiais biológicos obtidos por métodos menos invasivos como, escarro, lavados orais. Antigamente, as amostras somente eram coletadas para análise por meio de procedimentos invasivos, como autópsia e biópsia pulmonar (KROE *et al.*, 1997).

No Brasil, entre 1980 e 2000, foram relatados 40.882 casos de pneumocistose em pacientes portadores de SIDA, obtendo-se uma prevalência de 21,4% (SANCHES, 2003), índice inferior ao dos adultos americanos e africanos, nos quais a incidência está em torno, respectivamente, de 70 e 83% (HUGHES, 1998).

Com a introdução da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART) desde 1996, devida a detenção na progressão da imunodeficiência, restauração da função imune associada à profilaxia primária e secundária, houve decréscimo significativo na incidência de pneumocistose, paralelamente a outras infecções oportunistas nos pacientes com SIDA (SEVERO *et al.*, 2004).

Atualmente, a infecção humana por *P. jirovecii* pode ser subdividida em três grupos: (1) pneumonia intersticial plasmocitária, epidêmica em lactentes europeus durante e após a segunda grande guerra, (2) casos esporádicos de pneumonia por *P. jirovecii* em adultos imunocomprometidos e crianças portadoras de neoplasias malignas e receptores de transplante de órgãos e (3) indivíduos com SIDA, especialmente com baixa contagem de células T auxiliares (CD4 < 200 células/ μ l) (HOPKIN, 1991).

A infecção ocorre por via aerógena, em etapa precoce da vida e cursa de forma assintomática. O fungo pode permanecer em estado latente por vários anos, podendo ocorrer manifestação da doença caso o hospedeiro sofra algum transtorno imunitário. Por outro lado, a doença pode ser secundária a uma reinfecção (HUGHES, 1982; PAES *et al.*, 1982; FELDMAN, 1992; ROUX *et al.*, 1998).

Crianças com desnutrição ou infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) desenvolvem pneumonia por *P. jirovecii* no primeiro ano de vida, especialmente entre o terceiro mês de idade e o nono mês. Nessa população, a incidência de pneumonia por *P. jirovecii* é cinco vezes mais alta do que em outro grupo na população geral. Também no primeiro ano de vida cerca de 75% das crianças normais entre 2 anos e 4 anos têm títulos de anticorpos para *P. jirovecii* detectáveis, sugerindo que a infecção pode ser comum (WALZER, 1973).

A dispersão global do *Pneumocystis* demonstrou que o organismo não exhibe tropismo regional, pois é encontrado em regiões costeiras, climas áridos e florestas úmidas e em todas as estações do ano podendo ocorrer uma variabilidade em climas frios (48% a 58%) e climas quentes (28 a 38%) (HUGHES, 1998).

A transmissão por via aérea ocorre mediante a inalação de ascos do fungo, a partir de aerossol, através da tosse de indivíduos infectados, enfermos ou portadores sãos, ao compartilhar o mesmo ambiente (WALZER *et al.*, 1973). A transmissão transplacentária também foi comprovada, podendo causar nati-mortalidade ou dar origem ao nascimento de uma criança com pneumocistose congênita (WALZER *et al.*, 1973; HUGHES, 1982; SEVERO, 1991; CAILLIEZ *et al.*, 1996).

A transmissão do *Pneumocystis*, entre animais são associadas com espécies específicas, não ocorrendo transmissão entre espécies diferentes de hospedeiros (HUGHES, 1982; HUGHES & ANDERSON, 1991; MAZARS & DEI-CAS, 1998).

Em humanos foram detectados 4 tipos de *Pneumocystis jirovecii* colonizando pacientes e 11 tipos encontrados em pacientes com Pneumocistose. Evidenciando assim, a população como reservatório do fungo (NEVEZ, 2003).

2.1.2 Epidemiologia em animais

Em animais, a pneumonia por *Pneumocystis* spp. tem sido encontrada em eqüinos (AINSWORTH *et al.*, 1993; JENSEN *et al.*, 2001), suínos (SEIBOLD & MUNNELL, 1977; FUJITA *et al.*, 1989; BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; KONDO *et al.*, 1993; CHRISTENSEN *et al.*, 1996; RAMOS-VARA *et al.*, 1998; SATO *et al.*, 2000; JENSEN *et al.*, 2001), caprinos (MCCONNELL *et al.*, 1971), cães, gatos e saguis (SEIBOLD & MUNNELL, 1977; SUKURA *et al.*, 1997; HAGIWARA, *et al.*, 2001) ovinos (JÉCNLY, 1973) e primatas (DEMANCHE *et al.*, 2001; DEMANCHE *et al.*, 2003).

Em roedores o *Pneumocystis* sp. tem sido observado nos gêneros *Rattus*, *Mus*, *Apodemus*, *Clethrionomys* e *Microtus* em todos os continentes, com prevalência variando entre 1% a 100% (LAAKKONEN, 1998; CERÉ & POLACK, 1999).

Os ratos abrigam também outra espécie, o *Pneumocystis wakefieldiae*. Apesar de frequentemente encontrados juntos e morfologicamente similares, os dois são fenotipicamente e geneticamente divergentes (CUSHION, 2004). Observa-se que em ratos a prevalência de *Pneumocystis carinii* é mais alta quando a umidade relativa do ar é elevada e o predomínio de *Pneumocystis wakefieldiae*, ocorre quando a temperatura ambiente mostra-se mais baixa e os dois tipos estão

presente dentro do mesmo alvéolo, excluindo assim o habitat heterogêneo como um mecanismo de coexistência (ICENHOUR, 2006).

A ocorrência da infecção por *Pneumocystis* em animais selvagens tem sido diagnosticada, somente em animais de zoológicos e colônias de animais silvestres, especialmente primatas, quando removidos de seu habitat (LAAKKONEN, 1998).

A doença animal é similar à humana (pneumonia intersticial difusa), com início insidioso, dispnéia e por fim morte do hospedeiro. Os achados histológicos demonstram pneumonia (4 a 11 semanas), com exsudato preenchendo os espaços aéreos alveolares, hipertrofia da parede alveolar, descamação das células epiteliais e presença de macrófagos (CERÉ *et al.*, 1997a; CERÉ *et al.*, 1997b; BONFIM & LOPES, 1997). Lesão extra pulmonar pode ocorrer em vários órgãos, tais como: linfonodos, timo, baço, fígado e medula óssea (BONFIM & LOPES, 1997).

Em suínos e coelhos, como animais modelos, a pneumocistose se desenvolve espontaneamente (28 dias), sem imunossupressão, podendo a prevalência ser de 80% a 100%. Nos ratos, a infecção ocorre somente com a administração prolongada (6 a 14 semanas) de corticóides e em associação a uma dieta hipoprotéica (HUGHES, 1989; CERÉ *et al.*, 1997a; EVANS, *et al.*, 1998; CERÉ & POLACK, 1999).

Através dos estudos com animais experimentais observou-se a transmissão via aérea e também via placentária, semelhantemente ao que ocorre em humanos (LATOUCHE, *et al.*, 1997; CERÉ & POLACK, 1999; DEI-CAS, 2000). A transmissão entre espécies, foi considerada improvável, descartando-se um papel zoonótico do *Pneumocystis* sp. (DEI-CAS *et al.*, 1998; LAAKKONEN, 1998; DEI-CAS, 2000).

A forma epidêmica de pneumonia por *Pneumocystis* spp. em animais é comparável com a das crianças a qual, está associada com hipogamaglobulinemia fisiológica e desnutrição principalmente causada pela diarreia (HUGHES, 1989).

2.1.2.1 Epidemiologia em suínos

Em suínos os surtos epidêmicos ocorrem geralmente imediatamente após o desmame, quando os leitões desmamados vão para a creche, ocorrendo estresse, superpopulação e troca de alimentação (SETTNES *et al.*, 1991). Nestes casos, o índice de pneumocistose pode chegar a 44,4% com retardo de crescimento dos animais (FUJITA *et al.*, 1989), ocasionando prejuízo econômico.

Pneumocystis sp. foi primeiramente diagnosticado em leitões em 1958 (*apud* BILLE-HANSEN *et al.*, 1990), e posteriormente em 1967 e 1968 (*apud* SETTNES *et al.*, 1991). Em 1973, 3,6% dos suínos examinados na República Checa estavam infectados por *Pneumocystis* sp. (*apud* SETTNES *et al.*, 1991). Em 1977, a pneumocistose foi descrita nos Estados Unidos (SEIBOLD & MUNNELL, 1977), em 1989 no Japão (FUJITA *et al.*, 1989). Na Dinamarca em 1990, num rebanho de leitões de 4 a 10 semanas, foram observados animais com baixo peso, ocorreu dispnéia e morte diagnosticada por pneumocistose (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; SETTNES *et al.*, 1991). No Japão (1993), foi relatado um surto de pneumonia por *Pneumocystis* sp. em 40 leitões (rebanho de terminação) durante 18 meses (KONDO *et al.*, 1993) e associação com a Síndrome Respiratória e Reprodutiva suína (PRRS) (KONDO *et al.*, 1997). No mesmo país, um estudo imunohistoquímico em pulmões obtidos de 245 suínos ocorridos entre 1988 a 1995, encontrou-se 35,5% de *Pneumocystis* em animais na faixa etária de 17 dias a 7 meses de idade, enquanto que nos de 1 a 3 meses a pneumocistose foi de 63% (KONDO *et al.*, 2000).

Por outro lado, Sato *et al.* (2000), em trabalho com 220 suínos oriundos de 49 granjas, detectaram a presença de Circovirose em 42 suínos, sendo que em 8 (19%) foram detectados *Pneumocystis* (SATO *et al.*, 2000). Esses achados evidenciam a infecção por *Pneumocystis carinii* em suínos jovens, e que fatores como estresse, desmame precoce e co-infecções que causam imunodepressão predispõem à enfermidade.

2.1.3 Taxonomia

Após mais de 80 anos de dúvidas, o *Pneumocystis* foi considerado como fungo. O organismo possui estrutura similar e colorações características dos fungos. Análises bioquímicas da parede

demonstraram β -1,3-glucano, um componente comumente encontrado na parede de leveduras (SU & MARTIN, 1994).

Métodos moleculares demonstraram a relação antigênica entre polissacarídeos da parede celular do *Pneumocystis* spp. e do *Aspergillus fumigatus*, observando semelhança do RNA ribossômico (rRNA) e a presença de sistemas de organelas pouco desenvolvidas, similar aos dos fungos.

A prova definitiva para classificação como fungo, veio da análise filogenética do rRNA (molécula 16S), o qual permitiu sua inclusão na classe *Ascomycota* e a criação de uma nova família *Pneumocystidaceae* e ordem *Pneumocystidales* (SU & MARTIN, 1994; ARMENGOL, 1995; CAILLIEZ *et al.*, 1996; STRINGER, 1998; CUSHION, 1998).

Apesar das semelhanças morfológicas entre os *Pneumocystis* isolados de animais e de seres humanos, ocorrem variações genotípicas e fenotípicas em relação aos antígenos de superfície e ao genoma, sugerindo a existência de espécies ou cepas diferentes. Em 1994 foi estabelecido o grupo chamado forma especial (f. sp.), classificando-os como: *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* Rat, *Pneumocystis carinii* f. sp. *rattus* Rat, , *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* Human, *Pneumocystis carinii* f. sp. *mustelae* Ferret, *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* Mouse, *Pneumocystis carinii* f. sp. *equi*. Horse, *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* Pig, *Pneumocystis carinii* f. sp. *orytolagi* Rabbit (BARRTLETT *et al.*, 1994; CAILLIEZ *et al.*, 1996; STRINGER, 1998; FRENKEL, 1999).

Em 1999, Frenkel sugere o nome do *Pneumocystis jirovecii*, sendo este revisado pelo International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) e International Code of Zoological Nomenclature (ICZN) (REDHEAD *et al.*, 2006).

Em 2004, os nomes de *Pneumocystis* ocorreram mudanças como: *Pneumocystis carinii* f. sp. *rattus* passou a chamar *Pneumocystis carinii* f. sp. *rattis* e em 2005, *Pneumocystis wakefieldiae* Cushion *et al.* 2004 (CUSHION, 2004; CUSHION *et al.*, 2005).

Segundo recomendações do *Pneumocystis* working grupo, deve ser usando os nomes das subespécies, e retirando o termo *formale speciales* (f. sp) (STRINGER *et al.* 2001), estabelecendo assim: *P.c. griseus* (de *Hapalemur griséus*), *P.c. macaca* (*Eulemur macaca*), *P. c. aotus* (*Aotus nancymai*), *P. c. geoffroyi* (*Callimico goeldii*), *P.c callithrix* (*Callithrix jacchus*), *P. c. pithecia* (*Pithecia pithecia*), *P. c. imperador* (*Saguinus imperator*), *P. c. oedipus* (*Saguinus oedipus*), *P. c. nigroviridis* (*Alouatta nigroviridis*), *P. c. hamlyni* (*Cercopithecus hamlyni*), *P. c nictitans* (*Cercopithecus nictitans*), *P. c. fasciculatis* (*Macaca fascicularis*), *P. c. mullata*

(*Macaca mulatta*) e *P. c. neestrina* (*Macaca nemestrina*) (HUGOT *et al.*, 2003; REDHEAD, *et al.*, 2006).

2.1.3.1 Heterogeneidade genética do *Pneumocystis* spp.

Diferenças encontradas na análise do DNA permitiram, formular um padrão de três níveis de divergências.

Um nível de menor divergência (classe I), ocorrendo entre isolados de espécies de *Pneumocystis* de hospedeiros iguais, por exemplo, seqüências diferentes no ITS de *P. jirovecii*. Um nível intermediário de divergências (classe II), observado entre isolados de *Pneumocystis*, de duas formas especiais em pulmões de ratos, *P. carinii* sensu auct. (antigo *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*) e *P. wakefieldiae* (antigo *Pneumocystis carinii* f. sp. *rattus*), e também de derivados de camundongos, *P. murina* (antigo *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris*). O nível mais alto de divergências (classe III), observado entre isolados de espécies oriundas de hospedeiros diferentes, como os *P. jirovecii*, *P. carinii* sensu auct. e *P. oryctolagi* (WAKEFIELD, 1998).

Análises da subunidade maior do gene mitocondrial rRNA (mtLSU) do *Pneumocystis* demonstraram uma situação complexa. Após o seqüenciamento do DNA de *Pneumocystis* de leitões e alinhamento com as seqüências de espécies de *Pneumocystis* de hospedeiros diferentes, verificou-se a ocorrência de 20% de divergências com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*, 21% com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *rattus*, 15% com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris*, 17% com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* (*jirovecii*), 16% com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *oryctolagi* e 10% com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *equi*. Estes resultados indicaram que *Pneumocystis* derivados de suínos, mostra uma melhor homologia com o *Pneumocystis carinii* f. sp. *equi* (WAKEFIELD *et al.*, 1997).

Recentemente foram encontradas divergências genéticas em primatas não humanos do novo mundo e velho mundo, possibilitando a identificação de várias espécies de *Pneumocystis* entre eles (DEMANCHE *et al.*, 2001) e uma descrição completa da filogenia de espécies de *Pneumocystis* com seus respectivos hospedeiros (GUILLOT *et al.*, 2001), demonstrando assim, que as pesquisas ainda não desvendaram toda a complexa família *Pneumocystidaceae*.

2.1.4 Ciclo evolutivo

Atualmente, a caracterização da natureza fúngica do *Pneumocystis* impõem a substituição da terminologia de cistos, corpos intracísticos e trofozoítas (baseados na antiga classificação entre os protozoários) respectivamente por ascos, esporos e celulares leveduriformes (HANAMO & KAUFMANN, 1998).

Nos ascos, foram identificados quatro estágios: pré-asco, asco maduro, asco rompido vazio e colapsado, participando da fase sexual do organismo (CUSHION, 1998).

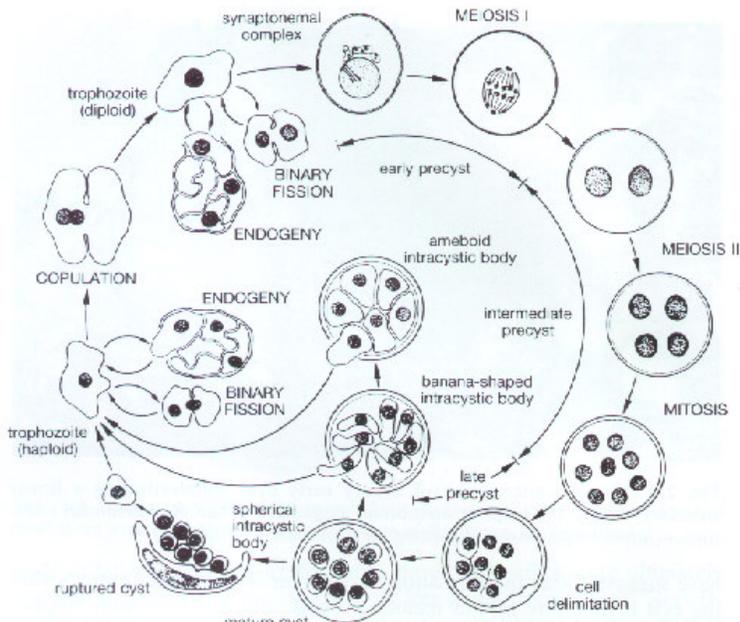
O asco maduro é intacto, esférico e mede 4-6 μm de diâmetro, sua superfície pode ser totalmente lisa ou ligeiramente rugosa. Possui uma parede grossa de 0,1 a 0,3 μm de espessura constituída por três camadas.

Os ascos contem 1 a 8 esporos ou endósporos de 1 a 1,5 μm de diâmetro, esférico, semi lunares ou amebóides, delimitados por uma membrana unitária que está em íntimo contato com a camada interna da parede do asco. Ao romper-se perde seu aspecto arredondado ficando com uma estrutura vazia em meia lua. Os ascos são resistentes ao ambiente e podem sobreviver por 7 meses, tornando-se a forma principal de transmissão (DEI-CAS *et al.*, 1998).

Na célula leveduriforme encontra-se três estágios morfológicos: uma forma reprodutiva, uma célula leveduriforme pequena e uma grande que participam da fase assexuada do organismo.

Os ascos como forma infectante, são transmitidos por via aérea de um hospedeiro susceptível a outro, adquiridos por inalação, alcançam os alvéolos pulmonares, rompem-se liberando 8 esporos haplóides. Destes originam os esporos diplóides, que aderem à parede dos pneumócitos tipo I e se diferenciam em pré-asco, na qual ocorrem duas meioses, formando quatro núcleos haplóides. Os pré-ascos desenvolvem-se em ascos após sofrerem espessamento das paredes e mitoses, resultando na formação de oito esporos haplóides individualizados. Quando os ascos se rompem, liberam os esporos haplóides, que se conjugam formando esporos diplóides, dando início ao ciclo. Os detalhes da dinâmica das meioses, mitoses e conjugação não são bem conhecidos (ROSSEL & GOTTLIEB, 1985; YOSHIDA, 1989; ODDÓ, 1990; FELDMAN, 1992; CUSHION, 1998; DEI-CAS *et al.*, 1998; DUARTE & OLIVEIRA, 1998; HANANO & KAUFMANN, 1998).

Fig 1 – Ciclo evolutivo *Pneumocystis carinii*. Fonte: HOPKIN, 1991.



2.1.5 Patogenia

Após ser inalado, o *Pneumocystis*, alcança os alvéolos e adere à parede dos pneumócitos tipo I, através da ligação de suas lecitinas aos receptores de manose e frutose, ou aos receptores Fc da superfície das células pulmonares. Essa aderência é dependente da integridade do citoesqueleto dos pneumócitos, sendo facilitada pela presença da fibronectina ou vitronectina, substâncias da matriz extracelular que funcionam como ponte entre célula hospedeira e as glicoproteínas do agente. Nesta fase não ocorre inflamação septal, resposta celular e sintomas clínicos (DUARTE & OLIVEIRA, 1998).

Após a adesão, os microorganismos sobrevivem e multiplicam-se no espaço extracelular, obtendo nutrientes do fluido alveolar, ficando os pulmões congestionados com o número de organismos e com um exsudato espumoso alveolar. Ocorre espessamento dos capilares alveolares pela formação de células subepiteliais e desnaturação da membrana, seguida de degeneração dos pneumócitos tipo I por necrose nos pontos de adesão, entre essa célula e os ascos e células leveduriformes de *Pneumocystis*. Conseqüentemente, observa-se hiperplasia

reparadora de pneumócitos tipo II, aumento da permeabilidade alvéolo capilar e exsudação de proteínas para a luz alveolar, formando uma matriz eosinofílica espumosa neste local, com um infiltrado inflamatório intersticial, composto por linfócitos e macrófagos. Lectinas solúveis, secretadas pelo fungo e pelas células de revestimento alveolar, contribuem para a formação da matriz espumosa (ROSSEL & GOTTLIEB, 1985; HUGHES & ANDERSON, 1991; FELDMANN, 1992; CAILLIEZ *et al.*, 1996; SÚ & MARTIN, 1994; SANTAMAURO & STOVER, 1997; DUARTE, & OLIVEIRA, 1998; HANANO & KAUFMANN, 1998).

Neste estágio, a presença de degradação de células, o aumento do número de ascos e a liberação de enzimas degradativas pelo *Pneumocystis*, induzem a produção e liberação de mediadores de fagócitos, sendo um deles o fator α (TNF- α), que tem a função de ativar a migração de macrófagos para a região afetada (SU & MARTIN, 1994).

Os macrófagos alveolares se ligam ao *Pneumocystis* através de mecanismo receptor-ligante, realizam a fagocitose e ativam o metabolismo oxidativo macrofágico, o que provoca rápida destruição dos microorganismos fagocitados. Anticorpos específicos funcionam, provavelmente, como opsoninas, aumentando a capacidade de fagocitose do agente pelos macrófagos. Neutrófilos humanos, também, são capazes de fagocitar “*in vitro*” o *Pneumocystis*, opsonizado por anticorpos específicos. Porém, não está estabelecido o verdadeiro papel dessas células na doença humana, sendo o macrófago a principal célula efetora contra o *Pneumocystis* (CAILLIEZ *et al.*, 1996).

Estudos em modelos experimentais e a observação da resposta imunitária em pacientes que desenvolvem pneumocistose, indicam que a imunidade celular, principalmente as células T CD4+, são essenciais no controle da infecção pelo *Pneumocystis*.

O efeito terapêutico de soro hiperimune e de anticorpos específicos em animais infectados, assim como a doença em indivíduos com defeitos das células B, sugere que a imunidade humoral também participa dos mecanismos de defesa contra a doença (KOVACS *et al.*, 1988).

2.1.6 Manifestações clínicas em animais

A pneumocistose nos animais, assemelha-se à pneumocistose epidêmica em crianças. Os sinais clínicos se caracteriza por apatia, rápido comprometimento respiratório (pneumonia intersticial difusa ou focal), dispnéia, tosse não produtiva, diarreia não específica, perda de peso, e por fim morte (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DEI-CAS *et al.*, 1998). Em suínos, coelhos e eqüinos, a pneumonia ocorre após a presença de fatores como, estresse e diminuição da imunidade. A gravidade da doença está relacionada com a idade e o desmame precoce. Em coelhos, pode ocorrer o aparecimento da pneumonia um mês após o nascimento; em potros e suínos, geralmente ocorre entre um a 3 meses de vida (DEI-CAS *et al.*, 1998) e em cães (8 meses a 2 anos), a doença pode cursar com dispnéia, cianose e evolução fatal (CERÉ & POLACK, 1999).

2.1.7 Diagnóstico

2.1.7.1 Diagnóstico em humanos

O diagnóstico laboratorial definitivo ainda depende da identificação morfológica do *P. jirovecii*.

O diagnóstico clínico da pneumocistose não é específico e os sinais clínicos são comuns a outros quadros patológicos, posto que muitos abrigam infecções por outros organismos.

O quadro radiológico orienta, mas não é específico e a sorologia revela dificuldades devido à imunossupressão ou deficiência subjacente. A antigenemia é constante em portadores sãos e em enfermos com infecções pulmonares de outras etiologias, dada a presença universal de *Pneumocystis* em pulmão. Com isto, o diagnóstico é baseado na identificação microscópica de ascos e células leveduriformes em secreções ou tecidos pulmonares, utilizando-se colorações especiais. Outras técnicas são utilizadas, as quais empregam anticorpos monoclonais e ou pesquisam ácidos nucleicos do *Pneumocystis* como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (FELDMAN, 1992; RAAB *et al.*, 1994; HENN & BARRETO, 1998).

O diagnóstico morfológico de *Pneumocystis*, é estabelecido em amostras obtidas por métodos não invasivos ou menos invasivos, como o escarro induzido, escarro sem indução (3 amostras, em humanos), secreções faríngeas, traqueais, gástricas e lavado brônquico (GOTTLIEB & REYES, 1982; HARTMAN *et al.*, 1985; MURRAY & MILLS, 1990; FELDMAN, 1982; RAAB *et al.*; 1994; KROE *et al.*, 1997; SANCHES, 2001). O diagnóstico também pode ser feito através de técnicas invasivas, como a biópsia transbrônquica ou brônquica, a biópsia a céu aberto e por último a autópsia (HENN & BARRETO, 1998).

Independente da técnica histoquímica utilizada para identificar alguns dos estágios do *Pneumocystis*, a positividade destes exames varia segundo o tipo de amostra examinada. A positividade do exame do escarro induzido é em torno de 55-92%, o fluido do lavado broncoalveolar tem positividade próxima a 100% em indivíduos sem quimioprofilaxia. Quando em uso de quimioterapia ou quimioprofilaxia, muitas vezes a biópsia transbrônquica pode ser necessária.

A biópsia transbrônquica, biópsia a céu aberto e autópsias detectam 100% de positividade para a detecção do *Pneumocystis*. A principal desvantagem é a necessidade da anestesia geral e o risco inerente ao procedimento cirúrgico, podendo provocar hemorragia e pneumotórax, devendo sua utilização ser a última alternativa (HENN & BARRETO, 1998).

O lavado broncoalveolar tem sido mais seguro e realizado com sucesso, especialmente em pacientes aidéticos, onde se encontra o organismo em abundância. O lavado broncoalveolar em crianças é utilizado, após dois meses de idade e o lavado gástrico por ser um procedimento rápido e rotineiramente empregado para detecção de outras patologias como a tuberculose, foi aconselhado como método eficaz para confirmação de diagnóstico (RAAB *et al.*, 1994; SANCHES *et al.*, 2003).

