

GUSTAVO MANOEL RIGUEIRA SIMÃO

**DOENÇA SUBCLÍNICA ASSOCIADA AO *porcine circovirus 2* (PCV-2) EM
REBANHO SUÍNO: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E
QUANTIFICAÇÃO VIRAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

GUSTAVO MANOEL RIGUEIRA SIMÃO

**DOENÇA SUBCLÍNICA ASSOCIADA AO *porcine circovirus 2* (PCV-2) EM
REBANHO SUÍNO: AVALIAÇÃO SOROLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E
QUANTIFICAÇÃO VIRAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2010

Prof. Abelardo Silva Júnior
(Coorientador)

Prof. Luis Augusto Nero
(Coorientador)

Prof^a. Simone Eliza Facioni Guimarães

Dr. Glauber Souza de Machado

Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

Aos meus pais, Marcelo Simão e Maria Luiza Rigueira Simão.
Gostaria de deixar os meus eternos agradecimentos, por terem acreditado na
minha responsabilidade e por não terem medido esforços ao investir na minha
educação.

Obrigado meus queridos, amo vocês!

Aos meus irmãos, Fábio e Priscila:

Pelas trocas de experiências de vida e de carinho, ao longo destes anos.

Sem dúvida, os meus melhores amigos!

À minha cunhada Marcela e aos meus queridos sobrinhos Lucas e Henrique:

Pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus avós- “In memoriam”

Por terem participado muito em toda minha educação e formação pessoal.

À Maria Beatriz T. Ortolani (Bibi)

Pelos momentos inesquecíveis e únicos que passamos juntos.

À Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo

Por ter acreditado em mim e por não medir esforços para me ajudar nos
momentos que precisei.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me deixar respirar, por me deixar existir.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao BIOAGRO, pelas condições de trabalho.

Ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), por todo apoio material e espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao serviço de transporte da UFV, utilizado na realização de experimentos na UFMG.

Aos demais professores do Departamento de Veterinária, pelo apoio e compromisso com o ensino.

Ao Prof. Abelardo Silva Júnior, pela excelente co-orientação, companheirismo e disponibilidade de seu laboratório.

Ao Prof. Luis Augusto Nero, pela co-orientação e ajuda nas análises estatísticas.

À Grazielle Hernandes Volpato, por me receber em sua casa e por me auxiliar nas análises estatísticas.

À Professora Zélia Inês Portela Lobato, pela disponibilidade de seu laboratório.

À Prof^a. Juliana Lopes Rangel Fietto, pelo companheirismo e amizade.

Ao Prof. Joaquin Patarroyo, pelas disciplinas árduas, porém muito proveitosas.

Ao Orlando Chiarelli Neto, por ser o meu professor nas bancadas do laboratório.

Ao Vinícius Winter Viana, pela grande ajuda na coleta das amostras e análise histopatológica.

À Fernanda Miquelito Figueira da Silva, pela grande ajuda nos testes laboratoriais.

À Priscilla Freitas Guerber, pelo auxílio nos testes de soroneutralização.

Ao Diego de Ávila Martins, João Paulo Machado e Juliana Evangelista Bezerril, pela grande ajuda no laboratório de histopatologia.

Ao Médico Veterinário Alcebíades Silva, por ter nos auxiliado na seleção dos animais e nas coletas das amostras.

À empresa Pif-Paf, por ter aberto as portas do frigorífico para coleta das amostras.

À granja Cinco Estrelas (Patrocínio-MG), por ter cedido os animais e pela grande ajuda na identificação dos mesmos.

A todos os funcionários do Departamento de Veterinária.

Aos técnicos, Marquinhos (DVT) e Sr. Valdir (LIMA), que sempre me ajudaram e são peças fundamentais dentro do laboratório.

Aos Porecas, pela amizade, companheirismo, churrascos, encontros, viagens, sambas e emoções. “Eu investi em amizade”.

A todos os meus amigos do LIMA, pela ótima convivência e pelo apoio no ambiente de trabalho.