Observa-se um aumento no nível (83 a 100%) de desidrogenase láctica (LDH) nos casos de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*. Deve-se observar também que a LDH aumenta em problemas hepáticos, em pneumonia bacteriana e em tuberculose pulmonar ou disseminada. Estas patologias deverão ser excluídas antes de se pensar em pneumonia por *Pneumocystis*. A LDH pode ser um controle de qualidade durante o tratamento da pneumocistose, devido seu nível decrescer durante o tratamento (HOPEWELL, 1988; KROE *et al.*, 1997; THOMAS & LIMPER, 1998).

2.1.7.2 Diagnóstico em animais

Atualmente secreções pulmonares (lavado broncoalveolar) estão sendo utilizadas para a detecção do diagnóstico da Pneumocistose em animais, mas a maioria dos diagnósticos ainda utiliza tecidos pulmonares provenientes de necropsia (DEMANCHE *et al.*, 2001; LOBETTI, 2001; GUILLOT *et al.*, 2003).

2.1.7.3 Diagnóstico por colorações convencionais

O padrão ouro do diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis* spp. é a observação direta do microrganismo (células leveduriformes e ascos) nos materiais de origem respiratória, após colorações específicas (Giemsa, azul de toluidina, Grocott) ou imunofluorescência indireta (DEI-CAS *et al.*, 1998; AGOSTINI *et al.*, 2000).

As colorações têm sido altamente empregada para visualização dos ascos e células leveduriformes do *Pneumocystis* spp. Estas formas podem ser detectadas pelo Wright-Giemsa modificado (Diff-Quik), Gram-Weigert ou coloração Hematoxilina-Eosina. Ascos podem ser corados com Grocott ou azul de toluidina. A coloração de Diff-Quik em comparação com o Grocott é eficaz e vantajosa por ser um processo mais rápido e menos oneroso. A técnica de hematoxilina-eosina mostra-se menos eficaz na detecção do *Pneumocystis* (KOVACS *et al.*, 1988; MURRAY & MILLS, 1990; ODDÓ, 1990; BENAVIDES, 1991; HUGHES & ANDERSON, 1991; RAAB *et al.*, 1994; TILEY *et al.*, 1994; DEI-CAS *et al.*, 1998).

A coloração pela prata metenamina (Grocott) é o método bastante utilizado, por ser sensível e específico. Esta técnica é considerada padrão-ouro para fungos, e por esta razão é preciso se ter muita atenção na identificação de grumo característico de *Pneumocystis* spp, para diferenciá-los, por exemplo, das formas de *Candida* spp. (presença de gemulação) e *Histoplasma capsulatum* (BIGBY *et al.*, 1986; WAZIR *et al.*, 1994).

As colorações de Grocott e azul de toluidina, são úteis na demonstração dos ascos do fungo em tecidos, aspirados ou esfregaços (CASANOVA-CARDIEL *et al.*, 1996; BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; NIELSEN *et al.*, 1999).

Na técnica de azul de toluidina o material orgânico é tratado de maneira que o fundo fique claro, devido à ação do reagente sulfato, tirando assim, as interferências e com maior vantagem, por ser

de fácil execução e realização em tempo menor. Nesta técnica as paredes dos ascos de *Pneumocystis* spp. são coradas em lavanda contra um fundo azul (GOSEY *et al.*, 1985; WITELSKY *et al.*, 1987; SETTNES & HENRIKSEN, 1989; FELDMAN, 1992; NIELSEN, *et al.*, 1999; JENSEN, *et al.*, 2001).

A coloração de Gram, apesar de não ser específica, proporciona a visualização das duas formas do parasita (ascos e células leveduriformes), se assemelhando ao Giemsa. (GOSEY *et al.*, 1985; FELDMAN, 1992).

2.1.7.4 Diagnóstico por métodos moleculares

Atualmente se pesquisa o diagnóstico da Pneumocistose através métodos moleculares, baseados na amplificação de regiões específicas do genoma do fungo. Diferentes seqüências do genoma do *Pneumocystis* spp. podem ser usadas como seqüência-alvo específicas para diagnóstico, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é utilizada para amplificar as regiões mitochondrial large subunit rRNA (mtLSU rRNA), mitochondrial small subunit rRNA (mtSSU rRNA) e o internal transcribed spacer (ITS) do gene rRNA (WAKEFIELD, 1998; WEISBROTH *et al.*, 1999).

A PCR é amplamente utilizada para diagnóstico de doenças infecciosas em amostras biológicas, com patogenicidade baixa. Em particular, a nested-PCR usada para amplificar os genes ITS, mtLSU rRNA e mtSSU rRNA é uma ferramenta de alta sensibilidade e especificidade como diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis* spp. (ATZORI *et al.*, 1998). O nested PCR, Touch-Down, PCR Real-Time, PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism technique), possibilitam o encontro do *Pneumocystis* em matérias não invasivos (oral, nasofaríngeal), a distinção de colonização e infecção e a detecção de co-infecção (WAKEFIELD *et al.*, 1997; RAMOS-VARA *et al.*, 1998; DEMANCHE *et al.*, 2001; MURDOCH, 2003).

2.1.7.5 Diagnóstico por anticorpos monoclonais

O emprego de anticorpos monoclonais para secreções ou tecido pulmonar, através da imunofluorescência é muito útil no diagnóstico, pois revela positividade da ordem de 92%. A vantagem da técnica de anticorpos monoclonais é a facilidade de detectar as duas formas do

fungo (ascos e células leveduriformes). As desvantagens são, alto custo e tempo mais demorado do que as técnicas rotineiramente empregadas, dificultando assim sua implantação na rotina laboratorial (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 1996; THOMAS & LIMPER, 1998).

A técnica de imunohistoquímica, com anticorpo monoclonal mostra-se mais sensível e específica, comparando-se com técnicas de colorações convencionais, devido à utilização de anticorpos, para a identificação de antígenos específicos do *Pneumocystis* spp., e é freqüentemente utilizada em pesquisa com ratos, humanos (WAZIR, *et al.*, 1994, WAZIR, 2004), primatas, eqüinos (JENSEN *et al.*, 2001) e suínos (KONDO *et al.*, 2000; JENSEN *et al.*, 2001), mostrando-se 2,5% mais sensível que o Grocott e 7,6% mais sensível do que o Giemsa (WAZIR *et al.*, 1994, WAZIR & ANSARI, 2004).

2.1.7.6 Diagnóstico macroscópico nos pulmões

São observados pulmões pálidos, aumentados, difusamente consolidados ou com áreas de consolidação cinzas e hepatóides (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; NIELSEN *et al.*, 1999; JENSEN *et al.*, 2001).

2.1.7.7 Diagnóstico histopatológico nos pulmões

Nos pulmões com consolidações focais e ou difusa, os achados histológicos possuem características de pneumonia intersticial crônica, sub-crônica ou difusa, com espessamento dos septos e infiltrado com linfócitos, células plasmáticas (hiperplasia dos pneumócitos tipo II), macrófagos, material fibrinoide eosinofílico (tipo favo de mel) e presença de *Pneumocystis* (SETTNER & HENRIKSEN, 1989; SETTNER *et al.*, 1991; RAMOS-VARA *et al.*, 1998; KONDO *et al.*, 2000; HAGIWARA *et al.*, 2001).

2.1.7.8 Cultivo

Até o momento não foi possível isolar em cultivo o *P. carinii*, mas estudos com células de pulmão A549 foram realizados para estudar a interação do parasita com as células do hospedeiro (LIMPER *et al.*, 1997).

2.1.8 Modelos animais

Apesar do fungo já ter sido descrito em numerosos mamíferos, a pneumonia por *Pneumocystis* spp. (PCP) como modelo experimental, utiliza ratos, camundongos, coelhos e mussuranho. Os ratos necessitam ser tratados com corticosteróides por 9-12 semanas para desenvolverem a pneumonia e serem utilizados como modelos (HUGHES, 1989; DEI-CAS *et al.*, 1998; EVANS *et al.*, 1998; LAAKKONEN, 1998; CERÉ & POLACK, 1999; DEI-CAS, 2000).

Os coelhos desenvolvem pneumonia espontânea por *Pneumocystis* sp. no desmame e sem administração de corticoterapia. Por esta razão, são usados para estudo da resposta imune como as interações entre *Pneumocystis* e surfactantes. Suínos e eqüinos também desenvolvem pneumonia espontânea. Experimentos utilizando corticóides em leitões, provocaram intensa pneumocistose e foi sugerido esta espécie como modelo a ser utilizado (DEI-CAS *et al.*, 1998; NIELSEN *et al.*, 1999). O *Pneumocystis* foi detectado em muitos primatas não humanos, e servem de estudos para compreensão da infecção humana e possível co-evolução (DEMANCHE, *et al.*, 2001; GUILLOT *et al.*, 2001; HUGOT *et al.*, 2003).

As inoculações nos modelos animais são geralmente por via intratraqueal com homogêneos de fungos viáveis, derivados de pulmões. A pneumocistose pode ser induzida entre 5-7 semanas, embora sejam necessárias de 9-12 semanas para o total desenvolvimento da infecção (DEI-CAS *et al.*, 1998).

2.2 Círcovirose em Suínos

A Círcovirose suína, descrita anteriormente como Síndrome do Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados (SDMSD) ou Síndrome da Refugagem multissistêmica (SRM), está relacionada com a presença do círcovírus suíno tipo 2 (PCV2), desde 1996 (DAFT *et al.*, 1996; CLARK, 1997). Em 1982, o vírus foi classificado como sendo DNA fita simples com forma circular e covalentemente ligada nas duas extremidades, razão pela qual foi sugerida sua inclusão em um novo gênero, denominado *Circovirus*. No início da descoberta não foi considerado patogênico, devido à ausência de doença clínica (TISCHER *et al.*, 1986), apesar de

sua alta capacidade de difusão em granjas de suínos (DULAC & AFSHAR, 1989, TISCHER *et al.*, 1995).

Em 1998 foi seqüenciado o genoma do vírus e estabeleceu-se a existência de dois tipos de circovirus. Foi sugerida a nomenclatura de circoviurs tipo1 (PCV1) para amostras apatogênicas e circovirus tipo 2 (PCV2), para amostras virais ligadas à SDMSD e à doenças associadas (HAMEL *et al.*, 1998; MEEHAN *et al.*, 1998).

Entre os anos 1999 e 2000, os experimentos com PCV2 reproduziram a forma clínica da doença, apresentada antes somente em campo, mas foram inoculados juntamente com o parvovírus suíno (PPV) ou com o vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (VSRRS) (ALLAN *et al.*, 1999, ALLAN & ELIS, 2000; ROVIRA *et al.*, 2002). No ano de 2001, a doença clínica em suínos foi reproduzida com inoculação única de PCV2. Atualmente, o PCV2 é considerado como o agente causador da Síndrome de Definhamento Multissistêmico (SDM) ou Síndrome de Refugagem Multissistêmica (SRM) ou Circovirose e está associada à outras formas clínicas e patológicas, como a Síndrome de Dermatite e Nefropatia (SDN), complexo de doença respiratória (CDRS), tremor congênito tipo A2 e distúrbios reprodutivos e entéricos (BOLIN *et al.*, 2001; HARMS *et al.*, 2001, THACKER, 2001; CHAE, 2005).

2.2.1 Epidemiologia

A Circovirose tem distribuição mundial (SEGALÉS & DOMINGO, 2002b), caráter endêmico e atualmente é a maior responsável pela refugagem em rebanhos suínos (CHAE, 2004). Inicialmente a circovirose suína data de 1991, na província de Saskatchewan, oeste do Canadá (HARDING & CLARK, 1997). Na Califórnia (1996), a doença inicialmente ocorreu em suíno de 6 semanas, com linfadenopatia generalizada e pneumonia intersticial. A partir de então, a doença foi diagnosticada em várias regiões dos Estados Unidos. Na França, manifestou-se em suínos de 2-3 meses de vida, causando atraso no crescimento e alta mortalidade nos animais. Posteriormente, em 1997 foram diagnosticados os primeiros casos de circovirose suína na Espanha sendo hoje considerada neste País, uma doença enzoótica (MANKERTZ *et al.*, 2000; SEGALÉS & DOMINGO, 2002a). No decorrer dos anos, observou-se disseminação da enfermidade na Inglaterra (KENNEDY *et al.*, 1998), Japão (ONUKI *et al.*, 1999), Dinamarca (ALLAN *et al.*, 1999), Holanda (WELLENBERG *et al.*, 2000), Alemanha, Áustria, Lituânia,

Bélgica (OHLINGER *et al.*, 2000), Grécia (KYRISKIS *et al.*, 2000), Hungria (KISS *et al.*, 2000), México (TRUJANO *et al.*, 2001) e Suíça (*apud* SEGALÉS & DOMINGO, 2002a).

No Brasil em 2001, o PCV2 associado com a SRM foi diagnosticado no estado de Santa Catarina, em leitões provenientes de uma granja onde ocorria emagrecimento progressivo dos suínos na creche. Análises histopatológicas de órgãos afetados comprovaram o diagnóstico de lesões compatíveis com SRM. A presença de antígenos e DNA de PCV2 foi confirmada pela técnica de imunoperoxidase em monocamada (IPMA) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) respectivamente (ZANELLA & MORÉS, 2001). Foram também detectados, no Laboratório de Sanidade Suína da Faculdade de Veterinária e Zootecnia/USP e do Laboratório de Suínos do Instituto Biológico (Estado de São Paulo) durante o ano de 2002, 86 amostras positivas de animais em fases de creche e crescimento/terminação, oriundas de diferentes Estados Brasileiros (Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e São Paulo). A presença do PVC1 e PCV2 nestas amostras, concluem a circulação dos vírus na população de suínos nas diferentes fases de criação, podendo ser detectado inclusive, em animais na fase de abate (CASTRO *et al.*, 2003).

Na região Sudeste foi detectado surto de circovirose, afetando principalmente suínos desmamados com idade em torno de 4 meses. O estudo baseou-se nos achados epidemiológicos, clínicos e anátomo-patológicos e nas típicas alterações histopatológicas, confirmados pela demonstração através de exame imunohistológico e pelo método do PCR de antígenos e de DNA de PCV-2, respectivamente (FRANÇA *et al.*, 2005)

Na região Centro-Oeste do Brasil, os pesquisadores da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, confirmam a presença de PCV2 em duas regiões criatórias de suínos e demonstram a importância como uma doença emergente no país, cujo diagnóstico e controle se faz urgente e necessário (ARAÚJO *et al.*, 2002).

No Sul do país a SRM associada ao PCV2 mostrou-se freqüente em 55 rebanhos (65%), submetidos ao diagnóstico laboratorial, realizado pelo Laboratório de Sanidade da Embrapa Suínos e Aves de Concórdia, SC (CIACCI-ZANELLA, 2003a) e em um surto em granja produtora de leitões durante 10 meses (CIACCI-ZANELLA, 2003b).

No Estado do Rio Grande do Sul foram detectados casos de Circovirose, diagnosticados através de sintomas clínicos compatíveis com a doença e alterações histológicas encontradas em 8 suínos, destes quatro, provenientes da fase de creche (25 a 65 dias), pertencentes a uma UPL (Unidade produtora de leitão) do Alto Uruguai do RS e 4 suínos em fase de terminação, de

origens diferentes com 80 a 120 dias (PESCADOR *et al.*, 2003). Foram analisados recentemente, no setor de Patologia da Faculdade de Veterinária (UFRGS), 523 suínos com características, clínicas e histopatológicas de Circovirose (CORRÊA, 2006). Na Região do Alto Uruguai (RS) ocorreu a presença da virose em uma granja de porte industrial. A doença também estava relacionada com a infecção de *Haemophilus parasuis* e como infecção secundária associada à candidíase (ZLOTOWSKI *et al.*, 2006).

Devido às ocorrências acima citadas, a Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SDMSD) ou Circovirose, através de sua disseminação adquiriu o status de doença emergente. A enfermidade acomete principalmente suínos entre 5 a 16 semanas de idade e considera-se a transmissão horizontal, por via oronasal, a via mais provável e frequente (ELLIS *et al.*, 1999, KRAKOWKA *et al.*, 2000). Outras vias de contágio como, sêmen, fômites, transmissão vertical (WEST *et al.*, 1999) foram relatadas.

A circovirose suína pode manifestar-se de forma mais grave em granjas de ciclo completo com fluxo contínuo e granjas de terminação de suínos de múltiplas origens, ou seja, a existência de animais de diferentes idades e/ou de diferentes procedências sugere que estes representem fatores de risco associado à ocorrência de circovirose suína. Fatores estressantes como superpopulação de baias e má ventilação, além de ausências de práticas adequadas de manejo, são os fatores mais relevantes associados à presença de circovirose (SEGALÉS & DOMINGO, 2002a). O PCV2 causando imunossupressão em suínos, predispõe ao surgimento de outras patologias, como Pasteurelose, doença de Glässer e Pneumonia Enzoótica, além da instalação patógenos oportunistas, como *Aspergillus* spp, *Chlamydia* spp. , *Pneumocystis carinii* e *Candida albicans* (SEGALÉS & DOMINGO, 2002b, ELLIS *et al.*, 1998, ZLOTOWSKI *et al.*, 2006).

Atualmente não existe tratamento eficaz contra a circovirose. Deve-se portanto, salientar a urgência no controle da disseminação da doença, através de práticas de higiene e manejo adequadas, reduzindo a carga viral, além de melhorias e na nutrição, uma vez que a associação com doenças oportunistas pode comprometer o desempenho dos rebanhos, causando assim maiores perdas econômicas (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2003a).

2.2.2 Taxonomia

A família Circoviridae e Nanoviridae são vírus DNA patogênicos que infectam plantas, pássaros e suínos (LUKERT *et al.*, 1995). Os vírus incluídos na família Circoviridae caracterizam-se por serem vírus pequenos, icosaédrico, não-envelopados, que infectam vertebrados (MANKERTZ & HILLENBRAND, 1997). Esta família está dividida em dois gêneros: o gênero *Circovirus*, onde estão incluídos o PCV1 (porcine circovirus tipo 1) e PCV2 (porcine circovirus tipo 2), o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos (doença viral do bico e da pena) e o circovírus das pombas. O segundo gênero *Gyrovirus*, inclui somente o vírus da anemia dos frangos (CAV). Os vírus de ambos os gêneros apresentam semelhanças com outros dois vírus humanos recentemente descritos, o TT vírus (TTV) e o TTV-like mini vírus (TLMV) (MANKERTZ *et al.*, 2001), que ainda não estão classificados em nenhum gênero.

2.2.3 Patogenia

O antígeno viral de PCV2 está presente principalmente em células histiocíticas e dendríticas, apesar de ocorrer também em células epiteliais e em linfócitos. O DNA de PCV2 é detectado em tecidos de suínos como linfonodos, amígdalas, pulmões, baço, rins, pele e fígado. O agente é encontrado principalmente em mácrofagos, células histiocíticas, dendríticas e células de Kupffer (CIACCI - ZANELLA, 2005).

Os suínos afetados por SDM mostram um aumento de monócitos circulantes, redução de células T (principalmente CD4+, CD8+, CD4+/CD8+), linfócitos B e baixa densidade de granulócitos imaturos quando comparados com suínos saudáveis não infectados com PCV2 (SEGALÉS & DOMINGO, 2002b). Animais afetados por SDM mostram uma diminuição significativa de células linfóides em órgãos tais como tonsila e placas de Peyer, além de infectar células apresentadoras de antígenos e da linha monócito/macrófago (CHAE, 2004). Sendo assim, os suínos apresentam imunossupressão, comprovada pelo aumento da ocorrência de infecções pulmonares ou septicemias pelas bactérias, *Pasteurella multocida* ou *Haemophilus parasuis*, pelos fungos *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus* spp., e *Chlamydia* spp., (CLARK, 1997; CARRASCO *et al.*, 2000; SEGALÉS & DOMINGO, 2002b; SEGALÉS *et al.*, 2003; CHAE, 2004).

Os efeitos da SDM facilitam as infecções secundárias, modificando a apresentação de outras enfermidades primárias, reduzindo o nível sanitário global das granjas e o efeito das vacinações (CIACCI - ZANELLA, 2005).

2.2.4. Manifestações clínicas

A circovirose suína atinge basicamente suínos após o desmame, especialmente em animais de recria e no início da terminação. O quadro clínico caracteriza-se por perda de peso progressiva, sintomas respiratórios (a dispnéia é o sintoma mais freqüente), sintomas digestivos, hipertrofia de linfonodos, anemia e icterícia (ALLAN *et al.*, 1999). A temperatura corporal pode aumentar ligeiramente, porém a febre não é um dado evidente nas granjas com infecção por PCV2. Lesões patológicas incluem as inflamações de vários órgãos, tais como a linfadenopatia, pneumonia intersticial, hepatite, nefrite intersticial e pancreatite (ELLIS & ALLAN, 2000). As lesões macroscópicas em suínos afetados pela circovirose suína são observadas principalmente nos linfonodos e pulmões e, com menor freqüência, no fígado e nos rins (CLARK, 1997; ROSELL *et al.*, 1999). As lesões mais evidentes costumam aparecer nos linfonodos inguinais, mesentéricos, mediastínicos e submandibulares. O pulmão se apresenta não colapsado ou armado, moteado e, em boa parte dos casos, com consolidações crânio-ventrais e com edema interlobular (ROSSEL *et al.*, 1999).

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da circovirose é estabelecido baseado em três critérios: presença da forma clínica compatível com SDM, presença de lesões histopatológicas características e detecção de PCV2 nas lesões dos tecidos (SEGALÉS & DOMINGO, 2002b).

No pulmão geralmente é observada uma pneumonia intersticial de intensidade variável, na maioria dos casos de caráter subagudo. Em casos relativamente crônicos, são observadas lesões de bronquiolite fibrosa obliterante (SOBESTIANSKY *et al.*, 2002).

Histologicamente, circovirose tem duas lesões característica, inflamação granulomatosa e a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmática. A inflamação granulomatosa ocorre nos linfonodos, fígado, baço, tonsila, timo e placas de Peyer. A lesão característica é uma

infiltração inflamatória por células histiocíticas e células gigantes multinucleadas (CHAE, 2004). A presença de inclusões basofílicas esféricas de número e diâmetro variável no citoplasma de células histiocíticas são relevantes para o diagnóstico. No baço, as lesões são menos intensas que nos outros órgãos linfóides, sendo observado um grau variável de depleção linfocitária das bainhas periarticulares, às vezes também com infiltração de histiócitos e em raras ocasiões, com presença de sincícios (células gigantes). Em alguns casos as lesões nos linfonodos são necrotizantes (SOBESTIANSKY *et al.*, 2002).

Foram desenvolvidos diversos métodos de detecção do PCV2 em tecidos de forma a correlacionar sua presença com as lesões microscópicas, os mais utilizados são hibridação *in situ* (HIS) e a imunohistoquímica (IHQ). O ácido nucléico ou o antígeno de PCV2 é detectado usualmente no citoplasma de histiócitos, células sinciciais e outras células do sistema mononuclear fagocítico tais como, os macrófagos alveolares, células de Kupffer e as células dendríticas dos órgãos linfóides (ROSELL *et al.*, 1999; ALLAN & ELLIS, 2000). Esporadicamente, o vírus pode ser detectado em hepatócitos, em células dos epitélios renal e respiratório, endotélios vasculares, linfócitos, células ductulares e acinares pancreáticas, células musculares lisas e enterócitos (MCNEILLY *et al.*, 1999; ROSELL *et al.*, 1999; SIRINARUMITR *et al.*, 2000).

Nos casos de circovirose foi observada, correlação entre a quantidade de ácido nucléico ou antígeno de PCV2 e a gravidade das lesões (ROSELL *et al.*, 1999; QUINTANA *et al.*, 2001, BRUNBORG *et al.*, 2004). Entretanto, também é possível detectar o PCV2 em suínos clinicamente normais; nestes casos, a quantidade de vírus é muito baixa e a intensidade das lesões é muito leve (QUINTANA *et al.*, 2001, BRUNBORG *et al.*, 2004).

O diagnóstico diferencial entre a circovirose suína e demais patologias é importante, principalmente com a forma respiratória da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos suínos (PRRS), devido a sua alta prevalência; sugerindo-se testes sorológicos adequados para tal diferenciação (SEGALÉS *et al.*, 2002). Por outro lado, todas as doenças ou condições patológicas que cursem com atraso no crescimento, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial da circovirose suína (HARDING & CLARK, 1997).

CAPÍTULO 1

Pneumocystis sp. EM SUÍNOS DE ABATE PROVENIENTES DA REGIÃO
SUL E CENTRO-OESTE DO BRASIL.

ARTIGO 1

DETECTION OF *PNEUMOCYSTIS* SP. IN LUNG SAMPLES FROM PIGS IN BRAZIL

Trabalho submetido para publicação na revista *Medical Mycology*

CAVALLINI SANCHES ET AL. --- PNEUMOCYSTIS SP. IN PIGS**DETECTION OF PNEUMOCYSTIS SP. IN LUNG SAMPLES FROM PIGS IN BRAZIL**

E. M. CAVALLINI SANCHES ^{*§}, C. PESCADOR[†], D. ROZZA[†], A. SPANAMBERG^{*}, M. R. BORBA^{*}, A. P. RAVAZZOLO[‡], D. DRIEMEIER[†], JACQUES GUILLOT^ϕ & L. FERREIRO^{*},

Sections of Veterinary ^{}Mycology, [†]Pathology and [‡]Immunology. Departamento de Patologia Clínica Veterinária. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil, [§]Universidade Federal de Mato Grosso and LACEN, Cuiabá, MT, Brazil, ^ϕParasitology-Mycology Service, UMR INRA, AFSSA, ENVA, UPVM BIPAR, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA), Maisons-Alfort, France.*

Correspondence: E.M. Cavallini Sanches, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Setor de Micologia Veterinária, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000 Porto Alegre – RS, Brazil---Tel: 55 51 33166964; Fax: 55 51 33167305; e-mail: cavallini.sanches@ufrgs.br

Abstract

The genus *Pneumocystis* is composed of opportunistic fungi currently considered as specific pulmonary pathogens in humans and other mammals. In pigs, *Pneumocystis* pneumonia (PcP) could cause significant economical losses due to its detrimental effects on growth, food conversion, and carcass and viscera condemnation. This study revealed a prevalence of 36.9% of *Pneumocystis* organisms detected by using Grocott's staining or immunohistochemistry in 564 slaughtered pigs from two geographic regions of Brazil. The prevalence of positive cases was 39.9% and 33.9% in pigs slaughtered in Rio Grande do Sul (RS) and Mato Grosso (MT) states, respectively. Among the positive cases in RS, *Pneumocystis* organisms were observed in 41.9% of 33 histologically normal lungs, and in 58.0% of lungs presenting with histological lesions, whereas in MT, prevalence in normal and abnormal lungs was 36.3% and 63.5%, respectively. Major histopathological findings in lungs with *Pneumocystis* organisms were bronchointerstitial pneumonia (47.6%), suggestive of Enzootic Pneumonia, and interstitial pneumonia (37.9%), compatible with PcP. The results of this survey strengthened the interest of detecting fungal pathogens, besides other infectious agents, and evaluating its financial impact on Brazilian pig industry. Preventive and/or therapeutic strategies should be envisaged in order to minimize incidence of respiratory fungal infection in pigs and associated economic losses.