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISAO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Porcine circovirus 2</i>	3
2.2 Propriedades biológicas, características moleculares e replicativas do PCV-2.....	7
2.3 Patogênese da infecção pelo PCV-2	8
2.4 Imunopatogênese do PCV-2	10
2.5 Efeitos da co-infecção por outros patógenos	12
2.6 Sinais clínicos e aspectos patológicos.....	13
2.7 Vias de transmissão.....	16
2.8 Impactos econômicos causados pelo PCV-2	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Seleção de animais e obtenção de parâmetros produtivos.....	20
4.2 Análises laboratoriais.....	21
4.2.1 Coleta de amostras	21
4.2.2 Extração de DNA e realização da PCR em tempo real.....	21
4.2.3 Teste de neutralização viral (TNV).....	23
4.2.4 Análise histopatológica	24
4.3 Análise estatística	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frequência dos estágios de lesões encontrados nos linfonodos inguinais de suínos clinicamente sadios. (SLS - sem lesão significativa).....	29
Figura 2: Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno sem lesões significativas (SLS) (aumento 100x); Setas mostram a presença de centros germinativos bem delimitados e íntegros.....	29
Figura 3: Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio I (aumento de 40x); Setas mostram centros germinativos conservados e leve diminuição da quantidade de linfócitos nos folículos.. ..	30
Figura 4: Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio I (aumento de 400x); Setas mostram leve infiltrado de células do sistema mononuclear fagocítico (macrófagos).....	30
Figura 5: Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio II (aumento de 100x); Setas mostram centros germinativos alterados e sem arquitetura mantida.....	31
Figura 6: Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio II (aumento de 400x); Setas pretas mostram moderado infiltrado do sistema mononuclear fagocítico com presença de inúmeros macrófagos substituindo os linfócitos residentes. Seta branca mostra formação de célula gigante indicando processo inflamatório mais avançado.	31
Figura 7: Frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes encontrados em suínos clinicamente sadios.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Sequências dos primers e da sonda utilizada.....	22
TABELA 2: Análise descritiva dos parâmetros laboratoriais e produtivos de suínos de abate clinicamente sadios.....	26
TABELA 3: Valores de mediana (valores dos quartis 25-75) dos parâmetros laboratoriais e produtivos em relação ao sexo de animais de abate clinicamente sadios.....	27
TABELA 4: Teste de correlação entre os parâmetros laboratoriais e produtivos de suínos de abate clinicamente sadios.....	28
TABELA 5: Valores de mediana (valores dos quartis 25-75) dos parâmetros laboratoriais e produtivos em relação aos estágios de lesão histopatológico dos linfonodos de animais de abate clinicamente sadios.....	32
TABELA 6: Valores de mediana (valores dos quartis 25-75) dos parâmetros laboratoriais e produtivos em relação aos títulos de anticorpos neutralizantes de animais de abate clinicamente sadios.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADV – *Aujeszky's disease virus*
- AEC - 3-amino-9-dietil-carbazole
- AN – Anticorpos neutralizantes
- APC – Células apresentadoras de antígenos
- Cap – Proteína do capsídeo
- Células NK – *Natural Killer*
- Ct – *threshold cycle*
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- Ig – Imunoglobulina
- IHC - Imunoistoquímica
- IHS - Hibridização *in situ*
- IIF – Imunofluorescência indireta
- IL - Interleucina
- INF- γ – Interferon gama
- IPMA – Ensaio de imunoperoxidase em monocamada
- Kb – Kilobase
- KDa – Kilodalton
- NIPCs – Células produtoras de interferon natural
- ORF – Fase de leitura aberta
- pb – Pares de bases
- PBS - *Phosphate buffered saline*
- PCQ – Peso da carcaça quente

- PCR – *Polymerase Chain Reaction*
- PCV – *Porcine circovirus*
- PCVAD – Doenças associadas ao *Porcine circovirus*
- PCVD – Doenças do *Porcine circovirus*
- PDNS – Síndrome nefropática e dermatológica do suíno
- PK15 - *Pig kidney cells*
- PMWS – Síndrome de refugagem multisistêmica pós-desmame do suíno
- PNP - Pneumonia necrotizante e proliferativa
- PPV - *Porcine parvovirus*
- PRDC – Complexo de doenças respiratórias do suíno
- PriProET – *Prime-probe energy transfer*
- PRRSV – Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva do suíno
- PV – Peso vivo
- Rep – Proteína de replicação
- SFB – Soro fetal bovino
- SIV – *Swine influenza virus*
- SLS – Sem lesão significativa
- SN - Soroneutralização
- SPF – Livre de patógenos específicos
- TCID₅₀ – *Median Tissue Culture Infective d.*, Quantidade de microorganismos (vírus) que produzirá um efeito citopático em 50% da cultura inoculada
- TNF – Fator de necrose tumoral

RESUMO

SIMÃO, Gustavo Manoel Rigueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Doença subclínica associada ao *Porcine circovirus 2* (PCV-2) em rebanho suíno: avaliação sorológica, histopatológica e quantificação viral.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, Luis Augusto Nero e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O *Porcine circovirus 2* (PCV-2) é um vírus pequeno, não-envelopado e pertencente à família *Circoviridae*, por apresentar forma icosaédrica e genoma circular. O PCV-2 é o principal agente causador da síndrome de refugagem multisistêmica pós-desmame do suíno (PMWS), uma das mais importantes doenças emergentes de suínos no mundo, identificada, em 1991, em animais livres de patógenos específicos (SPF) e descrita pela primeira vez em 1997. O PCV-2 está associado a várias outras síndromes, o que levou a uma nova denominação para a doença: Doenças associadas ao PCV-2 (PCVAD). Tão importante quanto a doença clínica, a infecção subclínica pelo PCV-2 tem ganhado grande importância nos estudos da circovirose suína. O objetivo deste trabalho foi analisar os indicadores laboratoriais da doença subclínica associada ao PCV-2 e associar os parâmetros produtivos de suínos de abate naturalmente infectados. Para isso, foram coletadas amostras de soros e linfonodos inguinais individuais de sessenta e quatro suínos de abate clinicamente saudáveis. Parâmetros produtivos como peso vivo (PV) e o peso da carcaça quente (PCQ) de cada animal também foram mensurados para posterior associação. A carga viral no linfonodo e no soro foi quantificada pela PCR em tempo real e os anticorpos neutralizantes (AN) foram titulados pelo teste de neutralização viral (TNV). Os linfonodos foram examinados quanto à depleção linfóide, proliferação de histiócitos e presença de células gigantes multinucleadas. Foram avaliados em sem lesão significativa (SLS), estágio I (lesão leve), II (lesão moderada) ou III (lesão severa). A carga viral presente nos linfonodos inguinais e nos soros variou de $10^{3,82}$ a $10^{6,77}$ cópias de PCV-2/500ng de DNA total e de 0 a $10^{2,89}$ cópias de PCV-2/5 μ L de DNA, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os valores das cargas virais, considerando o sexo. Também não houve correlação significativa entre as cargas virais e os parâmetros produtivos analisados. Dentre os animais analisados, 53,13% não apresentaram