Keywords: *Pneumocystis*, pigs, pneumonia, slaughterhouse, pig industry.

Introduction

Species of *Pneumocystis* genus, each one of them being specific of one mammal species, have emerged as important opportunistic pulmonary pathogens. Infection by *Pneumocystis* has been intensively studied in humans and laboratory, domestic [1] or wild animals [2]. Morphologically indistinguishable for almost a century, *Pneumocystis* species are being successfully characterized by genomic, karyotypic, isoenzymatic, antigenic and ultrastructural differences [3]. Much of our knowledge about *Pneumocystis* organisms is based on animal models since efficient *in vitro* culture methods are still unavailable [2-8].

Pneumocystis pneumonia (PcP) was first described in young pigs in 1958 [9], to be further reported many times between 1967 and 2001 [10-20]. Pneumocystosis in 12-month old pigs or younger animals was associated with dyspnea and growth retardation, and presence of *Pneumocystis* in lungs, bronchial lymph nodes, liver, spleen, kidney and mesenteric lymph nodes [9]. The presence of *Pneumocystis* organisms has also been reported in weaned piglets with similar clinical expression and related with piglet's exposure to stress factors, such as early weaning, new environment, new penmates, overcrowding and change of diet. Diarrhea and/or jaundice were detected prior to and at the same time of the diagnostic of PcP. It is likely that malnourishment and/or other diseases predisposed the piglets to the development of the lung infection [9, 13]. In herds where suckling and weaned pigs were housed in the same air space, particularly in contiguous pens, more severe infections were observed when compared with those herds where weaned pigs were reared separately from the suckling ones. These findings suggested that *Pneumocystis* organisms are transmitted horizontally between weaned and suckling animals and, that close contact between these two age groups is an important factor in the transmission of the disease [13].

Respiratory diseases not only increases the disposal of infected viscera and carcasses at slaughterhouses but also affects growth and food conversion, which results in significant economical losses to the pig industry [21]. As no information about PcP in pig herds in Brazil is available, the aim of the present survey was to determine the prevalence of *Pneumocystis* infection in slaughterhouses in the Brazilian states of Rio Grande do Sul (Southern region) and Mato Grosso (Mid-Western region).

Material and methods

A total of 564 lungs were obtained between February and March 2003 (summer season) from two slaughterhouses separated one another by about 2000 Km: slaughterhouse A in Rio Grande do Sul (RS), and B in Mato Grosso (MT). The mean age of slaughtered pigs was 5.3 months. At the slaughter line, the absence or presence of lung lesions and the percentage of the area with consolidation was quantified and recorded. Collected lung tissue samples were fixed in 10% formaldehyde. Paraffin wax-embedded specimens were sectioned at 4 μ m and stained with haematoxylin-eosine (H&E) stain, and Grocott methenamine silver (GMS) stain modified for microwave [22].

In order to identify specifically cystic or trophic *Pneumocystis* forms, an immunohistochemical assay was performed using an anti-*Pneumocystis* mouse monoclonal antibody (No 0921, ViroStat, Portland, ME) directed against a carbohydrate epitope expressed in *P. carinii* 200 kDa, 120 kDa, and 55-60 kDa glycoproteins [13]. Tissue sections were incubated overnight in a 1:200-aqueous solution of the antibody preparation, and then revealed by using a streptavidin-biotin immunoperoxidase kit that uses NovaRed chromogen (SK-4800, Vector Labs, Burlingame, CA).

The Chi-square test of independence was used to test the relation between presence of *Pneumocystis* organisms in pig lungs and presence of macroscopic pneumonia or geographic location. A P-value < 0.05 was considered significant.

Results

Among 281 lungs collected in RS, 142 (50.5%) showed macroscopic signs of inflammation and consolidation of different grades of pneumonia. Likewise, among 283 lungs obtained in MT, 141 (49.8%) lungs showed similar lesion patterns. The overall rate of *Pneumocystis* positive samples detected by GMS was 36.9% (39.9% in RS and 33.9% in MT).

Immunohistochemical *Pneumocystis* detection was carried out in 49 (23.6%) lung tissue samples randomly selected out of 208 *Pneumocystis* GMS positive samples. Table 1 shows the prevalence of *Pneumocystis* organisms in both normal and abnormal lungs. The presence of *Pneumocystis* organisms was significantly associated with lung abnormalities ($P < 0.05$) in both

geographic locations (45.8% in RS and 43.3% in MT), though apparently normal lungs showed also *Pneumocystis* organisms in the two sites (33.8% in RS and 24.6% in MT).

The histological analysis of H&E-stained lung tissue sections of 208 *Pneumocystis* positive lung samples revealed that alveolar lumens were frequently filled by foamy, acidophilic honeycomb material, desquamated epithelial cells, macrophages and lymphoid cells (Fig 3, Table 2). Interstitial areas were infiltrated by mononuclear cells with predominance of bronchointerstitial pneumonia (55.5%) in RS, whereas in MT, interstitial pneumonia (37.7%) was the more frequent feature.

The distribution of different type of lesions (Table 2) was quite divergent in lung tissue samples from pigs slaughtered in the two sites ($P < 0.05$). Non-functional pulmonary areas were evident in lungs with macroscopic pneumonia (13.3% of lungs in RS and 9.2% in MT). *Pneumocystis* organisms were more frequently detected in normal lungs in MT than in RS (Table 2).

Discussion

The number of pigs commercially slaughtered in Brazil in 2003 was approximately of 22 million. The climate is classified as tropical for the Mid-Western region and subtropical for the Southern region of the country. The results of the present study showed a high global prevalence of *Pneumocystis* detection (about 37%), though the examined lungs were sampled from clinically healthy animals. The higher prevalence recorded in RS (about 34% and 46% in normal and abnormal lungs versus 25% and 43%, respectively, in MT), suggested that lower average summer temperatures (23°C in RS versus 27°C in MT) might favor *Pneumocystis* transmission in herds. Previous reports suggested also significant differences of PcP prevalence in immunocompromised patients according to weather, ranging from 48-58% (cold weather) to 28-38% (warm weather) [23]. A role of climatic or other environmental factors is further supported by the observation of seasonal variation in *Pneumocystis* carriage in wild rodents and insectivores in Finland [24]. In these hosts, the highest prevalence of *Pneumocystis* organisms was reported in late autumn, with higher precipitation rates [24]. Likewise, the number of macaques with detectable *Pneumocystis* DNA was highly variable from one month to another [25]. In early spring and late summer, the raising in the number of macaques with detectable *Pneumocystis* DNA was clearly associated with higher precipitation rates [25]. In humans, a higher number of

PcP cases was recorded in winter than in other seasons, but no significant differences were found between spring, summer and autumn [26-28]. Although serological studies suggested a relatively high prevalence of asymptomatic *P. jirovecii* infection in most countries, considerable variation between different geographical areas has been reported [29]. Diverse virulence of *P. jirovecii* strains as well as climate could explain such differences [29].

Herd size could also influence the circulation of *Pneumocystis* in pig populations. In 2003, there were 172,396 sows in RS, a number 10 times higher than in MT with 17,977 sows. No data was available about the total number of animals in each herd. Larger herds, especially in overcrowding conditions, are considered as more exposed to horizontal transmission [13].

The severity of subsequent pneumonia appears to be related to the age of pigs. The pneumonia caused by *Pneumocystis* organisms is often preceded by diarrhea [9], which can reach 44.4% prevalence in PcP outbreaks [12].

In table 2, the most remarkable histological feature in lungs with *Pneumocystis* organisms was the presence of bronchointerstitial pneumonia (47.6%). This type of lesion is suggestive of Enzootic Pneumonia caused by *Mycoplasma hyopneumoniae*, a bacteria responsible for serious economic losses to worldwide pig industry. The second type of lesion was interstitial pneumonia (37.9%).

A great deal of information regarding economic losses is based on the inspection of lungs at the time of slaughter. For example, when lesions reach 10% of total lung surface area, a 37-g reduction in daily gain is expected. In the present study, the non-functional lung area was 13.3% in RS and 9.2% in MT, which suggests a significant detrimental effect on daily weight gains. Actually, the mean pig body weight was 67 kg in RS pigs and 81 kg in MT pigs, whereas the expected overall mean body weight in Brazil pigs is 110 kg (± 0.72) [30]. The observations reported in the present work, especially the high prevalence of interstitial pneumonia associated with the presence of *Pneumocystis* organisms, suggest that PcP could have a significant economic importance.

In conclusion, identification and quantification of pig respiratory infections such as PcP in slaughterhouse are needed for defining preventive strategies that could reduce infection prevalence and subsequent losses to pig industry.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Eduardo Dei-Cas, from Institute Pasteur (Lille, France) for providing positive control slides for immunohistochemical study. We are also grateful to Dr. Roberto Medeiros (RS), MAPA-SIPA-MT, Dra Judi M. Nóbrega, Dr. Antônio Franco Barbosa Filho and Martha Merighi (Cuiabá, Brazil). This work was supported by a grant (Processo 472409/2004-02) from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

- 1 Garcia ME, Blanco JL. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Ver Iberoam Micol* 2000; **17**: S2-S7.
- 2 Laakkonen J. *Pneumocystis carinii* in wildlife. *Int J Parasitol* 1998; **28**: 241-252.
- 3 Dei-Cas E, Chabé M, Moukhlis R, Durand-Joly I, Aliout EM, Stringer JR, Cushion M, Noël C, Sybren de Hoog G, Guillot J, Viscogliosi E. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov. an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; **30**: 853-871.
- 4 Hughes WT. Animal models for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Protozool* 1989; **36**: 41-46.
- 5 Dei-Cas E, Brum-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; **22**: 163-168.

- 6 Evans R, Joss AWL, Pennington, TH, Ho-Yen DO. Progression of *Pneumocystis carinii* infection in na animal model. *J Med Microbiol* 1998; **47**: 543-546.
- 7 Ceré N, Polack B. Animal pneumocystosis: a model for man. *Vet Res* 1999; **30**: 1-26.
- 8 Dei-Cas E. *Pneumocystis carinii* infections: the iceberg? *Med Mycol* 2000; **38**: 23-32.
- 9 Bille-Hansen V, Jorsal SE, Henriksen Saa, Settnes OP. *Pneumocystis carinii* pneumonia in Danish piglets. *Vet Rec* 1990; **20**: 407-408
- 10 Settnes OP, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Henriksen SA. The piglet as a potential model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Protozool* 1991; **38**:140S-141S.
- 11 Seibold HR, Munnell JF. *Pneumocystis carinii* in a pig. *Vet Pathol* 1977; **14**: 89-91.
- 12 Kondo H, Taguchi M, Abe N, Nogami Y, Yoshioka H, Ito M. Pathological changes in epidemic porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Comp Path* 1993; **108**: 206-268.
- 13 Kondo H, Hikita M, Kadota K. Immunohistochemical study of *Pneumocystis carinii* infection in pigs: evaluation of *Pneumocystis* pneumonia and a retrospective investigation. *Vet Rec* 2000; **147**: 544-549.
- 14 Christensen CBV, Settnes OP, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Henriksen Saa, Lundgren B. *Pneumocystis carinii* from pigs and humans are antigenically distinct. *J Med Vet Mycol* 1996; **34**: 431-433.
- 15 Kondo H, Kuramochi T, Taguchi M, Ito M. Serological studies on porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia: kinetics of the antibody titers in swine herds and the association of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Vet Med Sci* 1997; **59**: 1161-1163.

- 16 Wakefield AE, Keely SP, Stringer JR, Christensen CBV, Ahrens P, Peters SE, Bille-Hansen V, Henriksen Saa, Jorsal SE, Settnes OP. Identification of porcine *Pneumocystis carinii* as a genetically distinct organism by DNA amplification. *APMIS* 1997; **105**: 317-321.
- 17 Ramos Vara JA, Lu J-J, da Silva AJ, Montone KT, Pieniasek NJ, Lee C-H, Pérez L, Steficek BA, Craft D, Watson GL. Characterization of natural occurring *Pneumocystis carinii* pneumonia in pigs by histopathology, electron microscopy, in situ hybridization and PCR amplification. *Histol Histopathol* 1998; **13**: 129-136.
- 18 Nielsen J, Bille-Hansen V, Settnes OP. Experimental corticosteroid induction of *Pneumocystis carinii* pneumonia in piglets. *APMIS* 1999; **107**: 921-928.
- 19 Sato K, Shibahara T, Ishikawa Y, Kondo H, Kubo M, Kadota K. Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 2000; **62**: 627-633.
- 20 Jensen TK, Boye M, Bille-Hansen V. Application of fluorescent in situ hybridization for specific diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals and pigs. *Vet Pathol* 2001; **38**: 269-274.
- 21 Silva AF, Paganini FJ, Acosta JC, Rocha, PH, Mistura H, Marcon E, Simon VA, Casagrande HA, Silva MS, Floss JM. Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brasil. In: *Congress of the International Pig Veterinary* 2002, Ames, Iowa, USA, **2**: 332 p.
- 22 Arrington JB. Bacteria, fungi, and other microorganisms In: *Laboratory Methods in Histotechnology*. PROPHET, et al. Armed Forces Institute of Pathology. Washington: Ed. American Registry of Pathology 1992; **21**: 227-228
- 23 Walzer PD. *Pneumocystis carinii*: a historical perspective. *Semin Respir Infect* 1998; **13**: 279-282.

- 24 Laakkonen J, Henttonen H, Niemimaa J, Soveri T. Seasonal dynamics of *Pneumocystis carinii* in field vole, *Microtus agrestis*, and in the common shrew, *Sorex araneus*, in Finland. *Parasitol* 1999; **118**: 1-5.
- 25 Demanche C, Wanert F, Herrenschmidt, N, Moussu C, Durand-Joly I, Dei-Cas E, Chermette R, Guillot J. Influence of climatic factors on *Pneumocystis* carriage within a socially organized group of immunocompetent macaques (*Macaca fascicularis*). *J Euk Microbiol* 2003; **50**: 611-613.
- 26 Miller RF, Grant AD, Foley NM. Seasonal variation in presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1992; **339**: 747-748.
- 27 Vanhems P, Hirschel B, Morabia A. Seasonal incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 1992; **339**: 1182.
- 28 Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, Respaldiza N, de la Horra C, Montes-Cano MA, Calderón EJ. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 770-772.
- 29 Hughes WT. 1998 Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii*. *Semin Respir Infect* 1998; **13**: 283-288.
- 30 Oliveira OLS, Donzele JL, Oliveira RFM, Ferreira AS, Moeta MAS, Generoso RAR, Lisina em rações para suínos machos castrados selecionados para deposição de carne magra na carcaça dos 110 aos 125 Kg. *R Bras Zootec* 2003; **32**: 150-155.

Table 1: Prevalence of *Pneumocystis* organisms in slaughtered pigs with and without pulmonary lesions in the states of Rio Grande do Sul (RS) and Mato Grosso (MT), Brazil, from February to March, 2003.

	Normal lungs		Lungs with macroscopic lesions		Total
	RS	MT	RS	MT	
<i>Pneumocystis</i> positive	47 ^a (33.8%)	35 ^b (24.6%)	65 ^a (45.8%)	61 ^b (43.3%)	208 (36.9%)
<i>Pneumocystis</i> negative	92 (66.2%)	107 (75.4%)	77 (54.2%)	80 (56.7%)	356 (63.1%)
Total	139	142	142	141	564

χ^2 : 14.26 ($P < 0.05$); χ^a : 4.19 ($P < 0.05$); χ^b : 10.94 ($P < 0.05$)

Table 2. Histopathological findings in *Pneumocystis* positive lungs in slaughtered pigs in the states of Rio Grande do Sul (RS) and Mato Grosso (MT), Brazil, from February to March, 2003.

Histopathological findings in <i>Pneumocystis</i> -positive lungs	(RS)	(MT)	TOTAL
	n (%)	n (%)	n (%)
Bronchointerstitial pneumonia*	61 (55.5)	38 (38.8)	99 (47.6)
Interstitial pneumonia	42 (38.2)	37 (37.7)	79 (37.9)
Normal lungs	5 (4.5)	23 (23.5)	28 (13.5)
Lymphohistioplasmocytic interstitial pneumonia	1 (0.9)	-	1 (0.5)
Granulomatous diffuse bronchointerstitial pneumonia	1 (0.9)	-	1 (0.5)
	110	98	208

* χ : 5.78 ($P < 0.05$)

Figure 1. Tissue section of pig lung showing *Pneumocystis* organism (Grocott's methenamine silver stain, x 1000).

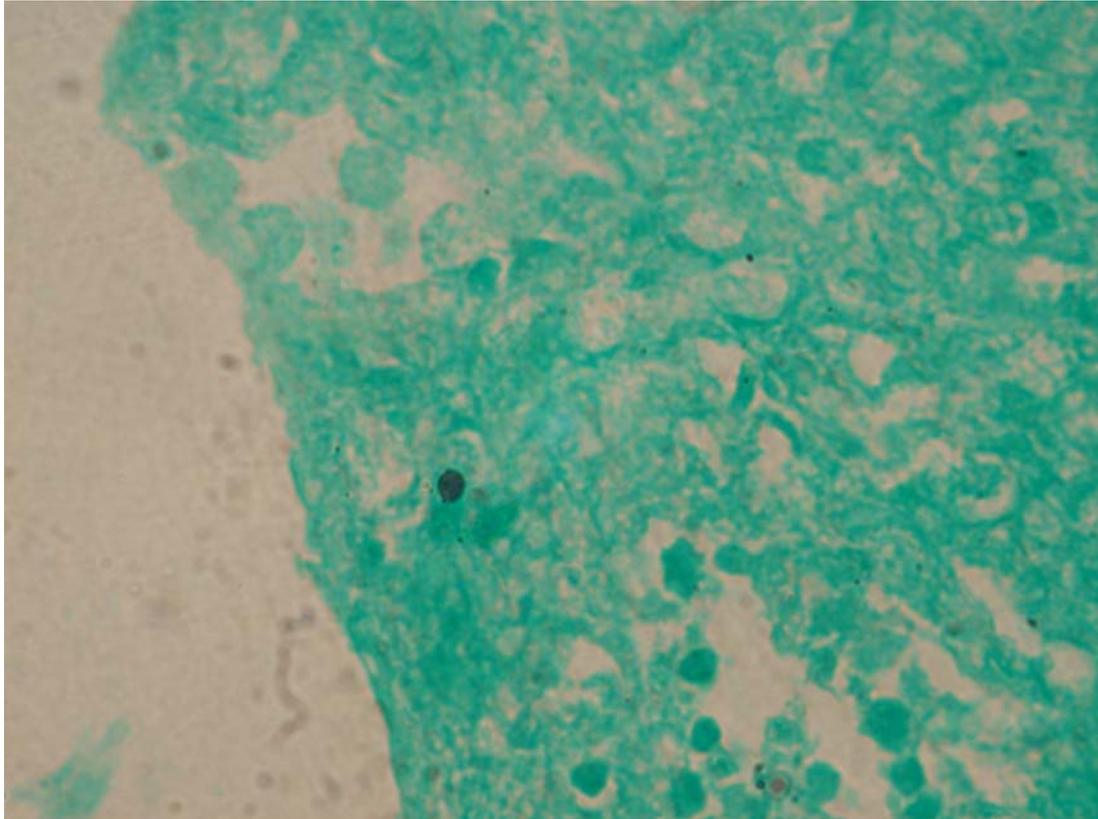


Figure 2. Interstitial pneumonia in a pig associated with *Pneumocystis* cysts strongly labeled by an anti-*Pneumocystis* monoclonal antibody (Lung tissue section, x 1000).

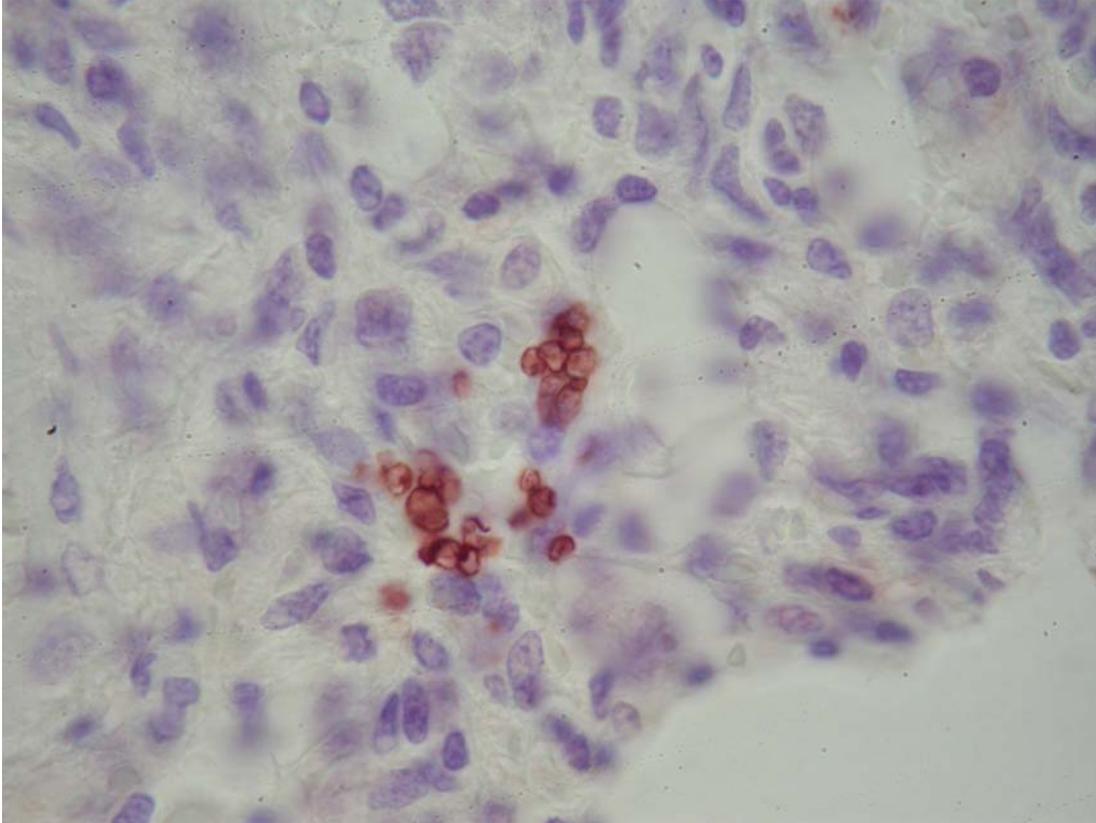
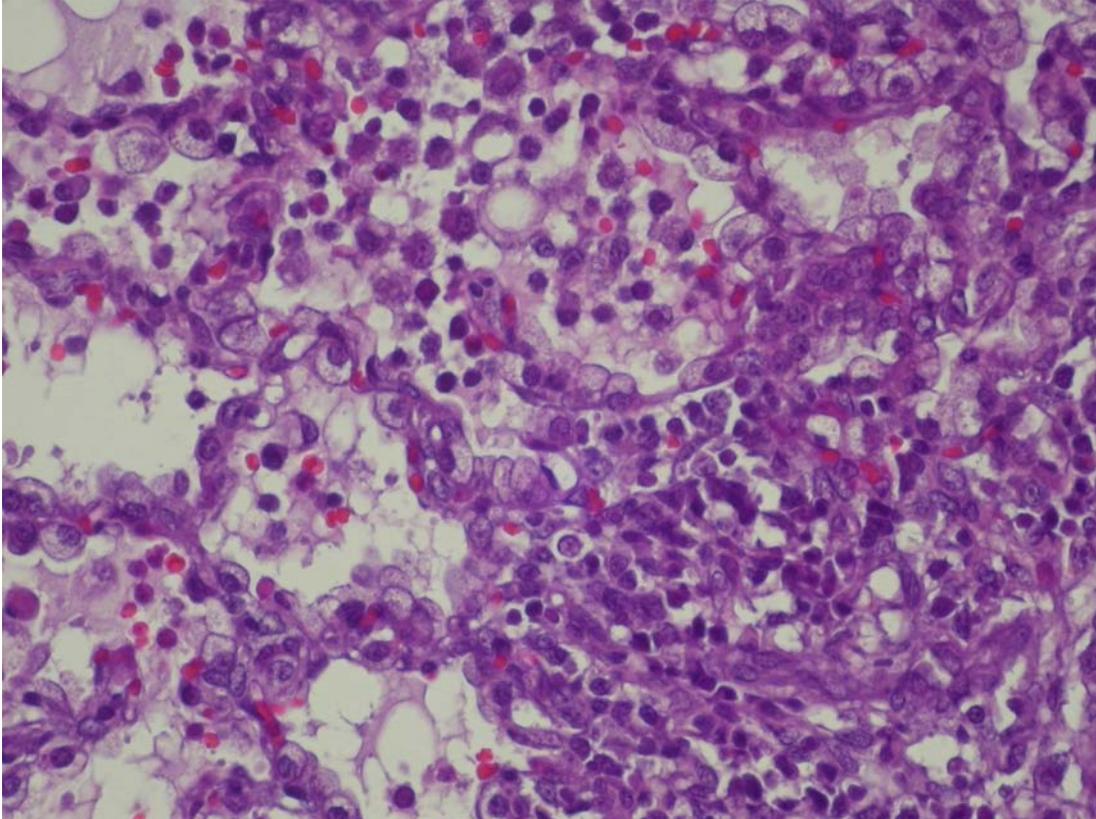


Figure 3. Interstitial pneumonia with well visible type-2 epithelial alveolar cell hyperplasia and non suppurative mononuclear infiltrates (H&E, x 400).