lesões significativas no linfonodo, 37,5% foram classificados em estágio I e 9,37% em estágio II de lesão. A titulação de AN se mostrou variável entre os suínos analisados. Os títulos variaram de 64 a 2048, sendo este último representado por 65,62% dos animais. Foi encontrada diferença significativa entre os valores da carga viral nos linfonodos em relação aos títulos de AN ($p < 0,05$), nas amostras com títulos 512 e 2048. Podemos concluir que a infectividade do PCV-2 se mostrou semelhante entre machos e fêmeas e que achados laboratoriais da infecção subclínica, associada ao PCV2, não apresentam associação com os parâmetros produtivos. Portanto, foi avaliada e demonstrada a ocorrência da doença subclínica no rebanho analisado. Desta forma, permanecem ainda como objeto de pesquisa maiores estudos sobre a implicação desta nova apresentação da doença em rebanhos de suínos.

ABSTRACT

SIMÃO, Gustavo Manoel Rigueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Subclinical disease associated with Porcine circovirus 2 (PCV-2) in pig herds: serologic, histopathological and viral quantification.** Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior, Luis Augusto Nero and Juliana Lopes Rangel Fietto.

The *Porcine circovirus 2* (PCV-2) virus is a small, non-enveloped and belonging to the *Circoviridae* family by presenting icosahedral symmetry and circular genome. The PCV-2 is the primary causative agent of the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), one of the most important emerging disease of pigs in the world, identified in 1991 in Specific Pathogen Free (SPF) pigs and first described in 1997. The PCV-2 is associated with several other syndromes, which led to a new name for the disease: "PCV-2-associated disease" (PCVAD). As important as the clinical disease, subclinical infection has gained great importance in studies of porcine. The objective of this study was to evaluate the productive impact of the subclinical infection in slaughter healthy animals. For this, were collected serum samples and inguinal lymph nodes individual of sixty-four slaughter pigs. The viral load in lymph and serum were quantified by real-time PCR and neutralizing antibodies (NA) were measured by virus neutralization test (VNT). The lymph nodes were examined for lymphoid depletion, histiocytes proliferation, the presence of multinucleated giant cells and evaluated without significant injury (SLS), stage I (mild injury), II (moderate injury) or III (severe injury). The viral load present in the inguinal lymph nodes and sera ranged from $10^{3,82}$ to $10^{6,77}$ PCV-2 copies/500ng total DNA and 0 to $10^{2,89}$ PCV-2 copies/5 μ L DNA, respectively. There was no significant difference between the values of viral loads considering gender. There was also no significant correlation between viral loads and the productive analysis. Among the animals tested, 53.13% showed no significant lesions in the lymph node, 37.5% were classified as stage I and 9.37% in stage II lesion. The NA title was variable among the pigs tested. The titles ranged from 64 to 2048, the latter being represented by 65.62% of the animals. It was observed a significant difference between the values of viral load in lymph nodes in relation to evidence of NA ($p < 0.05$) in samples with 512 titles and 2048. We can conclude that the infectivity of PCV-2 was similar between males and females and laboratory findings of subclinical infection PCV2- associated have no association with the production

parameters. Therefore, we evaluated and demonstrated the occurrence of subclinical disease in the herd studied. Thus, there still remains a subject of major research studies on the implication of this new presentation of the disease in herds of pigs.

1 INTRODUÇÃO

O *Porcine circovirus 2* (PCV-2) é um vírus pequeno, não-envelopado e pertencente à família *Circoviridae*, por apresentar forma icosaédrica e genoma circular, sendo responsável por infecções em vertebrados (Todd, 2000). O PCV-2 é o principal agente causador da síndrome de refugagem multisistêmica pós-desmame do suíno (PMWS), uma das mais importantes doenças emergentes de suínos no mundo (Firth et al., 2009; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002).

O PCV-2 mostrou estar associado a várias outras síndromes (Meehan et al., 2001), levando uma nova denominação à doença: Doenças associadas ao PCV-2 (PCVAD) (Segales et al., 2005a). Tão importante como a doença clínica, a infecção subclínica tem ganhado grande atenção nos últimos anos (Darwich et al., 2008; Steiner et al., 2009).

A desuniformidade dos animais de um mesmo lote no momento do abate é um problema que pode comprometer a produtividade e o retorno financeiro, pois alguns animais poderão chegar ao final da vida produtiva com o peso abaixo do esperado, podendo aumentar, significativamente, os custos de produção para atender às exigências da indústria e do mercado (Deen & Larriestra, 2004). Estas variações nos crescimentos dos suínos podem ser causadas, principalmente, por diferenças no genótipo, na sanidade e por práticas inadequadas de manejo. Neste contexto, as doenças, em especial as subclínicas, são, provavelmente, uma das causas mais importantes para a variação nas taxas de crescimento (Grau et al., 2001).