CAPÍTULO 2

**CO-INFECCÃO DE *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* E CIRCOVÍRUS (PCV2)
EM SUÍNOS DE ABATE PROVENIENTES DA REGIÃO SUL E CENTRO-
OESTE DO BRASIL.**

ARTIGO 2

Co-infection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *swis* and Porcine Circovirus-2 (PCV2) in Pig Lungs Obtained from Slaughterhouses in Southern and Midwestern Regions of Brazil.

J.Eukaryot. Microbiol., 53 (S1), 2006. pp S92-S94

CAVALLINI SANCHES ET AL.---*P. CARINII* F. SP. *SUIS* AND PCV2

Co-Infection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* and Porcine Circovirus-2 (PCV2) in Pig Lungs Obtained from Slaughterhouses in Southern and Midwestern Regions of Brazil.

EDNA M. CAVALLINI SANCHES,^a MAURO R. BORBA,^a ANDRÉIA SPANAMBERG,^a CAROLINE PESCADOR,^b LUÍS G. CORBELLINI,^b ANA P. RAVAZZOLO,^c DAVID DRIEMEIER^b and LAERTE FERREIRO^a

Sections of Veterinary ^aMycolology, ^bPathology, and ^cImmunology, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding Author: E.M. Cavallini Sanches, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Setor de Micologia Veterinária, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000 Porto Alegre – RS, Brazil---Telephone number: 55 51 33166964; FAX number: 55 51 33167305; e-mail: cavallini.sanches@ufrgs.br

Respiratory diseases are a major health problem in swine involving several different pathogens often referred to as the porcine respiratory disease complex (PRDC). Porcine circovirus 2 (PCV2) is present in about 22% [10] to 55% [11] of the cases. This virus is now recognized as an endemic pathogen in commercial swine herds worldwide [1]. Although PCV2 might act as a primary agent, pigs infected solely with PCV2 often develop only mild or subclinical illness. Co-infections with other pathogens such as porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), *Pneumocystis* [6, 7], *Aspergillus* spp. [21], *Candida* spp. [27], *Pasteurella multocida*, and *Mycoplasma hypneumoniae* [10, 11] have been reported.

Pneumocystis pneumonia (PcP) was first described in young pigs in 1958 [3], and later in 1967, 1968 [23], 1977 [22], 1989 [12], 1990 [3], 1993 [12], 1995 [14], and 1997 [13]. Pigs younger than 12-months of age exhibit dyspnea and growth retardation leading to significant economic loss [24]. The aim of this work was to verify the co-infection of PCV2 and *Pneumocystis* in swine from two regions of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Specimens. A total of 591 lung samples were obtained between February and March, 2003 (summer) from two slaughterhouses in separate regions of Brazil. Those from the Southern state of Rio Grande do Sul were designated RS, and those from the mid-western state of Mato Grosso was designated MT. Pig lungs were examined; those with lesions were identified and the areas occupied by lesions were measured and recorded as percent of the total lung [17].

Light microscopy. Lung tissues were fixed in buffered solution containing 10% formalin, embedded in paraffin and then 4- μ m sections were prepared for light microscopy. Of the total samples collected, 564 were suitable for *Pneumocystis* detection by light microscopy. *Pneumocystis* organisms were detected by staining with hematoxylin and eosin (H & E);

Grocott's methenamine silver (GMS) technique modified for microwave development [2] was used for staining the walls of cystic forms. Immunohistochemical detection of organisms was also performed using monoclonal antibody directed against a carbohydrate epitope in *P. carinii* 200 kDa, 120 kDa, and 55-60 kDa. glycoproteins (ViroStat, Portland, ME). Tissue sections were incubated overnight in a 1:200 dilution of the antibody preparation and then stained with a streptavidin-biotin immunoperoxidase protocol using Nova Red (Vector Labs, Burlingame, CA) as chromagen.

We were able to perform immunohistochemical analysis on all 591 specimens for PCV2 detection. Lung sections were digested in 0.005 g/10 ml protease XIV for 15 min at 37 °C. The specimens were then incubated with polyclonal rabbit antibody to PCV2 [25] at 1:1,000 dilution for 1 h and stained by the streptavidin-biotin immunoperoxidase technique using diaminobenzidine (DAB).

***Pneumocystis* DNA.** DNA was extracted from 25 randomly selected samples of frozen lung tissues. The presence of *Pneumocystis* DNA was determined by nested PCR at the *mtLSU rRNA* gene. For gene amplification, the primers sets pAZ102H-pAZ102E and pAZ102X/R1-pAZY/R1 were used [27]. Thermocycling conditions for the first PCR round were as follows: each cycle consisted of denaturation for 1.5 min at 94 °C, annealing for 1.5 min at 55 °C, and extension for 2 min at 72 °C; 40 cycles were included in the protocol. The second round of PCR was performed with the primer pair pAZY/R1 and pAZX/R1. Ten amplification cycles were carried out at 94 °C for 1.5 min, 55 °C for 1.5 min, and 72 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1.5 min, 63 °C for 1.5 min, and 72 °C for 2 min. Expected product sizes were approximately 350 bp [17] and 230 bp [7] for the first and second rounds of PCR, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Pigs with and without lesions. Of the 591 lung samples examined in this study, 297 with visible lesions were identified. 147 specimens were from RS and 150 were from MT.

Prevalence of PCV2. Immunohistochemistry detected PCV2 in 32.7% of the total lung samples analyzed; 20.2% and 44.8% of the RS and MT samples, respectively had this viral infection. In infected lungs, large amounts PCV2 antigen were usually found in alveolar macrophages and the alveolar epithelium. The prevalence of PCV2 in lungs without visible lesions was 26.9% and 59.7% of the RS and MT samples, respectively. In contrast, in lungs with lesions, only 13.6% and 30.0% of the RS and MT samples, respectively were infected with the virus (Table 1).

It has been reported that in lungs with circovirus infections and visible lesions, the extent of the lesions was correlated with the levels of PVC2 nucleic acid or antigen [18, 19]. Since we detected PCV2 in healthy animals and the prevalence of the virus was higher in those without lung lesions, this suggests that the extent of lung lesion might not be related to viral antigen load. This might be explained by the animals used in the present study were in the initial stages of the infection or in convalescence at the time of slaughter [18]. These data, together with those of others [9] show the importance of finding other pathological features for diagnosing circovirus infection.

Cases of PCV2 outbreaks have been reported in the Brazilian states of Santa Catarina [5], Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, the cities of São Paulo [4, 15], Rio de Janeiro [8], and Rio Grande do Sul [16]. There is also a report that two pigs with PCV2 in south Brazil also had mucocutaneous candidiasis [27]. Crowded animal housing, absence of good management practices, and co-housing animals of different ages or origins, are risk factors for

both pig circovirus [20] and *Pneumocystis* infections [14].

Prevalence of *Pneumocystis*. We were able to perform light microscopic analysis of 564 of the 591 specimens obtained. *Pneumocystis* was detected in 208 out of 564 (36.9%) samples. Of the 208 *Pneumocystis*-positive specimens (determined by GMS-staining), 25 were subjected to amplification at the *mtLSU rRNA* gene (Fig. 1). All 25 samples that tested positive for *Pneumocystis* by GMS also tested positive for the *Pneumocystis mtLSU rRNA* gene.

DNA amplification has also proved to be sensitive and specific for detecting *Pneumocystis* in samples obtained by relatively non-invasive procedures. Similar methods could be applicable for the rapid diagnosis of porcine PcP.

Prevalence of PCV2 and *Pneumocystis* co-infections. Co-infections were detected in 28.0% of total specimens analyzed (Table 2). PCV2 and *Pneumocystis* co-infections were found in 24.6% and 29.5% in RS and MT specimens, respectively. Statistical analysis demonstrated that the chance of finding PCV2 is 45% lower in animals with *Pneumocystis* than in animals without *Pneumocystis*. This observation suggests that the presence of *Pneumocystis* in pigs might provide some level of protection against infection by PCV2.

Co-infections were found in 6/65 (9.2%) lungs with lesions, and in 8/47 (17.0%) without visible lesions in the RS specimens; there was no correlation between co-infections and the presence ($\rho = 0.126$) or absence ($\rho = 0.067$) of lung lesions. Among the samples from MT, 23/61 (37.7%) lungs had lesions and 15/35 (42.9%) did not. As in RS, there was also no correlation between co-infections with lung lesions ($\rho = 0.104$); index of probability was 1.82 indicating no correlation. However, there apparently was a correlation between *Pneumocystis* and PVC2 co-infections and lungs without visible lesions ($\rho = 0.013$); with a likelihood ratio of 0.38.

Pigs testing positive for both *Pneumocystis* and PCV2 had mainly mononuclear bronco-interstitial pneumonia (48.1%) or mononuclear interstitial pneumonia (32.7%). Since we did not find a correlation between PCV2 or *Pneumocystis* infection and the presence of lung lesions, the pathologies observed might be due to endemic pathogens highly prevalent in the southern regions of Brazil [26].

In 1997, Clark [6] reported detecting *Pneumocystis* (5%) in pigs in Canada that were also infected with circovirus. However, there has been no report of this co-infection in pigs in Brazil. In the present study we detected a 36.9 % prevalence rate for *Pneumocystis* in Brazilian pigs of which 28% were co-infected with the virus. This is higher than the 5% previously reported by Clark [6].

Finally, it must be emphasized that even animals considered healthy, *Pneumocystis* and PCV2 infections can be present. Because diagnostic procedures are performed in Brazil only after the onset of outbreaks, animal production can be improved if better preventive and therapeutic measures were adopted to control the dissemination of these diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marilia T. O. Belmonte, Angela R. Belmonte de Souza, Clarissa Silveira Luiz Vaz, Edna M. Yokoo, Edson M. Colodel, Eliana Franco Lopes, Priscila Zlotowski, David E.S.N. Barcellos, Ana O. Wallwitz, Roberto Medeiros, MAPA-SIPA-MT, Judi M. Nóbrega, Plínio L. Lopes, and Antônio F. Barbosa Filho for their assistance.

LITERATURE CITED

1. Allan, G.M. & Ellis, J.A. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagnost. Invest.*, **12**:3-14.
2. Arrington, J.B. 1992. Bacteria, fungi, and other microorganisms. *In*: Prophet, E.B., Mills, B.,

- Arrington, J.B. & Sobin, L.H. Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. p. 227--228.
3. Bille-Hansen, V., Jorsal, S.E., Henriksen, S.A. & Settnes, O.P. 1990. *Pneumocystis carinii* pneumonia in Danish piglets. *Vet. Rec.*, **20**:407--408.
 4. 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. & Richtzenhanin, L.J. 2003. Detecção e diferenciação de circovírus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos abatidos no estado de São Paulo. *In: XI Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos, Goiânia, Brasil.* p. 107--108.
 5. Ciacci-Zanella, J.R. & Mores, N. 2003. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus tipo 2. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootecn.*, **55**:522--527.
 6. Clark, E.G. 1997. Post weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Practitioners*, **28**:499--501.
 7. Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D. & Haines, D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.*, **39**:44--51.
 8. França, T.N., Peixoto, P.V., Brito, M.F., Mores, N., Zanella, J. & Driemeier, D. 2005. Outbreak of circovirosis (porcine postweaning multisystemic wasting syndrome) in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazil. J. Vet. Res.*, **25**:39--53.
 9. Harding, J.C. & Clark, E.G. 1997. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Swine Health Production*, **5**:201--203.

10. Harms, P.A., Halbur, P.G. & Sorden, S.D. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Production.*, **10**:27--30.
11. Kim, J., Chung, H.K. & Chae, C. 2003. Association of Porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet. J.*, **166**:251--256.
12. Kondo, H., Taguchi, M., Abe, N., Nogami, Y., Yoshioka, H. & Ito, M. 1993. Pathological changes in epidemic porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Com. Pathol.*, **108**:206--268.
13. Kondo, H., Kuramochi, T., Taguchi, M. & Ito, M. 1997. Serological studies on porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia: kinetics of the antibody titers in swine herds and the association of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Vet.Med. Sci.*, **59**:1161--1163.
14. Kondo, H., Hikita, M. & Kadota, K. 2000. Immunohistochemical study of *Pneumocystis carinii* infection in pigs: evaluation of *Pneumocystis* pneumonia and a retrospective investigation. *Vet. Rec.* **147**:544--549.
15. Moreno, A.M., Castro, A.M.M.G., Paixão, R., Cortez, A., Doto, D.S., Leomil, H., Baccaro, M.R. & Richtzenhain, L.J. 2003. Associação entre circovirus suíno tipo 2 e as doenças respiratórias no Brasil. *In: XI Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos, Goiânia, Brasil.* p.101--102.
16. Pescador, C.A., Rozza, D.B., Zlotowski, P., Borowski, S.M., Barcellos, D.E. & Driemeier, D. 2003. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos no Rio Grande do Sul. Abstract. XI Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos, Goiânia, Brasil. p. 105--106.

17. Piffer, I.A. & Britto, J.R.F. 1991. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação de rebanhos. Concórdia, SC, EMBRAPA-CNPSA. 12 p. (EMBRAPA-CNPSA. Documento, 23).
18. Quintana, J., Segalés, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodrigues-Arrijoja, G.M., Chianini, F., Folch, J.M., Maldonado, J., Canal, M., Plana-Duran, J. & Domingo, M. 2001. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. Rec.*, **149**:357--361.
19. Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Blasch, M., Rodrigues-Arrijoja, G.M., Kennedy, S., Allan, G.M., McNeilly, F., Latimer, K.S. & Domingo, M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.*, **120**:59--78.
20. Segalés, J. & Domingo, M. 2002a. Circovirose Suína e Circovírus Suíno. *In*: Sobestiansky, J., Barbarino Jr, P., Seyboth, L. & Matos, M. (ed.) Circovirose Suína e Circovírus Suíno. Sanidade em foco. Goiânia, Brasil. p. 5--33.
21. Segalés, J., Domingo, M., Collel, M., Jensen, H.E. & Blanco, J.L., 2003. Pulmonary aspergillosis in a post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected pig. *Pig J.*, **52**:41--47.
22. Seibold, H.R. & Munnell, J.F. 1977. *Pneumocystis carinii* in a pig. *Vet. Pathol.*, **14**:89--91.
23. Settnes, O.P., Bille-Hansen, V., Jorsal, S.E. & Henriksen, S.A. 1991. The piglet as a potential model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J. Protozool.*, **38**:140S--141S.
24. Silva, A.F., Paganini F.J., Acosta J.C., Rocha, P.H., Mistura, H., Marcon, E., Simon V.A., Casagrande, H.A, Silva, M.S & Floss, J.M. 2002. Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brasil. Abstract 507. Congress of the International Pig Veterinary,

- Ames, Iowa, USA, **2**:332.
25. Sorden, S.D., Harms, P.A., Nawagitgul, P., Cavanaugh, D. & Paul, P.S. 1999. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**:528--530.
26. Wallwitz, A.O. 2004. Abscessos pulmonares em suínos abatidos industrialmente: bacteriologia, anatomopatologia e relação entre portas de entrada e lesões macroscópicas. Dissertação (Mestrado em Produção e Sanidade de Suínos), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 86 pp.
27. Zlotowski, P., Rozza, D.B., Pescador, C.A., Barcellos, D.E., Ferreiro, L., Sanches, E.M.C. & Driemeier, D. 2006. Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet. J.*, **171**:396--397.

Table 1. Prevalence of PCV2 in pig lungs with and without lesions. Values represent the number of lung specimens (% of total).

	Lungs from normal, healthy pigs		Lungs from pigs with pneumonia		Total
	RS ^a	MT ^b	RS ^a	MT ^b	
PCV2-positive	39(26.9)	89(59.7)	20(13.6)	45(30.0)	193(32.7)
PCV2-negative	106(73.1)	60(40.3)	127(86.4)	105(70.0)	398(67.3)
Total	145(100)	149(100)	147(100)	150(100)	591(100)

^aLungs were from pigs in south Brazil.

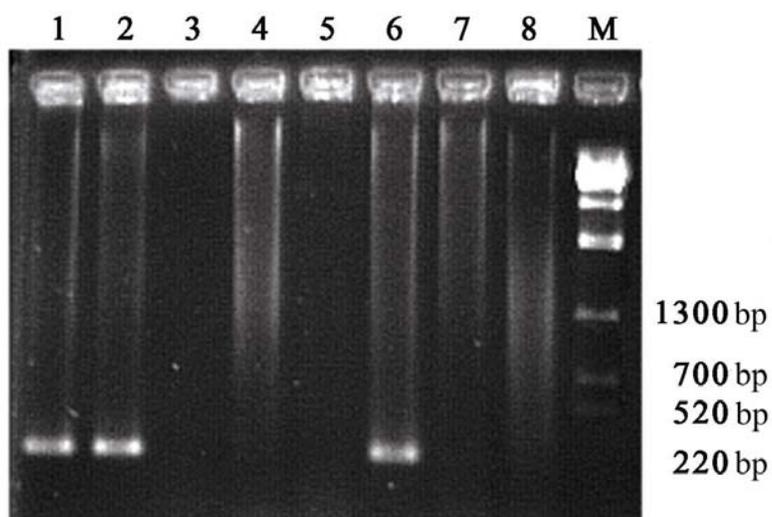
^bLungs were from pigs in mid-west Brazil.

Table 2. *Pneumocystis carinii* f. sp *suis* and PCV2 in the lungs of pigs from two sites in Brazil. Values represent the number of specimens (% of the total specimens analyzed)

Pigs	PCV2-positive	PCV2-negative	Total
<i>Pneumocystis</i> -positive	52 (28.0%)	156 (41.3%)	208 (36.9%)
<i>Pneumocystis</i> -negative	134 (72.0%)	222 (58.7%)	356 (63.1%)
Total	186 (100%)	378 (100%)	564 (100%)

FIGURE LEGEND

Fig. 1. PCR products of DNA extracted from swine lungs infected with *Pneumocystis*. The presence of *Pneumocystis* was first determined by light microscopic analyses of selected lung tissues subjected to PCR amplification. A nested PCR protocol was used to amplify a fragment of the *Pneumocystis mtLSU rRNA* gene. Lanes 1--7 DNA from *Pneumocystis*-infected and uninfected lungs; lanes 1, 2, and 6 were positive for *Pneumocystis* by GMS staining and positive for *Pneumocystis mtLSU rRNA* DNA; lanes 3, 4, 5, and 7 show DNA extracted from lungs negative for *Pneumocystis* by GMS staining. Lane 8, negative control (water); M, markers (*DraI*-digested lambda DNA).



TABELAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO 2

Tabela 1 – Co-infecção entre PCV2 e *Pneumocystis* sp. em suínos de abate nos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso.

	<i>Pneumocystis</i> positivo		<i>Pneumocystis</i> negativo		Total N (%)
	RS	MT	RS	MT	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
PCV2 positivo	14 ^a (12,5%)	38 ^b (29,6%)	43 ^a (25,4%)	91 ^b (48,7%)	186 (33,0%)
PCV2 Negative	98 (87,5%)	58 (60,4%)	126 (74,6%)	96 (51,3%)	378 (67,0%)
Total	112 (100)	96 (100)	169 (100)	187 (100)	564 (100)

$\chi^2_a = 6.98$ $\rho = 0.008$ OR: 0.42 (0.21 < OR < 0.84) IC: 95%

$\chi^2_b = 2.11$ $\rho = 0.146$ OR: 0.69 (0.41 < OR < 1.17) IC: 95%

Tabela 2- Co-infecção entre PCV2, *Pneumocystis* e pulmões com e sem lesões macroscópicas, em suínos de abate em frigorífico do Rio Grande do Sul.

	<i>Pneumocystis</i> positivo		<i>Pneumocystis</i> negativo	
	Pulmões sem lesões	Pulmões com lesões	Pulmões sem lesões	Pulmões com lesões
PCV2 positivo	8 ^a (17.0)	6 ^b (9.2)	29 (31.5)	14 (18.2)
PCV2 negativo	39 (83.0)	59 (90.8)	63 (68.5)	63 (81.8)
Total	47 (100)	65 (100)	92 (100)	77 (100)

$\chi^2_a = 3.35$ $\rho = 0.0672625$ OR: 0.45 (0.17 < OR < 0.1.15) IC: 95%

$\chi^2_b = 2.33$ $\rho = 0.1265983$ OR: 0.46 (0.15 < OR < 1.39) IC: 95%

Tabela 3- Co-infecção entre PCV2, *Pneumocystis* sp. e pulmões com e sem lesões macroscópicas, em suínos de abate em frigorífico do Estado de Mato Grosso.

	<i>Pneumocystis</i> positivo		<i>Pneumocystis</i> negativo	
	Pulmões sem lesões	Pulmões com lesões	Pulmões sem lesões	Pulmões com lesões
PCV2 positivo	15 ^a (42.9)	23 ^b (37.7)	71 (66.4)	20 (25)
PCV2 negativo	20 (57.1)	38 (62.3)	36 (33.6)	60 (75)
Total	35 (100)	61 (100)	107 (100)	80 (100)

$\chi^2_{a} = 6.1$ $\rho = 0.0135412$ OR: 0.38 (0.16 < OR < 0.89) IC: 95%

$\chi^2_{b} = 2.64$ $\rho = 0.1044891$ OR: 1.82 (0.83 < OR < 3.99) IC: 95%

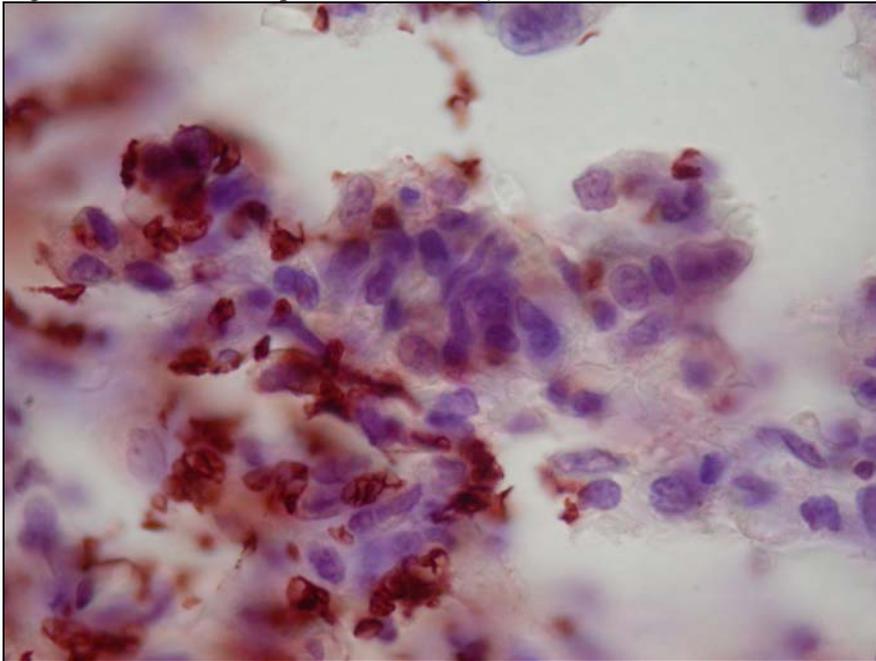
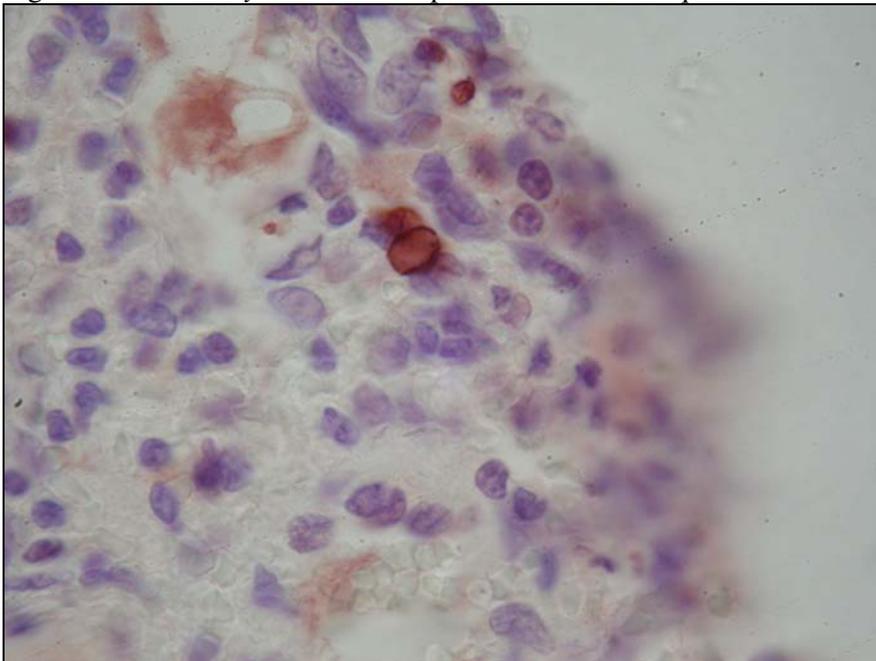
Figuras suplementaresFigura A - Imunohistoquímica *Pneumocystis carinii* – ControleFigura B - *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* – Imunohistoquímica – X 1000

Figura C - *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* - Imunohistoquímica X 400

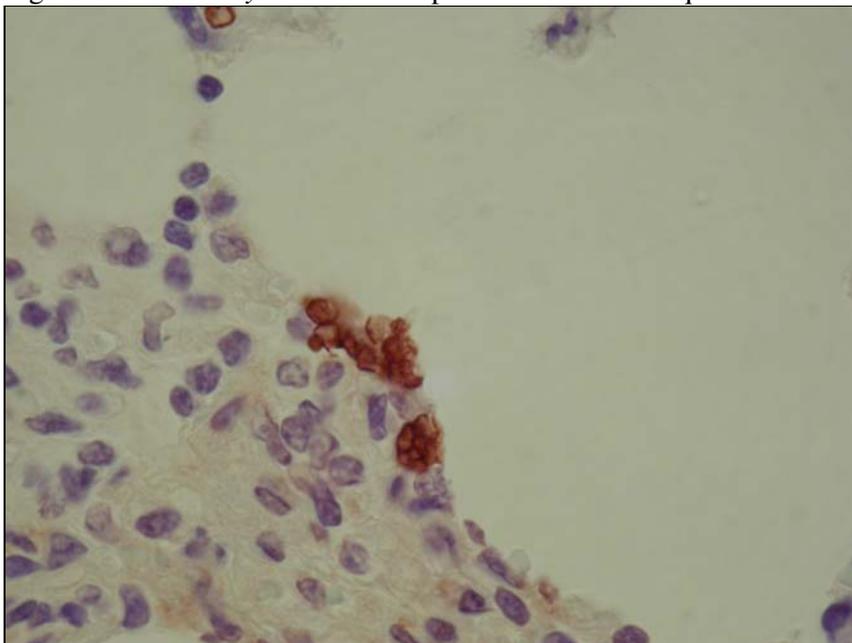


Figura D - *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* - Imunohistoquímica x 200

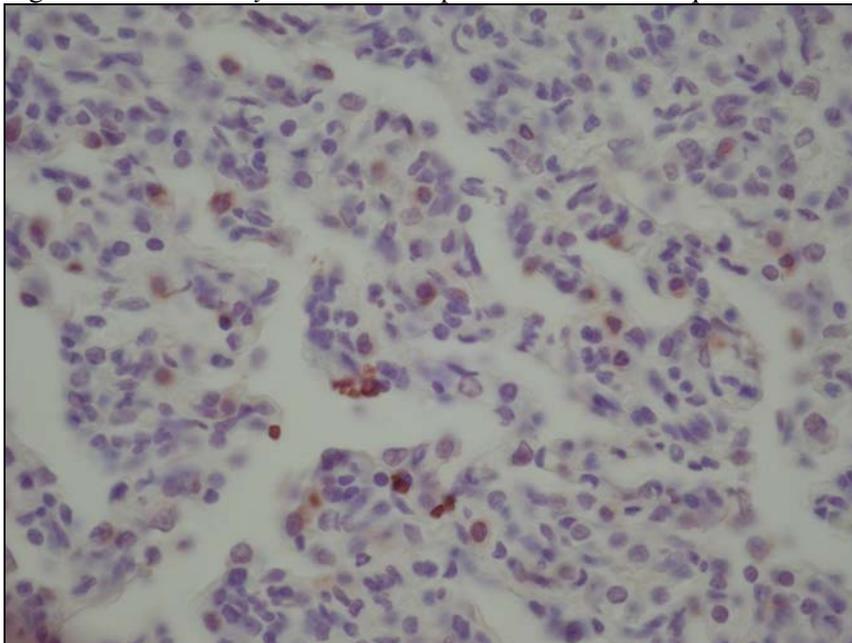


Figura E - PCV2- Controle- Imunohistoquímica x 200

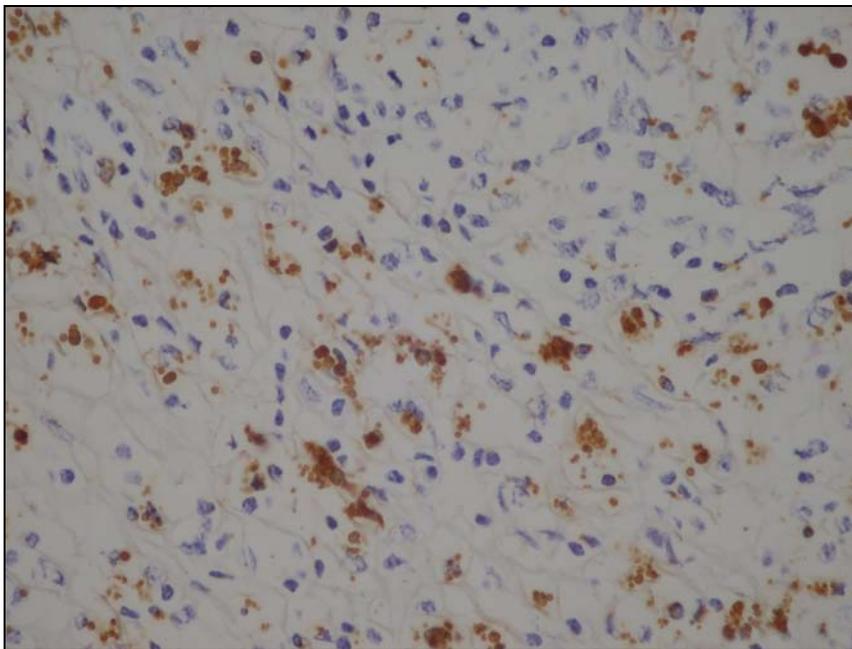


Figura F- PCV2- Imunohistoquímica – x 400

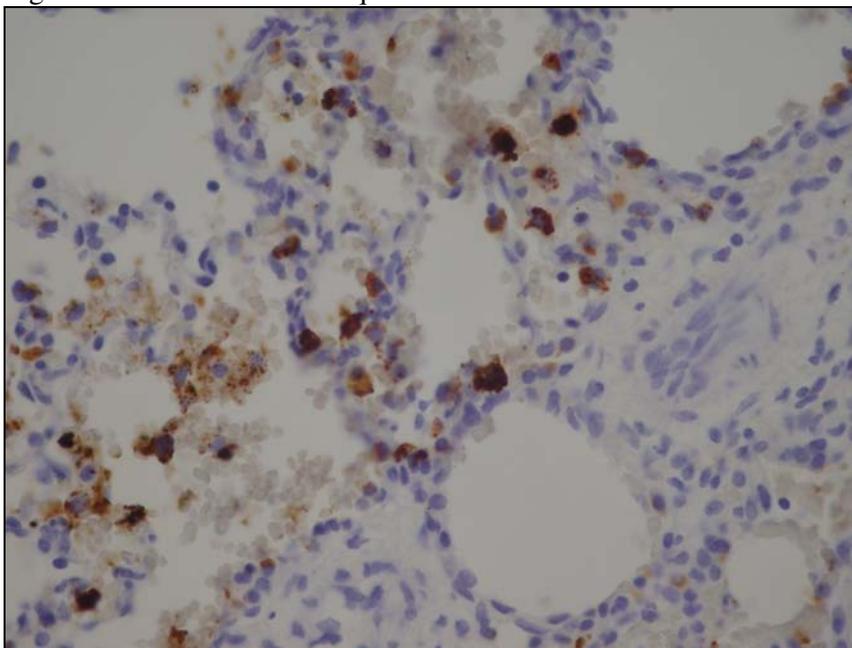


Figura G - PCV2- Inmunohistoquímica- X400

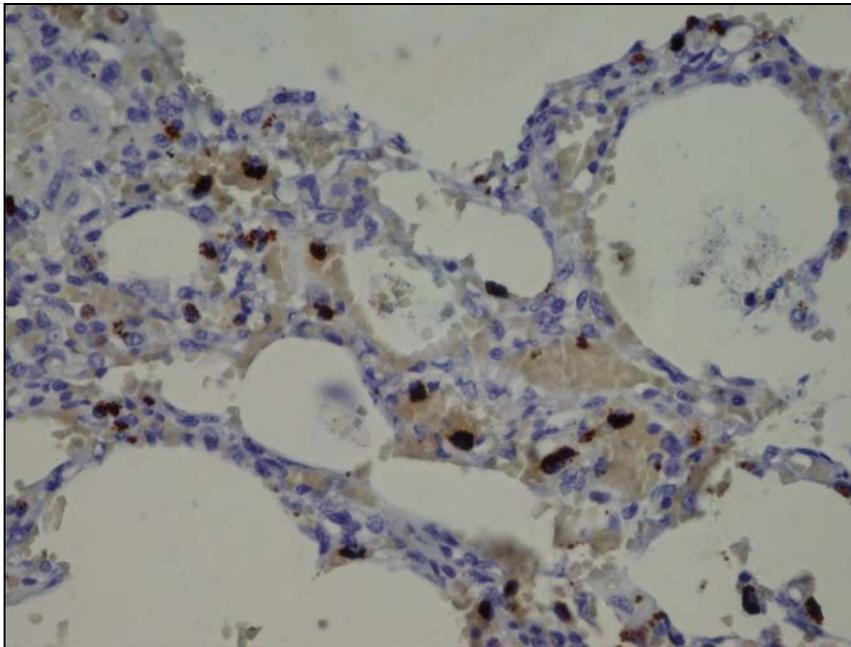
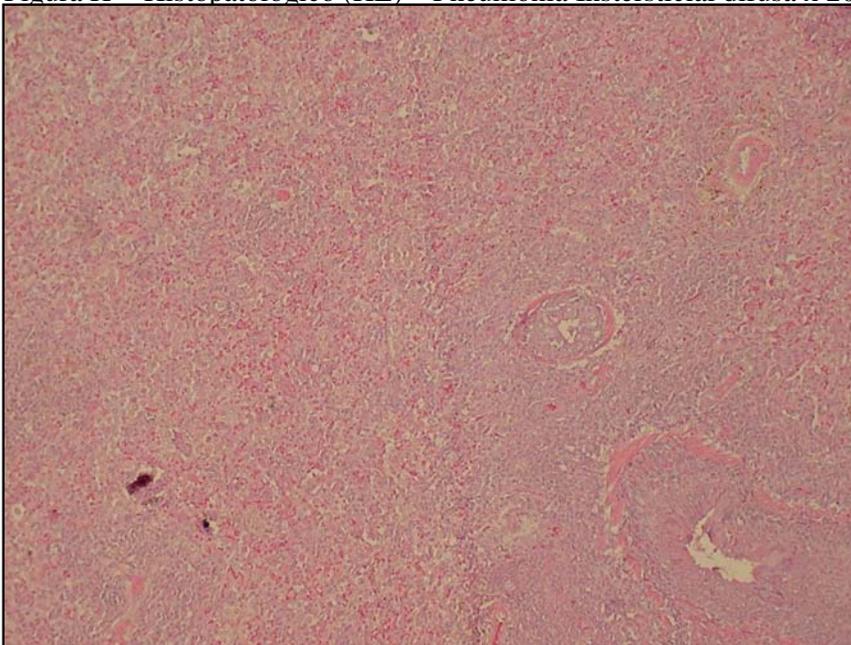


Figura H - Histopatológico (HE) – Pnevmonia Instersticial difusa x 200



CAPÍTULO 3

ANÁLISE FILOGENÉTICA

ESTUDO 3

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS DE *Pneumocystis* sp. DE
SUÍNOS ABATE DA REGIÃO SUL E CENTRO-OESTE DO BRASIL.**

ESTUDO 3

ANÁLISES PRELIMINARES DE PARTES DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES mtLSU rRNA e mtSSU rRNA de *Pneumocystis* sp.

INTRODUÇÃO

Pneumocystis é um grupo de organismo classificado no Reino Fungi (EDMAN *et al.*, 1988; WAKEFIELD *et al.*, 1992; CALDERON-SANDUBETE *et al.*, 2002). O gênero compreende patógenos que residem em pulmões de animais terrestres, aéreos e aquáticos (LAAKKONEN & SUKURA, 1997; MAZARS *et al.*, 1997; LAAKKONEN, 1998; GUILLOT *et al.*, 1999; DURAND-JOLY *et al.*, 2000; DEMANCHE *et al.*, 2001; GUILLOT *et al.*, 2001; LAAKKONEN *et al.*, 2001). Ocasionalmente o *Pneumocystis* induz pneumonia severa, particularmente em hospedeiros com comprometimento no sistema imune. Em determinados hospedeiros, pode ocorrer o desenvolvimento progressivo do *Pneumocystis* nos alvéolos, ocasionando falência respiratória (DEI-CAS, 2000).

Estudos genéticos demonstram que a sequência dos genes, mtLSU rRNA, mtSSU rRNA, ITS, DHPS, e MSG do *Pneumocystis* apresenta divergências de acordo com a espécie hospedeira envolvida. Numerosos fragmentos dos genes mtLSU rRNA, mtSSU rRNA, ITS, DHPS, e MSG do *Pneumocystis* de humanos, primatas, roedores, e coelhos foram comparados e diferentes sequências específicas foram encontradas (BANERJI *et al.*, 1995; MAZARS *et al.*, 1995; LAAKKONEN, 1998; WAKEFIELD *et al.*, 1998; DENIS *et al.*, 2000; DURAND-JOLY *et al.*, 2000; GUILLOT *et al.*, 2001).

Em primatas, um estudo recente revelou divergência na sequência da subunidade maior do RNA ribossomal mitocondrial (mtLSU rRNA) entre espécies de *Pneumocystis* e foi correlacionada filogeneticamente com as respectivas espécies de primatas. Esta observação, pode se estender para outros mamíferos (DEMANCHE *et*

al., 2001; GUILLOT *et al.*, 2001), e explicar a freqüente associação encontrada entre alguns patógenos e seus respectivos hospedeiros (HUGOT *et al.*, 2003).

A alta divergência entre espécies de *Pneumocystis*, provavelmente, é resultado de prolongados processos de co-evolução com cada hospedeiro mamífero (HUGOT *et al.*, 2003).

O presente estudo relata resultados parciais das análises das seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA de *Pneumocystis* em suínos abatidos na região de Porto Alegre (RS) e Cuiabá (MT).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados aleatoriamente 34 dos 208 suínos de abate portadores de *Pneumocystis*, detectados em tecido pulmonar pelas técnicas de Grocott, Imunohistoquímica e nested-PCR, provenientes de frigoríficos da região de Porto Alegre (RS) e Cuiabá (MT). Foram analisadas seqüências de nucleotídeos dos produtos de PCR dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA e os achados inferidos para realização da filogenia.

Extração do DNA e Amplificação por nested-PCR.

Pequenas amostras do tecido pulmonar foram cortadas, trituradas e liofilizadas, a partir das quais o DNA foi extraído utilizando o Kit Qiagen (DneasyTM tissue Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). O DNA foi amplificado por nested-PCR, utilizando os primers pAZ102-H/pAZ102-E e pAZ102-X/pAZ-102Y, tendo como alvo o gene mtLSU rRNA (WAKEFIELD, 1996); e os primers pAZ112-10 F-R/pAZ112-10R e pAZ 112-13R1/pAZ112-14R1, tendo como alvo o gene mtSSU rRNA (TSOLAKI, *et al.*, 1998).

Amplificação do gene mtLSU-rRNA

Para os primers pAZ 102-E e pAZ 102-H , pAZ102-X e pAZ102-Y , as condições de PCR compreenderam uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de

30 ciclos de 94 ° C por 30 segundos , 50 ° C por 1 minuto e 1 minuto a 72 ° C. A nested-PCR compreendeu uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 ° C por 30 segundos , 55 ° C por 1 minuto e 1 minuto a 72 ° C.

Amplificação do gene mtSSU rRNA

Para os primers 10F-RI e 10R-RI, 13RI e 14RI as condições de PCR compreenderam uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 ° C por 1:30 segundos , 55 ° C por 1:30 segundos e 2 minutos a 72 ° C. A nested-PCR compreendeu uma desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 ° C por 1:30 segundos , 52 ° C por 1:30 segundos e 2 minutos a 72 ° C; seguidos por mais 30 ciclos de 94 ° C por 1:30 segundos, 63 ° C por 1:30 segundos e 2 minutos a 72 ° C.

Os produtos da amplificação parcial de ambos genes foram submetidos à eletroforese em gel agarose (2%) em tampão TAE. Os fragmentos foram purificados através do Kit (Qiagen, Courtboeuf, France) e o seqüenciamento foi realizado na Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maison-Alfort, França, utilizando um seqüenciador automático de DNA (Genome Express, Montreuil, France).

Alinhamento das seqüências

As seqüências dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA foram inicialmente alinhadas no programa CLUSTAL X (versão 1.63b, dezembro 1997). Foi usado o programa Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP 4.0b9) para comparação dos alinhamentos das seqüências e construção da árvore filogenética. As seqüências do RNA ribossômico mitocondrial foram comparadas com seqüências conhecidas de *Pneumocystis* no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seqüências dos genes para RNA ribossômico são particularmente válidas, devido às regiões que codificam serem encontradas em todos os organismos. A subunidade menor do RNA ribossômico (16S-like rRNAs) tem ganhado espaço, aceita pela inferência de estruturas confiáveis para análises filogenéticas. Esta região (16S rRNA) é formada por mosaicos de elementos genéticos que mostram taxas específicas de troca ou mudanças evolucionárias (EDMAN & SOGIN, 1994).

No presente estudo, seqüências dos nucleotídeos dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA da região do RNA ribossômico, foram usadas como alvo para amplificar DNA de *Pneumocystis* de suínos por nested-PCR.

O DNA foi obtido de pulmões de 34 suínos, com presença de *Pneumocystis* revelados anteriormente pela técnica de Grocott. No gene mtLSU rRNA, houve uma maior variação nas seqüências (Figura 1) em relação ao gene mtSSU rRNA que se mostrou mais conservado (Figura 2).

A análise filogenética dos genes mtLSU rRNA (Figura 3) e mtSSU rRNA (Figura 4) dos pulmões analisados, sugerem a presença até o presente momento de 2 grupos diferentes de *Pneumocystis* no Brasil. O primeiro grupo representado pelas espécies PN25P e PN64P (suínos da região de Porto Alegre e Cuiabá). O segundo grupo representado pelas espécies das amostras (PN7C, PP6C, PP82P, PP50C, PP107C, PN4C, PN67P, PP65, PN105P, PN36, PN73P, PN80P, PP77P, PPCBA46, PPPOA38, PN86P, PN5P, PPCBA6, PP69C, PPPOA65, PPPOA61, PP38, PN117, PNPOA56, PNPOA9, PN91P, PPBA69, PN76P, PP5C, PPCBA50, PN59, PP102 (suínos das duas regiões estudadas).

O primeiro grupo, foi detectado em pulmões de suínos sem lesões macroscópicas. A segundo grupo foi evidenciado em suínos com e sem lesões macroscópicas. A análise do gene mtSSU rRNA mostrou valores de *bootstrap* considerados altamente confiáveis e revelou a presença de dois grupos. Para o gene mtLSU RNA, os valores de *bootstrap* demonstraram um nível menor de confiabilidade.

Estudos deverão ser realizados com o gene da dihydropteroate synthetase (DHPS) para a confirmação das espécies, juntamente com os cortes histológicos para verificação do tamanho dos cistos, localização dentro dos alvéolos.

Figura 1- Sequências de nucleotídeos dos produtos de PCR obtidos por amplificação parcial do gene mtLSU rRNA do *Pneumocystis* sp. Bases idênticas as do protótipo (P from Pig) são indicadas por ponto, deleções são indicadas por hífen e bases diferentes são mostradas. PN: pulmão sem lesão macroscópica; PP: pulmão com lesão macroscópica (pneumonia); C e CBA: amostras provenientes da região de Cuiabá (MT); P e POA: amostras provenientes da região de Porto Alegre (RS).

```

*          20          *          40          *          60          *          80
P_PP56P_W3 : -----*-----*-----*-----*-----AC...GG..G... : 42
P_PP61_W3. : -----*-----*-----*-----*-----AC...GG..G... : 43
P_PN36_W3. : -----*-----*-----*-----*-----AT...T... : 44
PN_POA_36  : -----*-----*-----*-----*-----T...T... : 40
P_PP69C_W3 : -----*-----*-----*-----*-----T... : 45
P_PP65_W3. : -----*-----*-----*-----*----- : 43
P_from_Pig : .....G..... : 77
P_PN64P_W3 : ..... : 41
PP_CBA_64  : .....C.TG... : 42
PP_POA_61  : .....TC.TG... : 41
P_PP50C_W3 : .....A..TAG... : 44
P_PP47_W3. : .....AT...TA... : 43
P_PP46C_W3 : .....CAT...TG.A... : 45
PP_CBA_69  : .....T.T.TA... : 41
P_PP38_W3. : .....C..... : 45
PP_POA_38  : .....CC.AG... : 41
P_PP64C_W3 : .....C.GAGG.T...AAG..AT.TT..GAA..G..C.ATGGG...ACG. : 48
                a      ggTTttcTgcGaa TctgtTT tagcaaaTatttta

*          100         *          120         *          140         *          160
P_PP56P_W3 : ...G.G...C.....G.C.AA.A.AGT.....TG.....A.TG.....TA... : 123
P_PP61_W3. : .T.C.AT.A.....A.A.AG-----A...T.A.T-----A... : 100
P_PN36_W3. : ---.....C----- : 109
PN_POA_36  : ---.....C----- : 105
P_PP69C_W3 : ---.....C----- : 110
P_PP65_W3. : ---.....T.....G..... : 109
P_from_Pig : ---.....T.....G..... : 143
P_PN64P_W3 : ---..... : 106
PP_CBA_64  : ---.....T.....T... : 108
PP_POA_61  : ---.....T...A.T... : 107
P_PP50C_W3 : ---.....T.....G..... : 110
P_PP47_W3. : ---.....T..... : 109
P_PP46C_W3 : ---.....T.....A.TA..A.T...AC..A. : 111
PP_CBA_69  : ---.....T.....A.TA..A.T...AC... : 107
P_PP38_W3. : ---.....A..A...A...A. : 111
PP_POA_38  : ---.....T.....AGTA..A.T...AC..A. : 107
P_PP64C_W3 : ...GGCG..GCCGTG..C.G.G.TGTA.GTCGCGACACGG.TC-----...CCGGC.TTGC.G.GGC.G--TGG.G.AG : 122
                T tttatTattagtAGgTaTaGcactGaatattttttttt c                a agg a aT a tt act a

*          180         *          200         *          220         *          240
P_PP56P_W3 : ..CT.G.....T.....T.A...GT..T.A.....GT.A.....G.....GG..... : 201
P_PP61_W3. : .T.CAT.....T..G..T.A...TT.T...AA.....T.A.....G.....GA.....A.G. : 181
P_PN36_W3. : .....A.....T.CC..A..G.....A.....G.....A.....A.G..... : 187
PN_POA_36  : ..C...A.....C...A..G.....G.....A.C.....G..... : 183
P_PP69C_W3 : .....T..G..T...T.....T.....G..... : 188
P_PP65_W3. : .....T...T...T.....T..... : 187
P_from_Pig : .....T..G..T...T.....T..... : 221
P_PN64P_W3 : .....T...T.....T.....G..... : 184
PP_CBA_64  : .....T.....A.....A.....G : 186
PP_POA_61  : C...A..A.....T.....A.....A.....C.A.....C...G : 185
P_PP50C_W3 : ...A.....T.....G : 188
P_PP47_W3. : ...A.....C.....T..... : 187
P_PP46C_W3 : C.A.A..A..A..C.....C.A...GT.A..A...A...A...G..A.A.G..A.A..G.C.A.G : 189
PP_CBA_69  : C.A.A..A..A..TC.....C.A...GT.A..A...A...A...GC.A.A.G..A.A..G.C.A.G : 185
P_PP38_W3. : C.A.A..A..A..C.....A...A...A...A...A...A...A...A...A...C.A.G : 189
PP_POA_38  : C.AGA..A..A..C.....A...GT.AG..A...A...ACT...GC.A.A.G..ATA..G.C.A.G : 185
P_PP64C_W3 : G.CG.CGCGC.AC.GCT..G.TTA.A.CCCT.GCC.G..A.C---C.CCATATG.CGCGG.T.CG.CCC..A...TA.C... : 200
                c      aa aTt Aa c Ca aa G c aa a t agg Aa a aa c actttt gc a A gg a AAag C Aa

```

```

*      260      *      280      *      300      *      320
P_PP56P_W3 : .....G.....-----T..A...T.TTA.A.C.T.T...A.TAA....--AAAG..GTA...C... : 272
P_PP61_W3 : .....G..T.....-----T..AA..T...A.....A.T.AG..T-.....TGT----- : 243
P_PN36_W3 : .....G.....CC.....G.....A..TT.T..A.....--A.T..... : 266
PN_POA_36 : .....CG.....TA.....G.....-TT...TA.....--A.T..... : 261
P_PP69C_W3 : .....CG.....TA.....G.....AT.....G.....--A.T..... : 259
P_PP65_W3 : .....T.....A...T...A.T.....-...A.GGTA...A... : 267
P_from_Pig : .....G.....A...T..AA.A...T...GA.-T...T-AAAAT.GGTA...A... : 300
P_PN64P_W3 : .....G.....A...T...A.....T.A..... : 253
PP_CBA_64 : .....C.....C.....G.....A.....T.....A.....-...A...G.T...C.G : 265
PP_POA_61 : .....C..C.....G...A.....A.....T.C.....G.T.....G : 266
P_PP50C_W3 : .....C.....T.A.....-...A..... : 257
P_PP47_W3 : .....C.....CA.....-...G..... : 256
P_PP46C_W3 : ..A..C.GC...G..C.G.A.....G.A.....A...A.TA..G...-G...-A..C..G..A... : 267
PP_CBA_69 : ..A..C.GC...C.G.....GTA.....A.TAT.A..T.T.G...-T..C..... : 255
P_PP38_W3 : .....C.....A.....A.....A...T.A...-G...-AA..C...C.CC----- : 261
PP_POA_38 : .....C.GC...C.GTA.....A.....T.A...-G...-T.....G.T..... : 263
P_PP64C_W3 : ATA...T.T.TTG..GAG..CCC-----CTCCC..A..TT...-G.CT.GGTA.....T.GAG..GGG...GAA..G : 273
      gggaa ca Ccc A c gtaaaaaaaaaa a g CcccA t a T a g AA c

*      340      *      360      *      380      *      400
P_PP56P_W3 : ...A...T.A....T...CTTG.A..C....AT..A..C----- : 312
P_PP61_W3 : ----- : -
P_PN36_W3 : ..T...C..T...AG....GG.A.....C.....G.GG.G...AG.CC..C----- : 328
PN_POA_36 : ..T.....AT.....TG.....CCC.C....TT...GGGGAC.CT..CC..AAAA...A...T... : 342
P_PP69C_W3 : ----- : -
P_PP65_W3 : ...A----- : 272
P_from_Pig : ...A...T.AT.... : 315
P_PN64P_W3 : ----- : -
PP_CBA_64 : GGA..T..AT..C...TTCT...T.C...T.GGG.....AA.....A.....A----- : 337
PP_POA_61 : GGA..GG..T.....TTC..A.T.C....GGG.TG.....TT..A..G...T.....A.....G.. : 347
P_PP50C_W3 : ----- : -
P_PP47_W3 : ----- : -
P_PP46C_W3 : ..T.G...A..AT.AA...C.....CA.....G.GG...GCAA...CGGGGGGGGG..... : 348
PP_CBA_69 : ----- : -
P_PP38_W3 : ----- : -
PP_POA_38 : GG...GG.A...CG..T.....A.....G.....A.....A.AG.....C..... : 337
P_PP64C_W3 : CG...TCGGGT.AC.AAA..A.GAA.GGGCA...AAT.T.AAATATA..GAG.TT.C..ATA.T.CAAAG----- : 343