De forma geral, todos os animais em condições de campo estão infectados pelo PCV-2 (Larochelle et al., 2003; Ramamoorthy & Meng, 2009). Em 2005, baseado em dados de empresas integradoras, estimou-se um impacto econômico anual de 33 milhões de reais apenas para a região Sul do Brasil (Morés, 2005). Nos Estados Unidos, as perdas chegaram a US\$ 20,00 por suíno (Gillespie et al., 2009).

As evidências mostram que a infecção subclínica associada ao PCV-2 apresenta considerável carga viral nos tecidos associado à depleção linfóide (Segales et al., 2004b), podendo, assim, comprometer todo o potencial de produção dos suínos (Ramamoorthy & Meng, 2009). Com a introdução de vacinas comerciais contra PCV-2 nas granjas, formas clínicas da PMWS começaram a ser controladas e, com isso, os prejuízos econômicos diminuíram consideravelmente (Cline et al., 2008; Horlen et al., 2008). Porém, a não manifestação da doença clínica não significa que o animal esteja fora do comprometimento produtivo (Grau et al., 2001; King et al., 2008).

Informações sobre a interferência da infecção subclínica pelo PCV2 no desempenho produtivo de suínos são escassos, o que salienta a necessidade de analisar indicadores laboratoriais a partir da aplicação de ferramentas biomoleculares e, por conseguinte, associar aos parâmetros produtivos dos animais.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 *Porcine circovirus 2*

Em meados dos anos 70, um grupo de cientistas alemães descreveu, pela primeira vez, um vírus que infectava determinada linhagem de células de rins de suínos, a PK-15 (ATCC-CCL33). O novo contaminante não causava efeito citopático e foi considerado parente próximo dos *Picornavirus* (Tischer et al., 1974). No ano de 1982, foi sugerido o nome de *Porcine circovirus* (PCV) para o novo agente (Tischer et al., 1982). Em pouco tempo começaram a aparecer animais soropositivos para o PCV em várias partes do mundo, mostrando sua rápida disseminação nas populações de suínos na Alemanha (Tischer et al., 1986), Canadá (Dulac & Afshar, 1989), Grã-Bretanha (Edwards & Sands, 1994) e Irlanda do Norte (Allan et al., 1994). Contudo, infecções experimentais realizadas em animais convencionais naquela época não resultaram em nenhuma doença clínica, sendo o vírus considerado como não patogênico (Allan et al., 1995; Tischer et al., 1986).

No final da década de 1990, um novo vírus semelhante ao PCV foi isolado de suínos que apresentavam manifestações clínicas no oeste do Canadá (Ellis et al., 1998). Em pouco tempo, vírus semelhantes foram também isolados de suínos doentes em outras partes da América do Norte e da Europa (Allan et al., 1998). Com o uso de anticorpos monoclonais, policlonais e por meio de análises de sequências genômicas, estes isolados mostraram ser antigênicos e geneticamente distintos do vírus contaminante de células PK-15. Assim, foi proposto que este vírus isolado de animais doentes seria denominado de *Porcine circovirus 2* (PCV-2) e o PCV original, contaminante de células PK-15, chamado de *Porcine circovirus 1* (PCV-1) (Allan et al., 1999a). Mais tarde, o PCV-2 foi considerado um patógeno emergente de grande importância na suinocultura mundial, sendo apontado como o principal causador de diferentes tipos de síndromes e responsável por importantes perdas na indústria de carne suína

em todo o mundo (Banks et al., 2006; Castro et al., 2004; Choi et al., 2000; Csagola et al., 2006; Fenaux et al., 2000; Rodriguez-Arriola et al., 2003b).

Uma suposta síndrome de refugagem primeiramente identificada em 1991 em animais livres de patógenos específicos (SPF) foi descrita em 1997 (Harding, 1997). Foi proposto pelos autores o termo “Síndrome de refugagem multisistêmica pós-desmame dos suínos” (Postweaning multisystemic wasting syndrome - PMWS), para descrever a nova condição clínica encontrada nos animais, a qual, mais tarde, foi associada ao PCV-2 (Morozov et al., 1998). A presença de ácidos nucléicos do PCV-2 em lesões de suínos afetados foi descrita em 1998 (Ellis et al., 1998). Também neste ano, a enfermidade chamada de tremor congênito de suínos mostrou estar relacionada ao PCV-2 (Hamel et al., 1998), porém, mais tarde, foi considerado controverso por alguns pesquisadores (Kennedy et al., 2003). Em 1996 e 1997 foram relatadas manifestações clínicas associadas ao PCV-2 na França (LeCann et al., 1997) e na Espanha (Segales et al., 1997). Desde então, a PMWS associada ao PCV-2 começou a ser descrita em quase todos os países produtores de suínos. Lesões histopatológicas associadas a grande quantidade de antígeno de PCV-2 foram descritas em arquivos teciduais de 1986, originados de suínos da Espanha e Reino Unido (Grierson et al., 2004; Rodriguez-Arriola et al., 2003a) e em 1989 no Japão (Mori et al., 2000).