```

Figura 2- Sequências de nucleotídeos dos produtos de PCR obtidos por amplificação parcial do gene *mtSSU* rRNA do *Pneumocystis* sp.. Bases idênticas as do protótipo (P from Pig) são indicadas por ponto, deleções são indicadas por hífen e bases diferentes são mostradas. PN: pulmão sem lesão macroscópica; PP: pulmão com lesão macroscópica (pneumonia); C e CBA: amostras provenientes da região de Cuiabá (MT); P e POA: amostras provenientes da região de Porto Alegre (RS).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
PP_POA_65 : -----G.C.T..... : 55
Porc      : .....T.C..... : 82
PP_POA_61 : -----G..... : 53
PN_POA_59 : -----G..... : 55
PP_CBA_64 : -----G..... : 53
PP_CBA_69 : -----T.....T..... : 54
PN_POA_56 : -----GT..... : 55
PP_CBA_50 : -----T..... : 54
PN_POA_36 : -----T..... : 54
PP_POA_38 : -----T.....A..... : 54
PP_CBA_46 : -----T..... : 56
          aCcACGAcAA TCTTAC ACTTCTTGCATATTATTA ATATATTATATaATATA

*      100     *      120     *      140     *      160
PP_POA_65 : .....A..... : 137
Porc      : ..... : 164
PP_POA_61 : ..... : 135
PN_POA_59 : ..... : 137
PP_CBA_64 : ..... : 135
PP_CBA_69 : ..... : 136
PN_POA_56 : ..... : 137
PP_CBA_50 : ..... : 136
PN_POA_36 : ..... : 136
PP_POA_38 : ..... : 136
PP_CBA_46 : .....G.....G.....C.G.....G.....C...C... : 138
          TTTAATAATACAGGTGtGCATGGcTgCTTTAGTTCGtGtTGTGAAATGTGAGGtAATTCCGTTAACGAACGCAaTCcTt

*      180     *      200     *      220     *      240
PP_POA_65 : ----- : 213
Porc      : ----- : 240
PP_POA_61 : ----- : 211
PN_POA_59 : ----- : 213
PP_CBA_64 : ----- : 211
PP_CBA_69 : ----- : 212
PN_POA_56 : ----- : 213
PP_CBA_50 : ----- : 218
PN_POA_36 : ----- : 151
PP_POA_38 : -----A.....A.T.....C.A...A...TC..T.....GA.GA : 212
PP_CBA_46 : ...C...A...G..A..A..A...-----A.T...C...A...TC...GA..G. : 214
          TTCTtTAGtTTTGTtattattattatt      ttttaattaa ta acttaaagaa tatctttc taggaagga aa t

*      260     *      280     *      300     *      320
PP_POA_65 : ..... : 295
Porc      : ..... : 322
PP_POA_61 : ..... : 293
PN_POA_59 : ..... : 295
PP_CBA_64 : ..... : 293
PP_CBA_69 : ..... : 294
PN_POA_56 : ..... : 295
PP_CBA_50 : .....G.....G.....G.....G..... : 300
PN_POA_36 : ----- : -
PP_POA_38 : .T.....T...AC..G.....G....TA..A...G...A...C.TGCC.....T.C.A.....G...C. : 294
PP_CBA_46 : .T.....A...G.....TA...G.G...A...C.TC.C.....TTT..A.....G..... : 296
          a gattaagacaagtcttc tgacccttatgaa gggcta agac tgcc c a atttctac a a gatgca agatg

```

```

*          340          *          360          *          380          *          400          *
PP_POA_65 : .....A..... : 365
Porc      : .....G.....TTG..... : 396
PP_POA_61 : .....T...AG...-..... : 374
PN_POA_59 : .....A...A..... : 377
PP_CBA_64 : .....-..... : 374
PP_CBA_69 : .....-..... : 375
PN_POA_56 : .....-..... : 375
PP_CBA_50 : .....G.....GG.....-...T...TT...CCC.TTCC.AG : 381
PN_POA_36 : ..... : -
PP_POA_38 : .....GTA.GTA...C.....CC..G...G...T.....A...T...A...CT.T..C..TC.CCAAT : 376
PP_CBA_46 : .....GT...T.....G.....C...G...G.....C.....A..C...TCTA..TCCCC.A. : 378
          tatgt gtc gagcta accatga agg aatt aagtacggataagaatctgaaactc attct a