No Brasil, a primeira descrição do aparecimento da PMWS foi feita em 2000, no Estado de Santa Catarina (Ciacci-Zanella, 2000), sendo, posteriormente, descrito em 2002 na região sudeste (Sobestiansky et al., 2002), e em 2003 no Rio Grande do Sul (Pescador et al., 2003). Porém, a presença do DNA viral do PCV-2 já foi detectada pela técnica de PCR em tecidos de suínos arquivados em 1978, o que pode ser considerada como a descrição mais antiga deste vírus no Brasil (Silva-Júnior et al., 2009).

O PCV-2 também tem sido associado com outra síndrome de rápida expansão em suínos, denominada “síndrome nefropática e dermatológica dos suínos” (Porcine dermatitis

and nephropathy syndrome - PDNS) (Rosell et al., 2000), a qual alcançou, nos últimos anos, proporções de epidemia em alguns países. Esta síndrome foi descrita, inicialmente, na Inglaterra, em 1993 (Smith et al., 1993). As semelhanças entre a PMWS e a PDNS incluem depleção linfóide, presença de células sinciciais, infiltração inflamatória granulomatosa em tecidos linfóides e pneumonia intersticial (Rosell et al., 2000).

Enfermidades respiratórias também foram associadas ao PCV-2, sendo chamadas de “Complexo de doenças respiratórias dos suínos” (Porcine respiratory disease complex - PRDC) (Chae, 2005; Kim et al., 2003). Desordens reprodutivas também foram descritas envolvendo o PCV-2 (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2001; Meehan et al., 2001). No final da década de 1990, grande quantidade de antígenos foi encontrada em amostras do coração de suínos com miocardite neonatal (West et al., 1999), sendo observados também em lesões de pulmões originados de suínos com “Pneumonia necrotizante e proliferativa” (PNP) (Allan & Ellis, 2000).

O PCV-2 tem sido associado com grande número de síndromes e doenças que afetam os suínos. Com isso, uma nova terminologia foi sugerida para denominar esta enfermidade, passando a se chamar “Doenças do *Porcine circovirus 2*” (Porcine circovirus diseases - PCVD) (Allan et al., 2002) e mais tarde na Europa sendo denominado como “Doenças associadas ao *Porcine circovirus 2*” (Porcine circovirus associated diseases - PCVAD) (Segales et al., 2005a).

Segundo dados do laboratório de diagnóstico veterinário da Universidade do Estado de Iowa (EUA), a PCVAD inclui infecções sistêmicas, pneumonia associadas ao PCV-2, enterites associadas ao PCV-2, falhas reprodutivas associadas ao PCV-2 e a PDNS também associada ao PCV-2 (Opriessnig et al., 2007). Porém, somente a PMWS e falhas reprodutivas associadas ao PCV-2 foram possíveis de se reproduzir experimentalmente (Hansen et al., 2009).

O PCV-2, quando associado a outros patógenos, como o *Porcine parvovirus* (PPV) (Allan et al., 1999a; Ellis et al., 2000; Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2000) ou o *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) (Allan et al., 2000; Rovira et al., 2002), torna-se muito agressivo ao organismo do suíno, podendo levar ao aparecimento da PMWS na sua forma mais severa. Por outro lado, alguns trabalhos mostraram grande percentagem de suínos apresentando sinais clínicos moderados e lesões histológicas leves quando inoculados somente com o PCV-2 (Bolin et al., 2001; Harms et al., 2001; Okuda et al., 2003).

O PCV-2 foi classificado em dois grupos (grupo 1 ou PCV-2b e grupo 2 ou PCV-2a) e oito subgrupos (1A a 1C e 2A a 2E), sendo que a maioria dos genomas dos isolados sequenciados de PCV-2 se enquadra no grupo 1 (Cheung et al., 2007; Olvera et al., 2007). Estudos de análises sequenciais de nucleotídeos da ORF2 mostraram grande índice de isolados pertencentes ao grupo 1 (94%) em detrimento ao grupo 2 (6%), sendo que isolados do subgrupo 1A foram correlacionados com animais que apresentavam sinais clínicos da PMWS e isolados de animais sem manifestações clínicas são incluídos no grupo 2 (An et al., 2007; Grau-Roma et al., 2008). Sequências das ORFs de isolados de diferentes estados brasileiros mostraram uma forte identidade com isolados da Ásia, Europa, América do Norte e África, sendo que as amostras do estado de Minas Gerais apresentaram 100% de identidade com sequências de isolados franceses (Chiarelli-Neto et al., 2009). Eventos de recombinação entre o PCV-2a / PCV-2b ou grupo 2 e grupo 1 foram destaques em estudo realizado a campo nos Estados Unidos, onde houve detecção de infecções naturais com múltiplos genótipos de PCV-2 (Hesse et al., 2008).

2.2 Propriedades biológicas, características moleculares e replicativas do PCV-2

O PCV-2 é um vírus pequeno e não envelopado que contém uma fita simples de DNA de 1,76 Kb. Este vírus é classificado dentro da família *Circoviridae*. É resistente à inativação pós-exposição a pH 3,0, clorofórmio e temperaturas variando de 56 °C a 70 °C (Fenaux et al., 2004; Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997; Tischer et al., 1982).