          420          *          440          *          460          *          480          *
PP_POA_65 : ----- : -
Porc      : ----- : -
PP_POA_61 : ..... : 378
PN_POA_59 : ..... : 381
PP_CBA_64 : ..... : 378
PP_CBA_69 : .....C. : 383
PN_POA_56 : ..... : 380
PP_CBA_50 : .TT.T..... : 463
PN_POA_36 : ----- : -
PP_POA_38 : TCCC... : 383
PP_CBA_46 : .C.C.. : 384

```

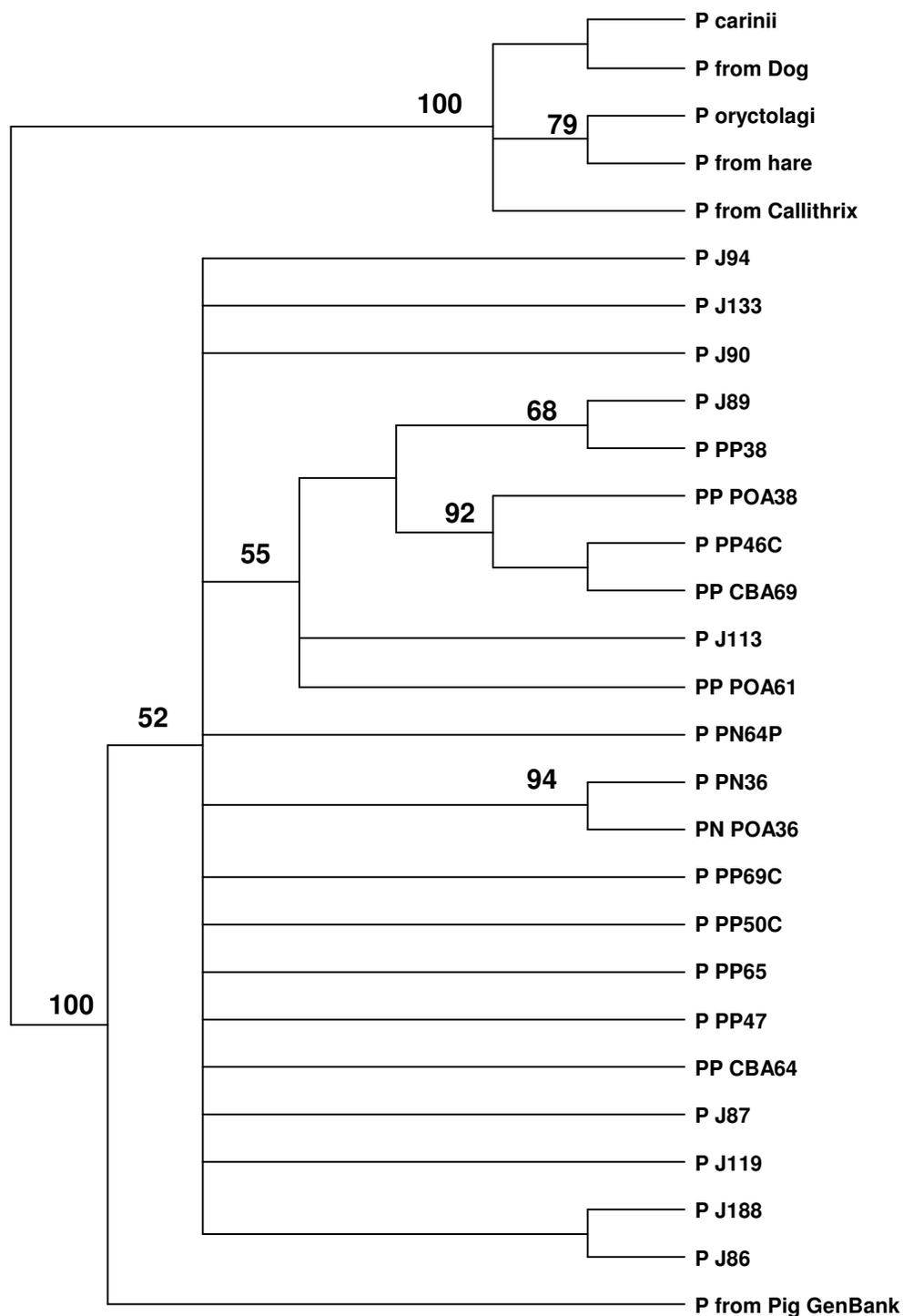


Figura 3 – Árvore filogenética obtida por análise de Parsimonia a partir do fragmento do gene mtLSU rRNA do *Pneumocystis* sp. P PP: *Pneumocystis* de pulmão com lesão macroscópica (pneumonia); P PN: *Pneumocystis* de pulmão sem lesão macroscópica; P e POA: amostras provenientes da região de Porto Alegre (RS); C e CBA: amostras provenientes da região de Cuiabá (MT); P J: *Pneumocystis* de Javali.

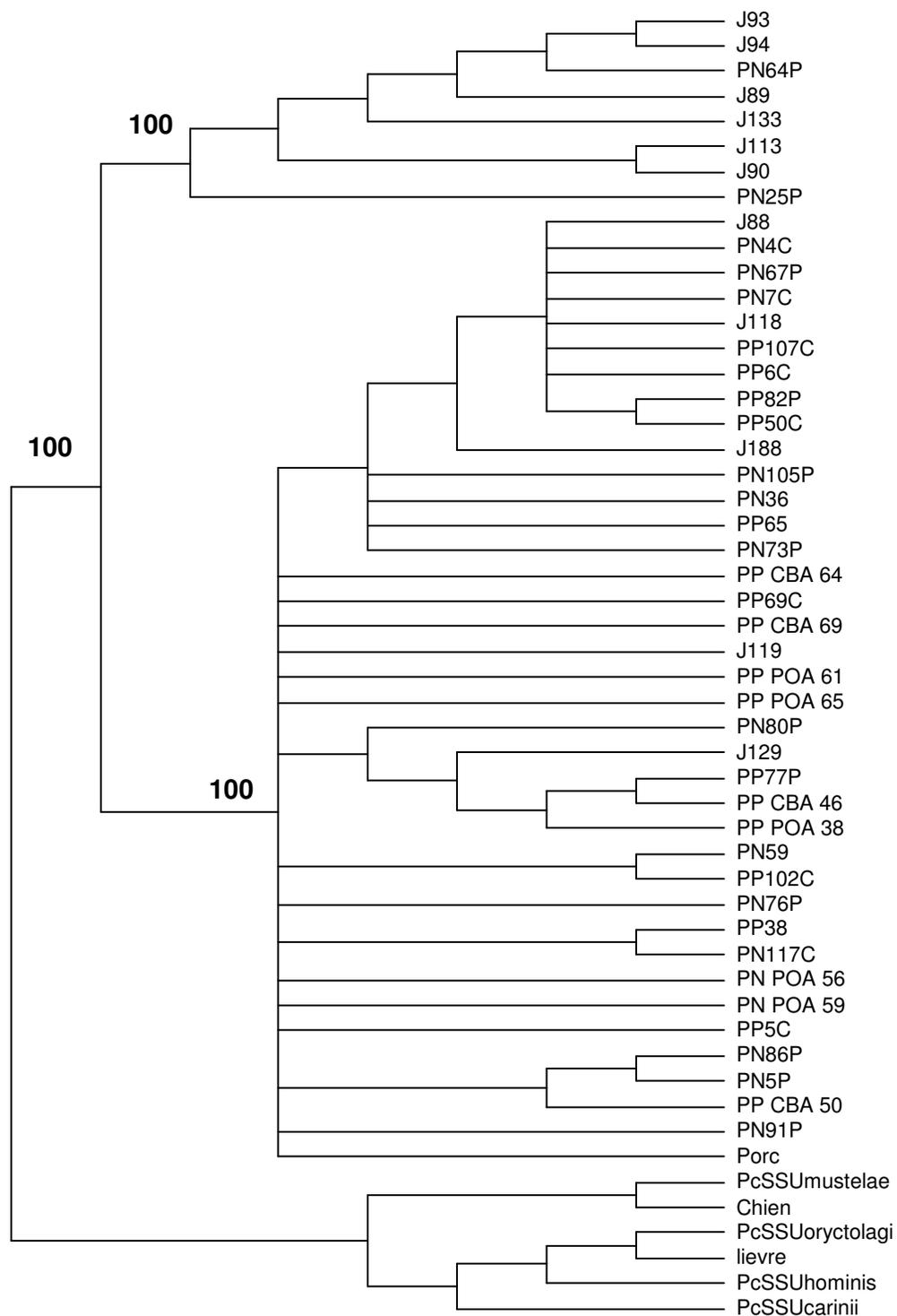


Figura 4 – Árvore filogenética obtida por análise de Parsimonia a partir do fragmento do gene mtSSU rRNA do *Pneumocystis* sp. P PP: *Pneumocystis* de pulmão com lesão macroscópica (pneumonia); P PN: *Pneumocystis* de pulmão sem lesão macroscópica; P e POA: amostras provenientes da região de Porto Alegre (RS); C e CBA: amostras provenientes da região de Cuiabá (MT); P J: *Pneumocystis* de Javali.

REFERÊNCIAS

BANERJI, S. ; LUGLI, E.B. ; MILLER, R.F. ; WAKEFIELD, A.E. Analysis of genetic diversity at the *aroA* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. **Journal Eukaryotic Microbiology**,V.42, P. 675-679, 1995.

CALDERON-SANDUBETE, E.J. ; VARELA-AGUILAR, J.M.; MEDRANO-ORTEGA, F.J.; NIETO-GUERRER, V.; RESPALDIZA-SALAS, N.; DE LA HORRA-PADILHA, C.; DEI-CAS, E. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. **Protist**, v. 153, p. 303-310, 2002.

DEI-CAS, E. *Pneumocystis* infections : the iceberg ? **Medical Mycology**, v. 38, suppl.1, p. 23-32, 2000.

DEMANCHE, C.; BERTHELEMY, M.; PETIT, T.; POLACK, B.; WAKEFIELD, A.E.; DEI-CAS, E.; GUILLOT,J. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. **Journal Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2126-2133, 2001.

DENIS, C.M.; MAZARS, E.; GUYOT, K.; ODBERG-FERRAGUT, C.; VISCOGLIOSI, E.; DEI-CAS, E.; WAKEFIELD, A.E. Genetic divergence at the *SODA* locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. **Medical Mycology**, v. 38, p. 289-300, 2000.

DURAND-JOLY, I.; WAKEFIELD, A.E.; PALMER, R.J.; DENIS, .M.; CREUSY, C.; FLEURISSE, L.; RICARD, I.; GUT, J.P.; DEI-CAS, E. Ultrastructural and molecular characterization of *Pneumocystis carinii* isolated from a rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Medical Mycology**, v. 38, p. 61-72, 2000.

EDMAN, J.C.; SOGIN, M.L. Molecular phylogeny of *Pneumocystis carinii*.In: ***Pneumocystis carinii* pneumonia**. Walzer, P.D. 2(Ed.). New York, 1994. cap.5, p.

91-103, 1994.

EDMAN, J.C.; KOVACS, J.A.; MASUR, H.; SANTI, D.V.; ELWOOD, H.J.; SOGIN, M.L. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. **Nature**, v. 334, p. 519-522, 1988.

GUILLOT, J, CHEVALIER, V. ; QUENEY, G. ; BERTHELEMY, M. ; POLACK, B. ; LACUBE, P.; ROUX, P.; CHERMETTE, R. Acquisition and biodiversity of *Pneumocystis carinii* in a colony of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 100S-101S, 1999.

GUILLOT, J.; DEMANCHE. R.; HUGOT, J.P.; BERTHELEMY, M.; WAKEFIELD, A.E.; DEI-CAS, E.; CHERMETTE, R. Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species and their mammalian hosts. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 113S-115S, 2001.

HUGOT, J.P.; DEMANCHE, C.; BARRIEL, V.; DEI-CAS, E.; GUILLOT, J. Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear DNA sequence comparison. **Syst Biol**, v. 52, p. 735-744, 2003.

LAACKONEM, J.; SUKURA, A. *Pneumocystis carinii* of the common shrew, *Sorex araneus*, shows a discrete phenotype. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 117-121, 1997.

LAACKONEN, J. *Pneumocystis carinii* in wildlife. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p.241-251, 1998.

LAACKONEN, J.; FISHER, R.N.; CASE, T.J. Pneumocystosis in wild small mammals from California. **Journal of Wildlife Disease**, v. 37, p. 408-412, 2001.

MAZARS, E. ; GUYOT, K. ; FOURMAINTRAUX, S.; RENAUD, F.; PETAVY, F. ; CAMUS, D. ; DEI-CAS, E. Detection of *Pneumocystis* in European wild animals. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 44, p. 39S, 1997.

MAZARS, E. ; ODBERG-FERRAGUT, C. ; DEI-CAS, E.; FOURMAUX, M.N.; ALIOUAT, E.M.; BRUN-PASCAUD, M.; MOUGEOT, G. ; CAMUS, D. Polymorphism of the thymidylate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v. 42, p. 26-32, 1995.

TSOLAKI, A.G.; BECKERS, P.; WAKFIEKD, A.E. Pre-ADIS era isolates of *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 90-93, 1998.

WAKEFIELD, A.E. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. **J Clin Microbiol**, v. 34, p. 1754-1759, 1996.

WAKEFIELD,A.E.; PETERS, S.E.; BANERJ, S.; BRIDGE, P.D.; HALL, G.S.; HAWKSWORTH, D.L.; GUIVER, L.A.; ALLEN, A.G.; HOPKIN, J.M. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 1903-1911, 1992.

WAKEFIELD. A.E.; STRINGER, J.R.; TAMBURRINI, E.; DEI-CAS, E. Genetics, metabolism and host specificity of *Pneumocystis carinii*. **Medical Mycology**, v. 36, p. 183-193, 1998.

DISCUSSÃO

Pneumonia por *Pneumocystis* em suínos, ocorre em leitões desmamados e a severidade da infecção (ou doença) aparenta estar relacionada à idade, como ocorre na forma epidêmica em crianças. A forma epidêmica em suínos está associada com hipogamaglobulinemia fisiológica e atrofia das vilosidades intestinais (KONDO et al., 1993), fatores que ocasionam desnutrição (SEILBOLD & MUNNELL, 1977; BILLE-HANSEN *et al.*, 1990). Os relatos de pneumocistose em suínos são ocasionais e relacionados a situações de surtos esporádicos. Somente em 1989 o *Pneumocystis* foi detectado pela primeira vez em suínos, ocorrendo em 44,4% de 103 suínos com baixo peso (FUJITA *et al.*, 1989). Os resultados do presente estudo, evidenciam a presença do *Pneumocystis* em suínos de abate, considerados saudáveis, apesar do peso da carcaça do abate de 67 Kg no Rio Grande do Sul e 81 kg no Mato Grosso, o que está abaixo do peso ideal.

O índice de positividade de *Pneumocystis* encontrado foi de 33,8% no RS e 24,6% em MT. Apesar de não ter sido detectada diferença estatística nos resultados encontrados nos dois Estados, o índice elevado na região Sul, sugere a influência do clima frio nesta região durante a época do crescimento, que coincide com a época de inverno e outono. Da mesma forma, uma alta prevalência no inverno também foi detectada em humanos (CUSHION, 1994) e em ratos selvagens (LAAKKOMEN, 1998). Por outro lado, ocorrência em outras épocas foi registrada em outras espécies, tais como, no final da primavera (primatas) e no verão (primatas e lebres) (LAAKKOMEN, 1998; DEMANCHE *et al.*, 2003).

É preciso considerar também outros fatores que causam vulnerabilidade no organismo dos animais, como as infecções causadas pelas bactérias (pneumonia enzoótica), que neste estudo não foi avaliada, mas a alta prevalência de pneumonia broncointersticial mononuclear detectada nos cortes histológicos sugere a presença desta infecção nos suínos.

A Pneumonia enzoótica (47,62%) já foi registrada na mesma época e na mesma região (RS) por Walwitz (2003), com predomínio de *Pasteurella multocida* (14,29%). Pesquisas confirmam que ocorrem em suínos, co-infecções do *Pneumocystis* com bactérias, como *Actinobacillus pleuropneumoniae* (JENSEN & BILLE-HANSEN,

2001; KONDO *et al.*, 2000), *Streptococcus suis* (JENSEN & BILLE-HANSEN, 2001; MADSEN *et al.*, 2002), *Campylobacter* e *Escherichia coli* (JENSEN & BILLE-HANSEN, 1990).

A maioria dos dados sobre perdas econômicas está baseada na avaliação de pulmões de abate. O impacto econômico da pneumonia enzoótica está relacionado à redução no ganho de peso diário que é da ordem de 17%. Assim, para cada 10% de área lesional no pulmão corresponde uma redução de 37 gramas no ganho de peso diário (SOBESTIANSKY *et al.*, 2001). A hepatização dos pulmões (área não funcional), calculada foi de 13,34% no Estado do Rio Grande do Sul e 9,24% no Estado de Mato Grosso, o que explicaria o baixo peso médio de abate, principalmente no Rio Grande do Sul, que foi de 67 Kg.

A infecção viral pelo PCV2 foi detectada em 32,7% das amostras pulmonares analisadas, ocorrendo uma prevalência de 20,2% no RS e 44,8% no MT. O PCV2 foi visualizado nos macrófagos e epitélio pulmonar. A prevalência de PCV2 nos pulmões sem lesões visíveis foi de 26,9% no RS e 58,7% no MT. Em contraste, nos pulmões com lesões, o PCV2 foi detectado em somente 13,6% (RS) e 30,0% (MT), praticamente a metade das porcentagens encontradas nos pulmões aparentemente hígidos. ROSSEL (1999) e QUINTANA (2001) sugeriram que a quantidade de ácido nucléico e ou a de antígeno do PCV2 presentes nos animais infectados estariam relacionadas com a extensão das lesões pulmonares (ROSSEL *et al.*, 1999; QUINTANA *et al.*, 2001). Os resultados encontrados neste estudo, discordam da hipótese formulada pelos autores anteriormente citados. É sugerido que esta discrepância possa ser explicada pelo fato de que os animais estivessem, no momento do abate, no início da infecção ou já em estágio de convalescência da mesma. De qualquer maneira, estes achados enfatizam a necessidade de se cotejar os achados laboratoriais com os clínicos para o diagnóstico da circovirose, como nos casos dos surtos ocorridos nos Estados de Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA & MORES, 2003), Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná e em São Paulo (CASTRO *et al.*, 2003; MORENO *et al.*, 2003), Rio de Janeiro (FRANÇA *et al.*, 2005) e Rio Grande do Sul (PESCADOR *et al.*, 2003; CORRÊA, 2006).

Os níveis de co-infecção de PCV2 e *Pneumocystis* sp. anteriormente encontrados foram da ordem de 5% por Clark (1997) e 19% por Sato *et al.* (2000). Estes índices são bem inferiores aos 28% do presente estudo. Devido a enorme diferença da

amostragem entre estes raros relatos encontrados na literatura, torna-se impossível uma comparação que forneça alguma inferência científica adequada. Os dois trabalhos mencionados foram realizados apenas com poucos casos a partir de surtos de circovirose. A presença de duas espécies de *Pneumocystis* nas amostras pesquisadas, implica a necessidade da continuação da pesquisa, visando caracterizar as espécies.

Os resultados encontrados neste trabalho enfatizam a ocorrência da co-infecção por *Pneumocystis* e PCV2 em animais hígidos e sugerem a necessidade de planejamento e implementação de medidas de controle para melhorar a produtividade da suinocultura.

CONCLUSÕES

- 1- Foi diagnosticado 36,9 % de *Pneumocystis* nos dois frigoríficos estudados, 33,8% no Estado do Rio Grande do Sul e 24,6% no Mato Grosso, não ocorrendo diferença entre os Estados.
- 2- A presença do vírus PCV2 no Estado do Rio Grande do Sul foi de 20,2% e 44,8% no Mato Grosso, ocorrendo diferenças entre os Estados.
- 3- Não houve associação entre o PCV2 e o *Pneumocystis* em pulmões com lesões (pneumonia).
- 4- Houve correlação entre a presença de PCV2 e *Pneumocystis* em pulmões sem lesões (pulmão normal). A força da associação foi de 0.38 no Estado de Mato Grosso.
- 5- Detectou-se a presença de duas espécies do *Pneumocystis* nas amostras analisadas no Estado do Rio Grande do Sul e Mato Grosso.

PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos neste levantamento, acreditamos que seria importante envidar esforços no sentido de aprofundar estudos direcionados para:

- 1- Classificação das espécies.
- 2- Análise do perfil lipídico do *Pneumocystis*.
- 3- Quantificação do *Pneumocystis* para definição de colonização ou doença.
- 4- Detecção de pneumocistose na circovirose doença.
- 5- Investigação epidemiológica da pneumocistose suína no Brasil.
- 6- Estudos em Javalis.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, F.; ATZORI, C.; ANGELI, E.; MAININI, A.; MICHELI, V.; CARGNEL, A. *Pneumocystis carinii* diagnosis: an update. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 549-557, 2000.
- AINSWORTH, D.M.; WELDON, A.D.; BECKER, K.A. Recognition of *Pneumocystis carinii* in foals with respiratory distress. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 103-108, 1993.
- ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p. 3-14, 2000.
- ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of wasting disease and death by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 1-11, 1999.
- ARAÚJO, E.G.; SOBESTIANSKY, J.; FERNANDES, L.T.; BRITO, L.A.B.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. IN: SOBESTIANSKY, J; BARBARINO JR, P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. **Circovirose suína e Circovírus suíno**. Goiânia: Pfizer, 2002. (Sanidade em foco). p. 34-43.
- ARMENGOL, C.E. A historical review of *Pneumocystis carinii*. **The Journal of the American Medical Association**, v. 273, p.747-750, 1995.
- ATZORI, C.; ANGELI, E.; AGOSTONI, F.; MAININI, A.; FILIPPINI, M.; MICHELI, V.; CARGNEL, A.M. Emerging aspects related to the application of biomolecular techniques to the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: our experience with ITSs primers. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, n. 1-2, p. 93-95, 1998.
- BARTLETT, M.; CUSHION, M.T.; FISHMAN, J.A.; KANESHIRO, E.S.; LEE, C.H.; LEIBOWITZ, M.J.; LU, J.J.; LUNDGREN, B.; PETERS, S.E.; SMITH, J.W.; SMULIAN, A.G.; STABEN, C.; STRINGER, J.R.; STRINGER, S.L.; WAKEFIELD, A.E.; WALZER, P.D.; WEINBERG, G.A. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41(Suppl), p. 121S-122S, 1994.
- BAUER, N.L.; PAULSRUD, J.R.; BARTLETT, M.S.; SMITH, J.W.; WILDE, C.E. *Pneumocystis carinii* organisms obtained from rats, ferret, and mice are antigenically different. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 1315-1319, 1993.
- BENAVIDES, D.O. Infección pulmonar por *Pneumocystis carinii*: microorganismo, anatomía patológica y diagnóstico. **Boletín de La Escuela de Medicina**, v. 20, n. 1, p. 56-59, 1991.
- BIGBY, T.D.; MARGOLSKEE, D.; CURTIS, J.L.; MICHAEL, P.F.; SHEPPARD, D.; HADLEY, W.K.; HOPEWELL, P.C. The usefulness of induced sputum in the

diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **American Review of Respiratory Disease**, v. 133, n. 4, p. 515-518, 1986.

BILLE-HANSEN, V.; JORSAL, S.E.; HENRIKSEN, S.Aa.; SETTNES, O.P. *Pneumocystis carinii* pneumonia in Danish piglets. **The Veterinary Record**, v. 20, p. 407- 408, 1990.

BOLIN, S.R.; STOFFREGEN, W.C.; NAYAR, G.P.; HAMEL, A.L. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with 2 porcine circovirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 185-194, 2001.

BONFIM, T.C.B.; LOPES, C.W.G. Infecção natural por *Pneumocystis carinii* em *Rattus norvegicus* na região metropolitana do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 107-111, 1997.

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

CAILLIEZ, J.C.; SÉGUY, N.; DENIS, C.M.; ALIOUAT, E.M.; MAZARS, E.; POLONELLI, L. *Pneumocystis carinii* : an atypical fungal micro-organism. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 34, p. 227-239, 1996.

CARINI, A. Formas de eschizogonia do *Tripanosoma lewisi*. **Boletim da Sociedade Medica Cirúrgica de São Paulo**, v. 18, p. 204, 1910.

CARRASCO, L.; SEGALÉS, J.; BAUSTISTA, M.J.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C.; ROSLL, C.; RUIZ-VILLAMOR, E.; SIERRA, M.A. Intestinal chlamydial infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **The Veterinary Record**, v. 146, p. 21 – 23, 2000.

CARVALHO, C.E.; PISTELLI, I.P.; SOUZA, N.; NAKAYAMA, S.; COATES, V. Diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis carinii* através de broncoaspiração-relato de 3 casos. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 6, p. 21, 1988.

CASANOVA-CARDIEL, L.J.; CEDILLO-RIVERA, R.; GARDUÑO-RODRIGUEZ, G.; MUÑOZ, O. Comparación de dos tinciones en la detección de *Pneumocystis carinii*. **La Revista de Investigación Clínica**, v. 48, n. 6, p. 443-447, 1996.

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.; RICHTZENHANIN, L.J. Detecção e diferenciação de circovírus suíno tipo1 e 2 (PCV-1 e PCV2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos abatidos no estado de São Paulo. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. Goiânia, **Resumos**. Goiânia, Goiás, 2003, p. 107-108.

CERÉ, N.; POLACK, B. Animal pneumocystosis: a model for man. **Veterinary Research**, v. 30, p. 1-26, 1999.

CERÉ, N.; POLACK, B.; CHANTELOUP, N.K.; COUDERT, P. Natural transmission of *Pneumocystis carinii* in nonimmunosuppressed animals: early contagiousness of experimentally infested rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2679 – 2672, 1997a.

CERÉ, N.; POLACK, B.; COUDERT, P. Improved rabbit model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: induced infections in Pneumocystis-free animals. **APMIS : Act Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 105, p. 5-6, 1997b.

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

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

CHAGAS, C. Nova entidade do homem: resumo geral dos estudos etiológicos e clínicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, p. 219-275, 1911.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiazaea humana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHRISTENSEN, C.B.V.; SETTNES, O.P.; BILLE-HANSEN, V.; JORSAL, S.E.; HENRIKSEN, S. Aa.; LUNDGREN, B. *Pneumocystis carinii* from pigs and humans are antigenically distinct. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 34, p. 431-433, 1996.

CIACCI-ZANELLA, J.R. Circovirose suína - Reflexos e ações. VII SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA E II SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA - AVESUI CENTRO-OESTE. 2005, Goiânia. **Seminários Técnicos de Suinocultura**, Goiás, 2005. p. 9-15.

CIACCI-ZANELLA, J.R. ; ORÉS, N.; FERNANDES, L.T.; BASSI, S.S.; TROMBETTA, C.; SCHIOCHET, M.F. Ocorrência de circovírus suínos ou materiais com suspeita clínica de síndrome da refugagem multisistêmica (SRM) enviados para diagnóstico. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 2003, Goiânia, **Resumos**. Goiás, 2003a. p. 95-96.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; AMARAL, A.L. Acompanhamento de um surto de circovirose suína em granja produtora de leitões. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 2003b, Goiânia, **Resumos**. Goiás, 2003. p. 99-100.

CLARK, E.G. Postweaning multissystemic wasting syndrome. **Proceedings of the American Association of Swine Practitioners**, v. 28, p. 499-501, 1997.

CORRÊA, A.M.R. Aspectos clínicos e patológicos da circovirose suína no Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado em Patologia Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, RS, Brasil. 75 pp.

CUSHION, M.T. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. **Mycologia**, v. 96, p. 429-438, 2004.

CUSHION, M.T. Taxonomy, genetic organization, and life cycle of *Pneumocystis carinii*. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 13, n. 4, p. 304-312, 1998.

CUSHION, M.T.; KEELY, S.P.; STRINGER, J.R. Validation of the name *Pneumocystis wakefieldiae*. **Mycologia**, v. 97, p. 268, 2005.

CUSHION, M.T.; WALZER, P.D. Closing comments: a retrospective perspective 4th international workshop on *Pneumocystis*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 60S-61S, 1996.

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. Proceedings of the 39th Annual Meeting of the American Association of Veterinary Diagnostic Laboratories, 1996, v. 39, p. 32.

DEI-CAS, E.; MAZARS, E.; ALIQUAT, E.M.; NEVEZ, G.; CAILLEZ, J.C.; CAMUS, D. The host specificity of *Pneumocystis carinii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 8, p. 1-6, 1998.

DELANOË, P. ; DELANOË, P. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. **Comptes Rendus de l' Academie des Sciences**, v. 155, p. 658-660, 1912.

DEMANCHE, C.; BERTHELEMY, M; PETIT, T.; POLACK, B.; WAKEFIELD, A.E.; DEI-CAS, E.; GUILLOT, J. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2126-2133, 2001.

DEMANCHE, C.; PETIT, T.; MOISSON, P. ; OLLIVET, F. ; RIGOLET, J. ; CHERMETTE, R. ; DEI-CAS, E. ; WAKEFIELD, A.E. ; GUILLOT, J. Assessment of *Pneumocystis* species carriage in captive primates. **The Veterinary Record**, v. 28, p. 811-813, 2003.

DUARTE, M.I.S.; OLIVEIRA, M.S. Pneumocistose. In: Zaitz, C. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro, Medsi Edit. Médica e Científica Ltda, 1998. p. 309-323.

DULAC, G.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC-CCL 33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 431-433, 1989.

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

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANCH, 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, p. 2-14, 1999.

ELLIS, J.A.; ALLAN, G.M. **The natural history of porcine circovirus**. In: 16TH INTERNACIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 2000, Melbourne, p. 3-19.

EVANS, R.; JOSS, A.W.L.; PENNINGTON, T.H.; HO-YEN, D.O. Progression of *Pneumocystis carinii* infection in na animal mode. **Journal Medical Microbiology**, v. 47, p. 543-546, 1998.

FELDMAN, R.E. *Pneumocystis carinii*, hoy. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. XXVI, n.1, p.79-84, 1992.

FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F.; MORES, N.; ZANELLA, J.; DRIEMEIER, D. Surto de circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 39-53, 2005.

FRENKEL, J. *Pneumocystis* Pneumonia, na immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical Overview. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 89S-92S, 1999.

FUJITA, M.; FURUTA, T.; NAKAJIMA, T.; KURITA, F.; KANEUCHI, C.; UEDA, K.; OGATA, M. Prevalence of *Pneumocystis carinii* in slaughtered pigs. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, p. 200-202, 1989.

GOSEY, L.L.; HOWARD, R.M.; WITEBSKY, F.G.; OGNIBENE, F.P.; WU, T.C.; GILL, V.E.; MACLOWRY, J.D. Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 803-807, 1985.

GOTTLIEB, B.; REYES, H. Neumonia por *Pneumocystis carinii*. Estado actual del problema. **Revista Medica de Chile**, v. 110, n. 1, p. 53-59, 1982.

GUILLOT, J.; DEMANCHE, C.; HUGOT, J.P.; BERTHELEMY, M.; WAKEFIELD, A.; DEI-CAS, E.; CHERMETTE, R. Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species ad their mammalian hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, suppl. 113-115, 2001.

HAGIWARA, Y.; FUJIWARA, S.; TAKAI, H.; OHNO, K.; MASUDA, K.; FURUTA, T.; NAKAYAMA, H.; DOI, K.; TSUJIMOTO, H. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a Cavalier king Charles Spaniel. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, p. 349-31. 2001.

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

HANANO, R.; KAUFMANN, S.H.E. *Pneumocystis carinii* and the immune response in disease. **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 71-75, 1998.

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

HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; BOLIN, S.; LAGR, K.; MOROSOV, I.; PAUL, P.S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and PRRSV. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 528-539, 2001.

HENN, L.A.; BARRETO, S.M. Infecções pulmonares na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. **Revista do Hospital Clínicas Porto Alegre**, v. 18, n. 1, p. 95-102, 1998.

HOPEWELL, P.C. *Pneumocystis carinii* pneumonia: diagnosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 6, p. 1115-1119, 1988.

HOPKIN, J.M. *Pneumocystis carinii*. New York, Oxford University Press, 1991. 131p.

HUGHES, W.T. Animal models for *Pneumocystis carinii* pneumonia. **The Journal of Protozoology**, v. 36, p. 41-45, 1989.

HUGHES, W.T. Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii*. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 13, n. 4, p. 283-288, 1998.

HUGHES, W.T. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 145, n. 6, p. 842-848, 1982.

HUGHES, W.T.; ANDERSON, D.C. *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lower Respiratory Tract Infections**, p. 289-296, 1991.

HUGOT, J.P., DEMANCHE, C., BARRIEL, V., DEI-CAS, E.; GUILLOT, J. Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear sequences comparison. **Systematic Biology**, v. 52, p. 735-744. 2003.

ICENHOUR, C.R.; ARNOLD, J.; MEDVEDOVIC, M.; CUSHION, M.T. Competitive coexistence of two *Pneumocystis* species. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 177-186, 2006.

JÉCNLY, V. *Pneumocystis carinii* findings in young ones of some farm animals. **Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology**, v. 22, p. 135-140, 1973.

JENSEN, T.K.; BOYE, M.; BILLE-HANSEN. Application of fluorescent in situ hybridization for specific diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals and pigs. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 269-274, 2001.

KENNEDY, S.; ALLAN, G.; McNEILLY, F.; ADAIR, B.M.; HUGHES, A.; SPLLANE, P. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. **The Veterinary Record**, v. 142, p. 495-496, 1998.

KISS, I.; KECSKEMETI, S.; TUBOLY, T.; BAJMOCY, E.; TANYI, J. New pig disease in Hungary: postweaning multisystemic wasting syndrome caused by circovirus. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 48, p. 469-475, 2000.

KONDO, H.; HIKITA, M.; ITO, M.; KADOTA, K. Immunohistochemical study of *Pneumocystis carinii* infection in pigs: evaluation of *Pneumocystis* pneumonia and a retrospective investigation. **The Veterinary Record**, v. 4, p. 544-49, 2000.

KONDO, H.; KURAMOCHI, T.; TAGUCHI, M.; ITO, M. Serological studies on porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia: kinetics of the antibody titers in swine herds and the association of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. **Journal of Veterinary Medical Sciences**, v. 59, p. 1161-1163, 1997.

KONDO, H.; TAGUCHI, M.; ABE, N.; NOGAI, A.; YOSHIOKA, H.; ITO, M. Pathological changes in epidemic porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, p. 206-268, 1993.

KOVACS, J.A.; NG, V.L.; MANSUR, H.; LEOUNG, G.; HADLEY, W.K.; EVANS, G.; LANE, H.C.; OGNIBENE, F.P.; SHELHAMER, J.; PARRILHO, J.E.; GILL, V.J. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. **The New England Journal of Medicine**, v. 318, n. 10, p. 589-593, 1988.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F.; ALLAN, G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 254-263. 2000.

KROE, M.; KIRSCH, C.M.; JENSEN, W.A. Diagnostic strategies for *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Seminars in Respiratory infections**, v. 12, n. 2, p. 70-78, 1997.

KYRIAKIS, S.C.; KENNEDY, S.; SAOULIDIS, K.; LEKKAS, S.; MILIOTIS, C.C.; BALKAMOS, G.C.; PAPOUTSIS, P.A. First report of the presence of post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 in Greece. 16TH INTERNACIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, **Proceedings...**2000, p. 633.

LAAKKONEN, J. *Pneumocystis carinii* in wildlife. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 241-252, 1998.

LATOUCHE, S. ; OLSSON, M.; POLACK, B.; BRUN-PASCAUD, M.; BERNARD, C.; ROUX, P. Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. in air samples collected in animal rooms. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 46S-47S, 1997.

LAUTENSCHLAGER, J.; LYYTIKAINEN, O.; JOKIPII, L.; JOKIPII, A.; MAICHE, A.; RUUTU, T.; TUKIAINEN, P.; RUUTU, P. Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 728-730, 1996.

LIMPER, A.H.; THOMAS, C.F.; ANDERS, R.A.; LEOF, E.B. Interactions of parasite and host epithelial cell cycle regulation during *Pneumocystis carinii* pneumonia. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.130, p. 132-138, 1997.

LOBETTI, R.G. *Pneumocystis carinii* infection in miniature dachshunds. **Compendium**, v. 23, n. 4, p. 320-324, 2001.

LUKERT, P.; DE BOER, G.F.; DALE, J.L.; KEESE, P.; McNULTY, M.S.; RANGLES, J.W.; TISCHER, I. The Circoviridae, In: MURPHY F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.I.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A.W.; MARTINELLI, G.P.; MAY, M.A. Summers M.D. (Ed.) **Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York.: Springer Verlag, 1995. p. 166-168.

MANKERTZ, A. ; DOMINGO, M.; FOLCH, J.M.; LECANN, P.; JESTIN, A.; SEGALÉS, J.; CHMIELEWICZ, B.; PLANA-DURAN, J.; SOIKE, D. Characterization of PCV2 isolates from Spain, Germany and France. **Virus Research**, v. 66, p. 65-67, 2000.

MANKERTZ, A.; HILLENBRAND, B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. **Virology**, v. 279, p. 429-438, 2001.

MANKERTZ, A.; PERSSON, F.; MANKERTZ, J.; BLAESS, G.; BUHK, H.J. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. **Journal of Virology**, v. 71, p. 2562-2566, 1997.

MAZARS, E.; DEI-CAS, E. Epidemiological and taxonomic impact of *Pneumocystis* biodiversity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, n. 1-2, p. 75-

80, 1998.

MCCONNELL E.E.; BASSON, P.A.; PIENAAR, J.G. Pneumocystosis in a domestic goat. **Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 117-126, 1971.

MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFET, D.; MEEHAN, B.M.; FOSTER, J.C.; CLARKE, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virological Methods**, v. 80, p. 123-128, 1999.

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

MORENO, A.M.; CASTRO, A.M.M.G.; PAIXÃO, R.; CORTEZ, A.; DOTO, D.S.; LEOMIL, H.; BACCARO, M.R.; RICHTZENHAIN, L.J. Associação entre Circovirus suínos tipo 2 e as doenças respiratórias no Brasil. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2003, Goiânia, **Resumos**. Goiás, p. 101-102.

MURDOCH, D.R. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. **Medical Microbiology**, v. 36, p. 1162-1170, 2003.

MURRAY, J. F.; MILLS, J. Pulmonary infectious complications of human immunodeficiency virus infection. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 141, n. 6, p. 1582-1598, 1990.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S.R.; HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; PAUL, P.S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2281-2287, 2000.

NEVEZ, G.; TOTET, A.; JOUNIEAUX, V.; SCHMIT, J.L.; DEI-CAS, E.; RACCURT, C. *Pneumocystis jirovecii* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 181-186, 2003.

NIELSEN, J.; BILLE-HANSEN, V.; SETTNES, O.P. Experimental corticosteroid induction of *Pneumocystis carinii* pneumonia in piglets. **APMIS : Act Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica** v. 107, p. 921-928. 1999.

ODDÓ, D.B. *Pneumocystis carinii*. Conceptos básicos y patomorfología. **Revista Chilena de Infectología**, v.7, p. 65-79, 1990.

OHLINGER, V.F.; SCHMIDT, U.; PESCH, S. Studies on pathogenetic aspects of the post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). 16TH

INTERNACIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, **Proceedings...2000**, p. 577.

ONUKEI, A.; ABE, A.; TOGASHI, K.; KAWASHIMA, K.; TANEICHI, A.; TSUNEMETSU, A. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 61, p. 1119-1123, 1999.

PAES, R. A. P.; CHIEFFI, P. P.; D' ANDRETTA NETO, C.; NASCIMENTO, M. F. Pneumonia intersticial por *Pneumocystis carinii* em crianças desnutridas apresentação de quatro casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 3, p. 188-192, 1982.

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: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 2003, Goiânia, **Resumos**, Goiás, p. 105-106.

PETERS, S. ; WAKEFIELD, A.E.; WHITWELL, K.E.; HOPKIN, J.M. *Pneumocystis carinii* pneumonia in thoroughbred foals: identification of a genetically distinct organism by DNA amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 213-216, 1994.

QUINTANA, J.; SEGAÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUES-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. **The Veterinary Record**, v. 149, p. 357-361, 2001.

RAAB, S.S.; CHEVILLE, J.C.; BOTTLES, K.; COHEN, M.B. Utility of gomori methenamine silver stains in bronchoalveolar lavage specimens. **Modern Pathology**, v. 7, n. 5, p. 599-614, 1994.

RAMOS-VARA, J.A.; LU, J.J.; da SILVA, A.J.; MONTONE, K.T.; PIENIAZEK, N.J.; LEE, C-H.; PÉREZ, L.; STEFICEK, B.A.; DUNSTAN, R.W.; CRAFT, D.; WATSON, G.L. Characterization of natural occurring *Pneumocystis carinii* pneumonia in pigs by histopathology, electron microscopy, in situ hybridization and PCR amplification. **Histology and Histopathology**, v. 13, p. 129-136, 1998.

REDHEAD, S.A.; CUSHION, M.T.; FRENKEL, J.K.; STRINGER, J.R. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and typifications. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, p. 2-11. 2006.

ROSSEL, K., GOTTLIEB, B. Aspectos inmunológicos de la pneumocystosis. **Revista de la Sociedad Chilena de Parasitología**, v. 9, n. 2, p. 45-47, 1985.

ROSSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURAN, J.; BALASCH, M.; RODRIGUÉZ-ARRIOJA, G.M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; LATIMER, K.S.;

DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 59-78, 1999.

ROUX, P.; HÁ, M.C.; BRUCKER, G.; COSTAGLIOLA, D. *Pneumocystis* and pneumocystosis in Europe at the end of the 20th century. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, n. 1-2, p. 87-91, 1998.

ROVIRA, M.; BALASCH, J.; SEGALÉS, L.; GARCIA, J.; PLANA-DURÁN, 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, p. 3232-3239, 2002.

SANCHES, E.M.C. Avaliação das técnicas de coloração para *Pneumocystis carinii* no lavado gástrico, em crianças com infecção respiratória, internadas no Hospital Universitário Júlio Muller. Cuiabá/MT. 2001, p. 88. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente, sub-área Pneumologia), Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Saúde Coletiva. Cuiabá. MT.

SANCHES, E.M.C.; SILVA, O.S.; BOTELHO, C. Avaliação das técnicas de coloração para *Pneumocystis carinii* no lavado gástrico, em crianças com infecção respiratória, internadas no Hospital Universitário Júlio Muller/UFMT/ Cuiabá/MT. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 6, p. 37-46, 2003.

SANTAMAURO, J.T.; STOVER, D.E. *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Medical Clinics of North America**, v. 81, n. 2, p. 299-314, 1997.

SATO, K.; SHIBAHARA, T.; ISHIKAWA, Y.; KONDO, H.; KUBO, M.; KADOTA, K. Evidence of Porcine Circovirus infection in pigs with Wasting Disease Syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 627-633, 2000.

SEGALÉS, J.; COLLELL, M.; JENSEN, H.E.; BLANCO, J.L.; DOMINGO, M. Pulmonary Aspergillosis in a postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. **Pig Journal**, v. 52, p. 41-47. 2003.

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; ROSELL, C.; SOLER, M.; MALDONADO, J.; MARTÍN, M.; DOMINGO, M. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 23-30, 2002.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Circovirose Suína e Circovírus Suíno. In: SOBESTIANSKY, J. BARBARINO, P.JR.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. (Eds.) **Circovirose Suína e Circovírus Suíno**. Sanidade em foco. Goiânia, 2002 a, p. 5-33. SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Circovirus, y circovirosis porcina: historia de una controversia. **Porci**, v. 56, p. 15-21, 2000.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Porcine circovirus type 2 infection: Postweaning

multisystemic wasting syndrome and other conditions. **Proceedings...** of the 17th IPVS Congress, Ames, Iowa, USA, 2002b, v. I. p. 35-42.

SEIBOLD, H.R.; MUNNELL, J.F. *Pneumocystis carinii* in a pig. **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 89-91, 1977.

SETTNES, O.P.; BILLE-HANSEN, V.; JORSAL, S.E.; HENRIKSEN, S. The piglet as a potential model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **The Journal of Protozoology**, v. 38, n. 6, p. 140S-141S, 1991.

SETTNES, O.P.; HENRIKSEN, Aa. *Pneumocystis carinii* in large domestic animals in Denmark. A preliminary report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 30, p. 437-440, 1989.

SEVERO, L.C. Pneumocistose. In: SILVA, L.C.D. **Compêndio de Pneumologia**. 2a ed. São Paulo, Fundo Editorial, BYK, 1991. Cap. 60, p. 630-636.

SEVERO, L.C. *Pneumocystis carinii* é fungo e não protozoário. **Revista AMRIGS**, v. 32, n. 4, p. 305, 1988.

SEVERO, L.C.; SANCHES, E.M.C.; TEIXEIRA, P.J.Z. Pneumocistose. In: SIDRIM, J.J. C.; ROCHA, M. F. G. (Eds.). **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 27. p. 283-289.

SHAH, J.S. ; PIECIAK, W.; LIU, J.; BUHARIN, A.; LANE, D.J. Diversity of host species and strains of *Pneumocystis carinii* is based on rRNA sequences. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.3, p. 119-127, 1996.

SILVA, A. F.; PAGANINI F.J.; ACOSTA J.C.; ROCHA, P.H.; MISTURA, H.; MARCON E.; SIMON, V.A.; CASAGRANDE, H.A ; SILVA, M.S; FLOSS, J.M. Prevalence of respiratory diseases in swine at slaughterhouses in Brasil. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 17, 2002, Ames, Iowa, USA **Proceedings...** Ames, Iowa, USA: International Pig Veterinary Society Congress, v. 2. 2002. 332 p.

SIRINARUMITR, T. ; MOROZOV, I.; NAWAGITGUL, P.; SORDEN, S.D.; HARMS, P.A.; PAUL, P.S. Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pig with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 562-565, 2000.

SMULIAN, A.G. Review. *Pneumocystis carinii*: Genetic diversity and cell biology. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, p. 145-154, 2001.

SOBESTIANSKY, J. BARBARINO, P.JR.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. (Eds.) **Circovirose Suína e Circovírus Suíno**. Sanidade em foco. Goiânia, 2002 a, p. 5-33.

SOBESTIANSKY, J.; MATOS, M.P.C.; SOUZA, C.M. **Monitoria Patológica de suínos em matadouros**. Goiânia, 3, 2001. 52 p.

STRINGER, J.R.; CUSHION, M.T. The genome of *Pneumocystis carinii*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 22, p. 15-26, 1998.

STRINGER, J.R.; CUSHION, M.T.; WAKEFIELD, A. E. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48 (Suppl.), p. 184S-189S. 2001.

SU, T.H.; MARTIN, W.J. Pathogenesis and host response in *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Annual Review of Medicine**, v. 45, p. 261-272, 1994.

SUKURA, A.; LAAKKOMEN, J.; RUDBÄCK, E. Occurrence of *Pneumocystis carinii* in canine distemper. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 38, n. 2, p. 201-205, 1997.

THACKER, E.L. Porcine respiratory disease complex. What is it and why does it remain a problem? **Pig Journal**, v. 48, p. 66-70, 2001.

THOMAS J. R, C. F.; LIMPER, A. H. *Pneumocystis* pneumonia: Clinical Presentation and diagnosis in patients with and without acquired immune deficiency syndrome. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 13, n. 4, p. 289-295, 1998.

TILEY, S.M.; MARRIOT, D.J.E.; HARKNESS, J.L. An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. **Pathology**, v. 26, n. 3, p. 325-328, 1994.

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, p. 737-743, 1995.

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

TRUJANO, M.; IGLESIAS, G.; SEGALÉS, J.; PALACIOS, J.M. PCV-2 from emaciated pigs in México. **The Veterinary Record**, v. 148, p. 792, 2001.

VANEK, J.; JIROVEC, O.; LUKES, J. Interstitial plasma cell pneumonia. **Journal of Pediatrics**, v. 46, p. 380, 1955.

WAKEFIELD, A.E. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.22, p. 5-13, 1998.

WAKEFIELD, A.E.; KEELY, S.P.; STRINGER, J.R.; CHRISTENSEN, C.B.V.; AHRENS, P.; PETERS, S.E.; BILLE-HANSEN, V.; HENRIKSEN, S.Aa.; JORSAL, S.E.; SETTNES, O.P. Identification of porcine *Pneumocystis carinii* as a genetically distinct organism by DNA amplification. **APMIS :Acta Pathologica, Microbiologica**,

et **Immunologica Scandinavica**, v. 105, p. 317-321, 1997.

WALKER, E.L. The schizogony of *Trypanosoma evansi* in the spleen of the vertebrate host. **Phillip Journal of Science**, v.7, 53-63, 1912.

WALLWITZ, A.O. Abscessos pulmonares em suínos abatidos industrialmente: bacteriologia, anatomopatologia e relação entre portas de entrada e lesões macroscópicas. Dissertação (Mestrado em Produção e Sanidade de Suínos), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, RS, Brasil. 86 pp.

WALZER, P. D.; SCHULTZ, M.G.; WESTERN, K.A.; ROBBINS, J.B. *Pneumocystis carinii* pneumonia and primary immune deficiency diseases of infancy and childhood. **The Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 3, p. 416-422, 1973.

WALZER, P.D. *Pneumocystis carinii*: a historical perspective. **Seminars in Respiratory infections**, v. 13, n. 4, p. 279-282, 1998.

WAZIR, J.F.; ANSARI, N.A. *Pneumocystis carinii* infection. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 128, p. 1023-1027, 2004.

WAZIR, J.F.; MACRORIE, S.G.; COLEMAN, D.V. Evaluation os sensitivy, specificity, and predictive value of monoclonal antibody 3F6 for the detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia in bronchoalveolar lavage and induced sputum specimes. **Cytopathology**. v. 5, p. 82-90, 1994.

WEISBROTH, S.H.; GEISTFELD, J.; WEISBROTH, S.P; WILLIAMS, B.; FELDMAN, S.H.; LINKE, M.J.; ORR, S.; CUSHION, M.T. Latent *Pneumocystis carini* infection in commercial rat colonies: comparasion of inductive immunosuppressants plus histopathology, PCR, and serology as detection methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1441-1446, 1999.

WELLENBERG, G.J.; PESCH, S.; BERNDSEN, F.W.; STEVERINK, P.J.; HUNNEMAN, W.; VAN DER VORST, T.J. PEPPERKAMP, N.H.; OHLINGER, V.F.; SCHIPPERS, R.; VAN OIRSCHOT, J.T.; DEJONG, M.F. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 form pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands. **Veterinary Quarterly**, v. 22, p. 167-172, 2000.

WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICZ, C.; SHANTZ, N.; JACOBSON, M.; ALAN, G.M.; HAINES, D.M.; CLARK, E.G. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 530-532, 1999.

WITEBSKY, F.G.; ANDREWS, J.W.B.; GILL, V.J.; MACLOWRY, J.D. Modified toluidine blue O stain for *Pneumocystis carinii*: further evaluation of some technical factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 774-775, 1988.

YOHIDA, Y. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. **The Journal of**

Protozoology, v. 36, n. 1, p. 53-60, 1989.

ZANELLA, J.R.C.; MORÉS, N. Diagnóstico da síndrome multisistêmica do definhamento do leitão desmamado (SMDLD) no Brasil causada pelo circovírus suíno tipo 2. Concórdia, SC: **Embrapa Suínos e Aves**. 2001. (Comunidade técnico)

ZLOTOWSKI, P.; ROZZA, D.B.; PESCADOR, C.A; BARCELLOS, D.E.; FERREIRO,L.; SANCHES, E.M.C.; DRIEMEIER, D. Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Journal**, v. 171, p. 396-397, 2006.

ANEXOS

ANEXO C - Coloração de Grocott

Protocolo - Coloração de Grocott

1. Xilol I e II por 20 minutos
2. Álcool 100% 2 minutos
3. Álcool 96% 2 minutos
4. Álcool 80% 2 minutos
5. Álcool 70% 2 minutos
6. Água destilada 2 minutos
7. Ácido crômico 10% por 20 segundos no microondas
8. Esfriar por 5 minutos
9. Lavar em água corrente
10. Solução de bissulfito de sódio por 1 minuto
11. Lavar em água destilada 2 vezes
12. Solução prata de uso em microondas por 20 segundos
13. Estufa 60° C por 7 minutos
14. Lavar em água destilada 2 vezes
15. Cloreto de ouro a 1% por 15 segundos ou a 0,2% por 15 minutos
16. Lavar em água destilada 2 vezes
17. Tiosulfato de sódio por 1 minuto
18. Lavar água corrente
19. Verde brilhante 0,2% por 1 minuto 30 segundos
20. Álcool 96% por 1 minuto
21. Álcool 100% por 1 minuto
22. Xilol III e IV 10 minutos cada
24. Montar lâmina com bálsamo do Canadá

Reagentes - Grocott

Solução de ácido crômico 10% (Chromuim trioxide CrO_3) (Merck)

Solução de nitrato de prata 5% (Silver nitrate AgNO_3) (Merck)

Solução de metanamina 3% (Hemamethylenetetramine $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$)

Solução de borax 5% (sodium tetraborate $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)

Solução de bissulfite de sódio 1% (Sodium bissulfite NaHSO_3 (líquido), como sólido é metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$))

Solução de cloreto de ouro 0,2%

Solução verde brilhante 0,2%

Solução estoque de prata-metanamina (nitrato de prata 5% (5ml) e metanamina 3% (100ml))

Solução uso de prata-metanamina (solução prata estoque 35 ml, água destilada 35 ml e bórax 5% 2,8 ml)

ANEXO D - Coloração de Hematoxilina- eosina

Protocolo - Coloração de Hematoxilina- eosina

1. Xilol I e II por 20 minutos
2. Álcool 100% 2 minutos
3. Álcool 96% 2 minutos
4. Álcool 80% 2 minutos
5. Álcool 70% 2 minutos
6. Água destilada 2 minutos
7. Solução de hematoxilina por 1 minuto
8. Lavar em água duas vezes
9. Álcool 80% por 1 minuto
10. Solução de eosina por 2 minutos
11. Lavar em água duas vezes
12. Solução de álcool 95% por 1 minuto (duas vezes)
13. Xilol III e IV por 10 minutos cada
14. Montar lâminas com bálsamo do Canadá

Reagentes – Hematoxilina-eosina

Eosina 1%

Phloxine estoque 1%

Eosina-phloxine (eosina 100ml, phloxine 10 ml, álcool etílico 780ml, ácido acético glacial 4,0 ml)

ANEXO E – ImunohistoquímicaProcoto-Imunohistoquímica para *Pneumocystis carinii*

1. Xilol I e II por 20 minutos
2. Álcool 100% 2 minutos
3. Álcool 96% 2 minutos
4. Álcool 80% 2 minutos
5. Álcool 70% 2 minutos
6. Água destilada 2 minutos
7. Peróxido de hidrogênio 3% 20 minutos
8. Lavar com TBS com agitação
9. Tripsina 0.1% por 15 minutos a 37°C
10. Tampão citrato (pH:6,0) 2 minutos em Microondas
11. Banho Maria para esfriar
12. Leite desnatado 5% por 20 minutos
13. Anticorpo primário (Virostat) 1:100 por 3 horas a 37°C
14. Lavar com PBS ou TBS com tween
15. Anticorpo secundário (DAKO) 20 minutos temperatura ambiente
16. Lavar com TBS
17. Streptavidna (DAKO) 20 minutos temperatura ambiente
18. Lavar com TBS
19. Cromógeno Nova RED (Vector) 10 minutos temperatura ambiente
20. Contracorar com Hematoxilina 35 segundos
21. Lavar água destilada
22. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100% por 2 minutos cada
23. Xilol III e IV 10 minutos cada
24. Montar lâmina

Protocolo -Imunohistoquímica para Circovirus (PCV2)

1. Xilol I e II por 20 minutos
2. Álcool 100% 2 minutos
3. Álcool 96% 2 minutos
4. Álcool 80% 2 minutos
5. Álcool 70% 2 minutos
6. Água destilada 2 minutos
7. Peróxido de hidrogênio 3% 20 minutos
8. Lavar com TBS com agitação
9. Protease XIV (Sigma) 15 minutos temperatura ambiente
11. Leite desnatado 5% por 20 minutos
12. Anticorpo primário 1:1000 por 50 minutos a 37°C
13. Lavar com PBS ou TBS com tween
14. Anticorpo secundário (DAKO) 25 minutos temperatura ambiente
15. Lavar com TBS
16. Streptavidina (DAKO) 25 minutos temperatura ambiente
17. Lavar com TBS
18. Cromógeno DAB 10 minutos temperatura ambiente
19. Contracorar com Hematoxilina 35 segundos
20. Lavar água destilada
21. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100% por 2 minutos cada
22. Xilol III e IV 10 minutos cada
23. Montar lâmina

Reagentes- Imunohistoquímica

TBS (Dako): Tris Buffered Saline pH 7.6

Tween 20 (Sigma): Polyoxyethylenesorbitan monolaurate

Protease (Sigma): 0,005 g em 10 ml TBS sem Tween 20

Leite desnatado (Molico): 5 g em 100 ml de PBS

Peróxido de Hidrogênio 3%: 97 ml de água destilada e 3 ml de peróxido de hidrogênio

DAB: DAKO Cytomation

DBA chromogen code S3000

Dako 6392 Via Real Carpinteria, CA 93013 USA

Porcine Circovirus Polyclonal Antibody (Iowa State University)- Veterinary Diagnostic Laboratory- Ames – Iowa 50010-3020 Lote: 12804 ORF PCv2-ISU2-Host-Rabbit

Vector NovaREd – Substrate Kit for peroxidase SK-4800

Citrato: 2,1g citrato- 1000 ml de água destilada- pH: 6.1

ANEXO F – Preparação das lâminas para imunohistoquímica

Gelatina

1 litro de água destilada a 50°C (4 minutos em potência máxima)

3,0g de gelatina (gelatina purex cód 4300 – 500 gr Inlab)

0,5 g de sulfato de potássio e cromo III (Kaliumchrom III – sulfat Zur Analyse Merck – 250 gr art 1036)

6 cristais de Timol

Misturar tudo até perfeita dissolução dos reagentes, colocar as lâminas por 2 minutos e depois secar em estufa

Montagem lâmina após coloração

Entellan novo ou Entellan new Merck

Origem: Alemanha

CNPJ: 33069212/0008-50 SAC: 0800-2192 92

Merck KgaA 6471- Damsdat Germany

ANEXO G – Extração de DNA

Protocolo-Extração de DNA

A extração foi realizada com 500µl de DNAzol

1. Pesquisar pulmões aproximadamente 25 mg
2. Triturar
3. 500 µl DNAzol
4. Triturar com seringa
5. Centrifugar por 5 minutos a 3000g
6. Colocar o sobrenadante em outro tubo (eppendorf)
7. Etanol absoluto 250 µl
8. Misturar por inversão e deixar em Temperatura ambiente por 3 minutos em posição invertida µl
9. Centrifugar por 5 minutos a 6000 g
10. Desprezar o sobrenadante
11. Ressuspender o sedimento com 1 ml de etanol 95% (repetir 3 vezes)
12. Centrifugar 5 minutos em 10000 g
13. Desprezar o sobrenadante, virar o tubo para baixo por 20 minutos
14. Ressuspender o sedimento com 300 µl de NaOH 8 mM
15. Colocar 48 horas em 4°C
16. Dosar a concentração de DNA em 260nm e 280 nm

ANEXO H- Amplificação

Amplificação do gen mtLSU rRNA (300pb)

PCR1 -Primers: pAZ 102-H GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA

pAZ 102-E GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC

PCR2- Primers : pAZ102-X GGG AAT TCG TGA AAT ACA AAT CGG ACT
AGG

pAZ102-Y GGG AAT TCT CAC TTA ATA TTA ATT GGG
GAG

Preparação do MIX

	<u>MIX 1</u>		<u>MIX 2</u>
H2O	23,7µl		31,2 µl
Tampão 10X	5,0 µl		5,0µl
MgCl ₂ [3,0mM]	3,0		3,0
Primer E ou 10F (20 pM/µl)	2 µl	Primer X ou 13R	2µl
Primer H ou 10 R (20 pM/µl)	2 µl	Primer H ou 14 R	2µl
dNTP [200µM]	4 µl		4µl
TAQ [2,5U]	0,3 µl		0,3µl
DNA	5µl		2,5µl

Para os primers **pAZ 102-E e pAZ 102-H** , **pAZ102-X e pAZ102-Y** , no primeiro ciclo ocorreu desnaturação por 1:30 segundos a 94 ° C, anelamento por 1:30 segundos a 55 ° C e extensão por 5 minutos a 72 ° C por 40 ciclos. O segundo ciclo PCR ocorreu desnaturação por 1:30 segundos a 94 ° C, anelamento de 1:30 segundos a 55 ° C e extensão por 2 minutos a 72 ° C por 10 ciclos ,seguinte por 30 ciclos com desnaturação por 1:30 segundos a 94 ° C, anelamento de 1:30 segundos a 63 ° C, e extensão por 2 minutos a 72 ° C, por 30 ciclos

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese com 2% de gel agarose.

Amplificação do gen mtSSU rRNA (400pb)

PCR 1 10F-RI : GGG AAT TCT AGA CGG TCA CAG AGA TCA G

10R-RI : GGG AAT TCG AAC GAT TAC TAG CAA TTC C

PCR 2 13RI : GGG AAT TCG AAG CAT GTT GTT TAA TTC G
14RI : GGG AAT TCT TCA AAG AAT/c CGA GTT T/cCA G

Para os primers 10F-RI e 10R-RI, no primeiro ciclo ocorreu desnaturação por 1:30 segundos a 94 ° C, anelamento por 1:30 segundos a 55 ° C e extensão por 2 minutos a 72 ° C por 40 ciclos. O segundo ciclo PCR com os primers 13RI e 14RI correu desnaturação por 1:30 segundos a 94 ° C, anelamento de 1:30 segundos a 52 ° C e extensão por 2 minutos a 72 ° C por 10 ciclos ,seguido por 30 ciclos com desnaturação por 1:30 segundos a 94 ° C, anelamento de 1:30 segundos a 63 ° C, e extensão por 2 minutos a 72 ° C, por 30 ciclos

Purificação dos produtos de PCR para seqüenciamento

Foi utilizado o Kit Purificação QIAquick PCR.

O protocolo foi seguido conforme a orientação do fabricante.

ANEXO I - Produtos utilizados nos procedimentos moleculares

DNAzol reagent Invitrogen Cat. No. 10503-027

Primers XXIDT: 1710 Commercial Park Coralville, IA 52241-2760 800-328 2661

Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPS) – dATP,dCTP, dGTP, dTTP, dUTP –
Promega –Madison, USA –Catalog#U1330

Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B – Promega- Catalog#M1665

ANEXO J - Equipamentos usados

Termociclador GeneAmp®PCR System 2400

Part Number 0993-6057

Perkin Elmer 761 Main Avenue Norwalk, CT 06859 – USA

Espectrofotometro: Pharmacia Biotec Ultrospec 1000

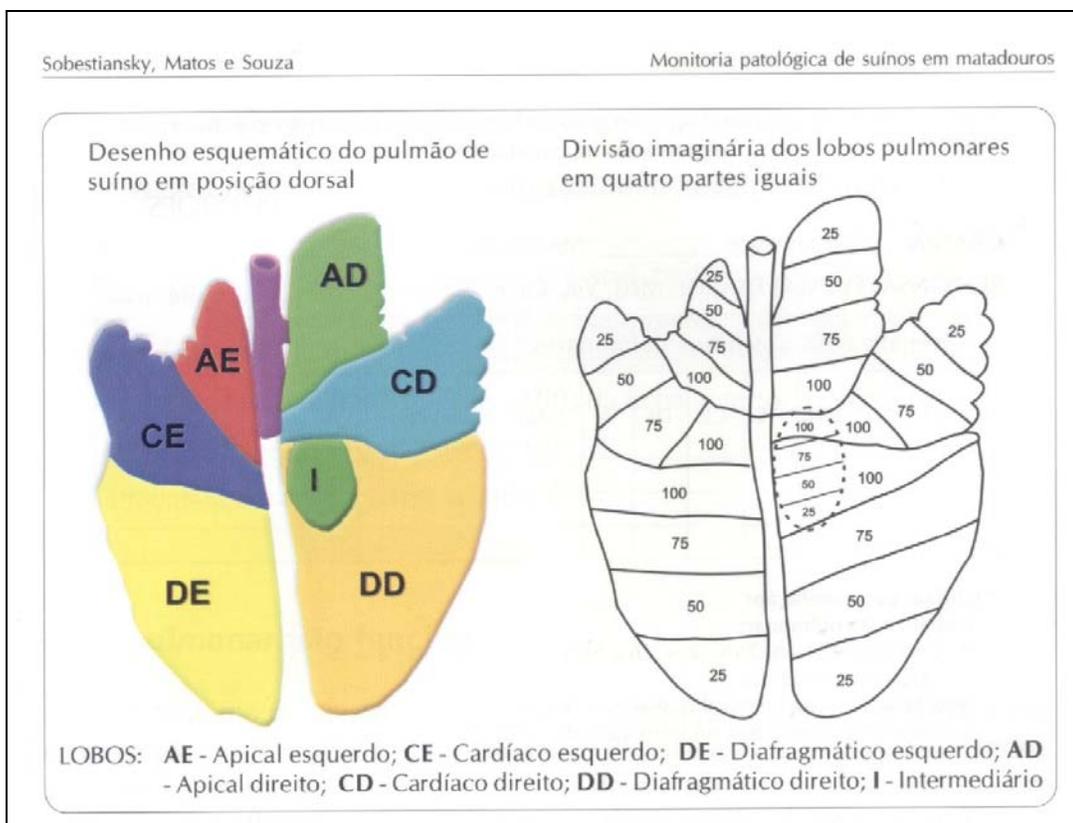
Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd

Cambridge Science Park

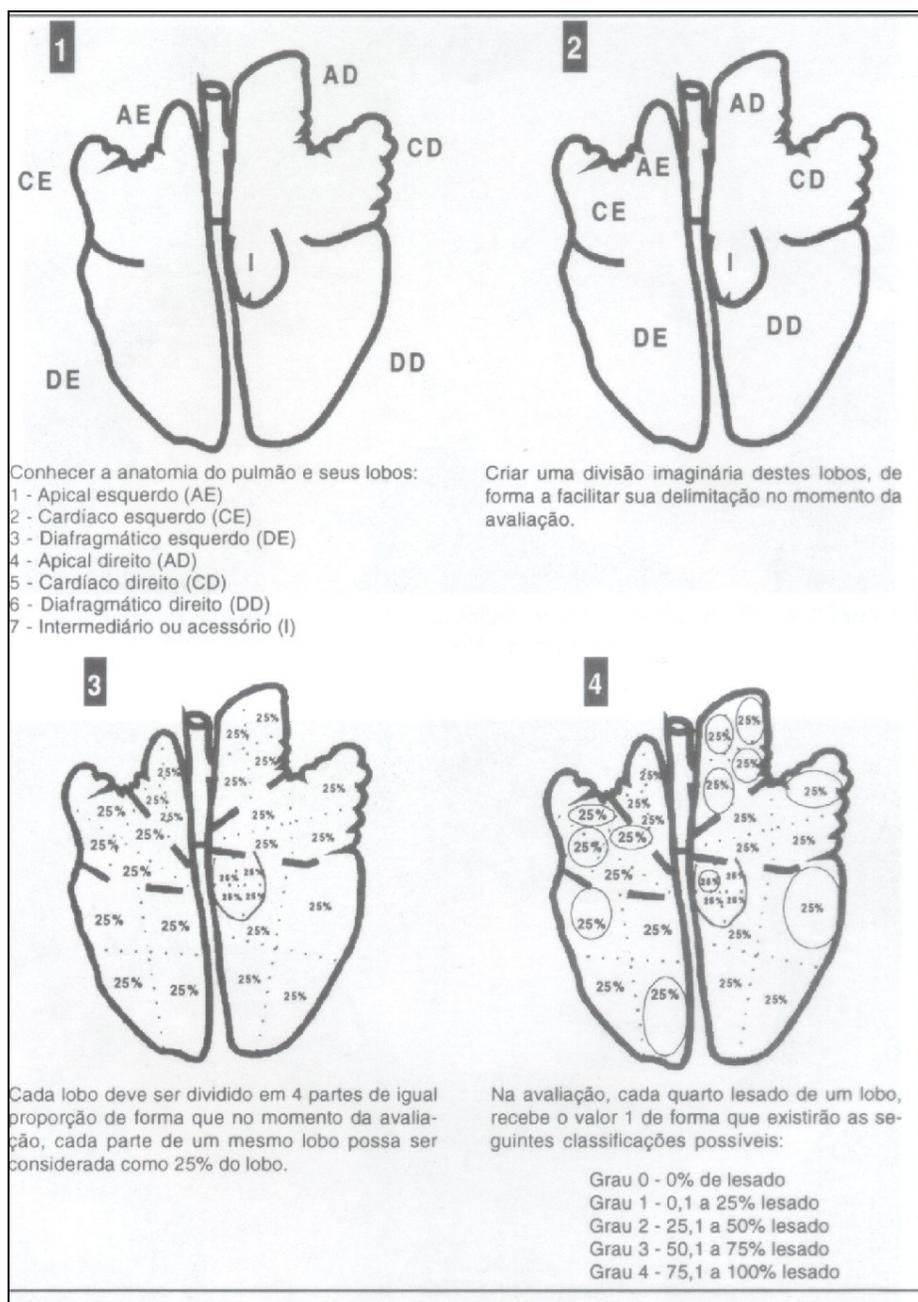
Milton Road Cambridge CB44FJ England

ANEXO L – LESÕES MACROSCÓPICAS

Protocolo de Grau de lesões macroscópicas



Protocolo – Grau de lesão pulmonar



Fonte : Piffer & Brito (1991) e SOBESTIANSKY, 2001; AD: apical direito; CD: cardíaco direito; DD: diafragmático direito; AE: apical esquerdo; CE: cardíaco esquerdo; DE: diafragmático esquerdo; I: intermediário

Protocolo para determinação da hepatização pulmonar

Hepatização pulmonar:

0 = normal; **1** = até 25%; **2** = 26 a 50%; **3** = 51 a 75%; **4** = >76%

Cálculo da área Pulmonar não funcional

Tabela apresenta a área de hepatização dos lobos pulmonares, considerando-se a área hepatizada e o peso relativo do lobo em relação ao parênquima pulmonar.

Pontuação	AD	CD	DD	AE	CE	DE	I
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1,4	1,4	4,3	0,7	0,7	3,4	0,6
2	4,1	4,1	12,7	2,3	2,3	10,1	1,9
3	6,9	6,9	21,4	3,8	3,8	17,0	3,1
4	9,7	9,7	29,9	5,3	5,3	23,8	4,4

Hepatização nos lobos pulmonares e área total de hepatização

N° pulmão	AD	CD	DD	AE	CE	DE	I	ÁREA TOTAL(%)
PP01	1	2	1	1	2	1	4	
AH	1,4	4,1	4,3	0,7	2,3	3,4	4,4	20,6%

PP01= número do pulmão coletado (pulmão pneumonia número 1); AH: Área de Hepatização pulmonar

Quadro 1 – Frequência dos Lobos lesionados das amostras analisadas

	PORTO ALEGRE	CUIABÁ
Total de pulmões analisados	125	155
Predomínio da lesão	Lado direito	Lado esquerdo
Cardíaco esquerdo (n. %)	95 = 76%	124 = 80%
Apical esquerdo (n. %)	47 = 37,6%	78= 50,3%
Diafragmático esquerdo (n. %)	26 = 21%	78= 50,3%
Cardíaco direito (n. %)	101 = 81%	63= 41%
Apical direito (n. %)	48 = 38,4%	60= 38%
Diafragmático direito (n. %)	35 = 28%	23= 15%
Intermediário: (n. %)	42 = 33,6%	11=7,0%

Quadro 2 – Grau de lesões dos pulmões analisados

LOBOS	PORTO ALEGRE	CUIABÁ
LOBO CARDÍACO ESQUERDO	33 pulmões com Grau 3: 35% 25 pulmões com Grau 1: 26% 22 pulmões com Grau 2: 23% 15 pulmões com Grau 4: 16%	37 pulmões com Grau 3: 30% 32 pulmões com Grau 1: 26% 28 pulmões com Grau 2: 23% 27 pulmões com Grau 4: 22%
APICAL ESQUERDO	27 pulmões com Grau 1: 57,4% 09 pulmões com Grau 4: 19% 08 pulmões com Grau 2: 17% 03 pulmões com Grau 3: 6,4%	34 pulmões com Grau 1: 44% 23 pulmões com Grau 3: 29,5% 16 pulmões com Grau 2: 20,5% 05 pulmões de Grau 4: 6,4%
DIAFRAGMÁTICO ESQUERDO	15 pulmões com Grau 1: 58% 07 pulmões com Grau 4: 27% 02 pulmões com Grau 3: 7,7% 02 pulmões com Grau 2: 7,7%	48 pulmões com Grau 1: 69% 10 pulmões com Grau 2: 14,3% 10 pulmões com Grau 3: 14,3% 02 pulmões com Grau 4: 5,7%
CARDÍACO DIREITO	35 pulmões com Grau 3: 35% 33 pulmões com Grau 2: 33% 20 pulmões com Grau 1: 20% 13 pulmões com Grau 4: 13%	43 pulmões com Grau 1: 68% dos 63 09 pulmões com Grau 2: 14,3% 07 pulmões com Grau 3: 11,1% 04 pulmões com Grau 4: 6,3%
APICAL DIREITO	26 pulmões com Grau 1: 54% 10 pulmões com Grau 2: 21% 08 pulmões com Grau 4: 17% 04 pulmões com Grau 3: 8,3%	39 pulmões com Grau 1: 65% 12 pulmões com Grau 2: 20% 07 pulmões com Grau 3: 11,7% 02 pulmões com Grau 4: 3,3%
DIAFRAGMÁTICO DIREITO	23 pulmões com Grau 1: 66% 08 pulmões com Grau 4 : 23% 02 pulmões com Grau 2: 5,7% 02 pulmões com Grau 3: 5,7%	16 pulmões com Grau 1: 69,6% 05 pulmões com Grau 2: 22% 02 pulmões com Grau 3 : 8,7% 00 pulmões com Grau 4 : 0%
INTERMEDIÁRIO	15 pulmões com Grau 1: 36% 12 pulmões com Grau 4: 29% 09 pulmões com Grau 3: 21,4% 06 pulmões com Grau 2: 14,2%	05 pulmões com Grau 1: 45,4% 03 pulmões com Grau 2: 27,3% 02 pulmões com Grau 3: 18,2% 01 pulmões com Grau 4: 9,09%

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](#)