O genoma do PCV-1 e PCV-2 contém 1759 pb e 1768 pb, respectivamente (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997) e são organizados de forma similar, possuindo 76% de identidade entre si. O genoma deste vírus possui três principais fases de leitura aberta (ORFs): ORF1, ORF2 (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998) e ORF3 (Liu et al., 2005).

A ORF1 codifica uma proteína chamada rep, essencial para a replicação, e a ORF2 codifica a cap, uma proteína envolvida na formação do capsídeo viral (Nawagitgul et al., 2000). Há uma identidade de 85% da ORF1 entre PCV-1 e PCV-2 e de 65% da ORF2 entre os mesmos (Castro et al., 2003). As proteínas codificadas pela ORF2 do PCV-1 e pela ORF2 do PCV-2 apresentam tamanhos similares de aproximadamente 30 kDa (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998). A ORF1 do PCV-1 e do PCV-2 possuem 936 e 942 pb, respectivamente, e a ORF2 de ambos possui 699 pb (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997).

No genoma do PCV-1, o produto gênico expresso pela ORF3 ainda não foi identificado. A proteína expressa pela ORF3 do genoma do PCV-2 possui 305 aminoácidos e não está envolvida na replicação viral, porém envolvida na indução de apoptose em cultivo celular (Liu et al., 2005). Essa proteína é capaz de interagir com a proteína pPirh2, desestabilizando sua ação inibitória sobre p53, que por sua vez aumenta seus níveis de expressão e induz a célula a entrar em apoptose (Liu et al., 2007). Estudos com camundongos

revelaram que a ORF3 está diretamente relacionada na patogênese viral *in vivo* (Liu et al., 2006). O estudo de Karuppanan et al. (2009) mostrou que a infecção em suínos SPF por um PCV-2 mutante da ORF3 resultou em uma menor viremia e ausência de lesões significativas nos órgãos linfóides.

O PCV replica no núcleo da célula infectada pela formação de uma fita dupla (RF dsDNA), utilizando o mecanismo de círculo rolante. A proteína rep é a responsável pela clivagem do DNA viral, formando um terminal 3'-OH livre para o início da replicação. A replicação *in vitro* do DNA do PCV mostra ser dependente das enzimas da fase "S" do ciclo celular. A replicação somente se inicia após a passagem da célula pela mitose (Tischer et al., 1995). Durante a fase G1 do ciclo de crescimento celular, o fator de ativação AP-1 é produzido e este se liga especificamente à sequência consenso TGA (C/G) TCA. A sequência TGAGTCT, que é similar ao sítio de ligação AP-1, é identificada no genoma do PCV (Franza et al., 1988).

2.3 Patogênese da infecção pelo PCV-2

A patogênese da infecção pelo PCV-2 e os principais tipos celulares envolvidos na replicação do vírus não estão ainda bem elucidados. Sabe-se que a depleção linfóide e a linfopenia são características consistentes do desenvolvimento clínico da PMWS em suínos (Allan & Ellis, 2000), porém cada indivíduo pode reagir de forma diferente. Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002) mostraram grande variação da replicação viral nos organismos de suínos experimentalmente inoculados pelo PCV-2, principalmente nos estágios mais avançados de infecção.

Análises laboratoriais como a imunoistoquímica (IHC) mostraram grande quantidade de antígenos de PCV-2 no citoplasma de macrófagos e células dendríticas presentes nos

folículos germinativos dos linfonodos, evidenciando também a substituição de linfócitos por células inflamatórias nos órgãos linfóides (Allan & Ellis, 2000; Chianini et al., 2003; Sirinarumitr et al., 2000).

Estudos *in vitro* sugeriram que células monocíticas não podem ser consideradas alvos primários para a replicação do PCV-2 (Gilpin et al., 2003). Da mesma forma, nenhuma evidência da replicação viral *in vitro* foi observada em células dendríticas. Entretanto, existem especulações sobre a grande capacidade migratória destas células, podendo servir como veículos para o transporte do vírus através do hospedeiro (Vincent et al., 2003).

Em 2005, um grupo francês demonstrou que suínos SPF, inoculados com DNA do PCV-2, desenvolveram lesões compatíveis à PMWS sistêmica, reforçando a hipótese de que o PCV-2 é essencial para o desenvolvimento da PMWS (Grasland et al., 2005). Entretanto, a maioria dos isolados de PCV-2 comumente requerem co-fatores para induzir todos os sinais clínicos e lesões associadas com casos avançados da PMWS (Kawashima et al., 2007; Opriessnig et al., 2006; Timmusk et al., 2009).

Vários fatores, como diferenças entre os isolados de PCV-2, co-infecções, modulação imune e susceptibilidade do indivíduo, são determinantes para que o animal manifeste ou não a doença clínica, mostrando assim que a PCVAD é uma doença multifatorial na casualidade e que nem todos os suínos infectados com o PCV-2 são capazes de desenvolver a doença na sua forma mais severa. Indivíduos infectados pelo PCV-2 podem resistir à infecção por apresentarem o sistema imune bem desenvolvido e, portanto, baixos níveis de viremia, levando a soroconversão eficiente, fazendo com que a doença permaneça na sua forma subclínica (Opriessnig et al., 2007).

Sabe-se que grande percentagem de suínos clinicamente sadios estão infectados com o PCV-2. Dados de análises genéticas e comparações de sequências de nucleotídeos do genoma de isolados de PCV-2 não conseguiram explicar completamente as diferenças entre as

manifestações clínicas. Genomas completos de dez isolados holandeses de animais afetados e não afetados pela PMWS foram sequenciados e quando comparados apresentaram 95,6% a 100% de identidade entre as sequências, o que levou a acreditar que o vírus não seria o principal responsável pela manifestação clínica da doença (Grierson et al., 2004). Outros trabalhos realizados utilizando isolados do Canadá, Estados Unidos, Europa e Ásia mostraram mesmas semelhanças entre as sequências de nucleotídeos do genoma de isolados de suínos apresentando diferentes manifestações clínicas da doença (Larochelle et al., 2002). Também foi demonstrado que um isolado da Suécia, que persistiu por dez anos sem causar a doença clínica em um plantel inicialmente SPF, foi capaz de induzir a doença sistêmica em suínos normais em condições experimentais (Allan et al., 2003; Hasslung et al., 2005).

2.4 Imunopatogênese do PCV-2

A infecção pelo PCV-2 sabidamente produz um efeito imunossupressor no hospedeiro. As lesões relacionadas são caracterizadas por depleção linfóide, leucopenia e destruição dos folículos linfóides (Ramamoorthy and Meng, 2009).

A carga viral no soro de suínos afetados clinicamente são maiores do que aqueles afetados pela infecção subclínica (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002; Liu et al., 2000; Meehan et al., 2001; Quintana et al., 2001; Rosell et al., 2000; Rovira et al., 2002). Embora a carga viral seja significativamente diferente entre os três estágios de lesões da PMWS, existe grande variedade dentro de cada categoria. A dinâmica da infecção viral, relacionada com o desenvolvimento da lesão e o tempo de recuperação do animal, ainda é desconhecida (Olvera et al., 2004).

A modulação imune é feita por meio de um conjunto de células dendríticas plasmocitárias que apresentam papel decisivo no aparecimento das características

imunológicas induzidas pelo vírus (Kenneth et al., 2009). A atividade imunomoduladora do PCV-2 é mediada pela inibição da função das células dendríticas plasmocitóides [Células produtoras de interferon natural (NIPC_s)] prejudicando assim a maturação de células dendríticas mielóides que apresentam implicações importantes para o reconhecimento eficiente de vírus e bactérias, favorecendo o estabelecimento de infecções adicionais associadas ao PCV-2 (Vincent et al., 2005).

Exames hematológicos revelaram redução de linfócitos T CD4⁺ e células B, resultando em quadro de depleção linfóide nos animais doentes (Segales et al., 2001). Os níveis de mRNA de IL-1 α e IL-10 demonstraram estar aumentados nos animais afetados, e níveis de mRNA de IL-2 e IL-2R α (CD25) parecem sofrer redução (Sipos et al., 2004).

Em exames histopatológicos dos linfonodos inguinais, as alterações celulares ocorrem com a diminuição da quantidade de linfócitos T, redução moderada a acentuada de células B ou até mesmo perda total das mesmas. Ocorre também aumento do número de macrófagos subcapsular e peritrabecular, perda parcial de células APC e redistribuição destas em todo tecido linfóide (Chianini et al., 2003; Segales et al., 2004a). A gravidade destas mudanças foi fortemente correlacionada com a gravidade das lesões histopatológicas causada pela PMWS e com a quantidade de antígenos de PCV-2 presente. A depleção de células T tem sido associada com diminuição de células CD4⁺ e em menor extensão de células CD8⁺ (Sarli et al., 2001). Suínos subclínicamente infectados desenvolveram resposta de IL10 específica para o PCV-2 durante a fase virêmica da infecção, que coincidiu com a inversão da razão IgM/IgG (Darwich et al., 2008).

Análises na cinética celular mostraram linfopenia consequente da diminuição de linfócitos B CD21⁺ e linfócitos T CD3⁺. Toda a subpopulação de linfócitos Th de memória CD3⁺CD4⁺CD8⁺, Th “naïve” CD3⁺CD4⁺CD8⁻, células Tc CD3⁺CD4⁻CD8⁺ e células $\gamma\delta$

TCR+ CD3+CD4-CD8- foram susceptíveis à infecção pelo PCV-2. As células NK CD3-CD4-CD8+ foram também diminuídas nos animais afetados pela PMWS (Nielsen et al., 2003).

O estudo da resposta típica da infecção pelo PCV-2 mostrou decréscimo de anticorpos passivos após a 3^a, e antes da 11^a semana de vida, reaparecendo por volta da 15^a semana e mantendo os títulos altos até a idade de abate (Rodriguez-Arrijoja et al., 2002). Foi demonstrado que os títulos de anticorpos neutralizantes são menores em animais com a doença clínica, enquanto os anticorpos totais permanecem em níveis iguais em animais sadios e clinicamente acometidos pela doença. Acredita-se que os níveis de IgM unicamente indicam infecção ativa (Fort et al., 2007).

Alguns estudos compararam parâmetros imunológicos referentes à circovirose suína sub-clínica com a evolução viral da infecção e observou-se aumento da produção de IL-10 nos primeiros estágios da doença, normalizando posteriormente após a recuperação do animal e mantendo-se sem sintomatologia clínica. Ao contrário, os animais doentes mantiveram seus níveis de IL-10 elevados, sugerindo ser a replicação viral a responsável por esse aumento (Darwich et al., 2004).

2.5 Efeitos da co-infecção por outros patógenos

Algumas co-infecções experimentais de suínos infectados pelo PCV-2 e bactérias como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Opriessnig et al., 2004) ou vírus como o *Porcine parvovirus* (PPV) (Allan et al., 1999a; Kennedy et al., 2000; Krakowka et al., 2000), *Swine influenza virus* (SIV) (Pallares et al., 2002), *Aujeszky's disease virus* (ADV) (Rodriguez-Arrijoja et al., 2003b) tem demonstrado ser fundamentais no aumento da carga viral e das lesões associadas ao PCV-2, levando a quadros severos da PMWS. Um estudo recente realizado na Índia mostrou a ocorrência, pela primeira vez, da infecção pelo PCV-2 associado

ao PPV em leitões mestiços com problemas reprodutivos e com mortalidade neonatal (Sharma & Saikumar, 2010).

O efeito potencializador das co-infecções na replicação do PCV-2 foi detectado acidentalmente quando suínos SPF foram inoculados com tecidos linfóides filtrados de animais com sintomatologia clínica da PMWS e naturalmente infectados (Ellis et al., 1999). Um estudo experimental, incluindo análises retrospectivas, enfatizou a importância das co-infecções na patogênese da PMWS (Ellis et al., 2004), levando a crer que o PCV-2 sozinho não poderia causar a doença. Entretanto, pesquisadores conseguiram reproduzir a síndrome, inoculando somente o PCV-2 em leitões SPF e leitões comuns (Balasch et al., 1999). Outro estudo realizado com suínos da Suécia e Dinamarca mostrou a reprodução experimental da PMWS, utilizando um isolado sueco (Hasslung et al., 2005). É possível que um agente desconhecido tenha algum papel no desenvolvimento da PCVAD. Porém, maiores pesquisas serão necessárias para elucidar as interações entre os diferentes patógenos que infectam suínos (Ramamoorthy & Meng, 2009).

2.6 Sinais clínicos e aspectos patológicos

A PMWS é a síndrome mais importante relacionada ao PCV-2 (Harding, 2004). Os sinais clínicos que formam a base para o diagnóstico preliminar são perda de peso, dispnéia, diarreia (Fenaux et al., 2003), aumento dos linfonodos (Harms et al., 2001) e palidez da pele (Bolin et al., 2001), sendo tipicamente encontrados em animais de 49 a 105 dias de idade, (Harding et al., 1998). Porém, estudos mostraram que a infecção pelo PCV-2 e a PMWS podem ocorrer também em animais de 84 a 133 dias de idade (Carman et al., 2008; D'Allaire et al., 2007; Fachinger et al., 2008).

Suínos na fase de terminação podem ser afetados pelo complexo de doenças respiratórias dos suínos (PRDC), ocorrendo entre 98 a 154 dias de idade (Chae, 2005; Kim et al., 2003). É possível que a infecção generalizada pelo PCV-2 tenha efeito no desenvolvimento da PRDC por induzir imunossupressão (Segales et al., 2004a), aumentando a susceptibilidade para co-infecções por outros patógenos. Animais com PRDC apresentaram principalmente broncopneumonia aguda, subaguda, crônica e depleção linfóide nos linfonodos traquiobronquiais (Hansen et al., 2009).

A Síndrome nefropática e dermatológica dos suínos (PDNS) afeta animais de 45 a 120 dias de idade (Smith et al., 1993; Thibault et al., 1998). Nos casos fatais, são observadas lesões cutâneas que consistem em vasculite necrotizante que afetam a derme, levando a necrose subcutânea e úlceras dérmicas hemorrágicas (Choi & Chae, 2001; Thibault et al., 1998).

O tremor congênito em suínos é causado pela desmielinização da medula cerebral e espinhal. A mortalidade pode alcançar taxas acima de 50%, como resultado da incapacidade motora do animal. A associação do PCV-2 ao tremor congênito ainda é controversa (Chae, 2004).

A pneumonia necrotizante proliferativa (PNP) foi inicialmente descrita em 1990 no Canadá, como problema respiratório em animais de creche e terminação (Morin et al., 1990), podendo ser causada pelo vírus influenza A (Girard et al., 1992). Outros estudos mostraram que a PNP pode ser resultado da co-infecção pelo PRRSV e o PCV-2 (Pesch et al., 2000).

Existem estudos da associação do PCV-2 a falhas reprodutivas. Os indicadores clínicos em granjas afetadas incluem elevadas taxas de abortos, retorno ao cio e mumificação fetal (Josephson & Charbonneau, 2001; Kim et al., 2004; Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2001; O'Connor et al., 2001; West et al., 1999).

O aumento dos linfonodos (principalmente o inguinal, mandibular, mesentérico e mediastínico) é uma das alterações patológicas mais comuns de animais com a PMWS. Em menor ocorrência, os linfonodos podem apresentar áreas de necrose multifocal visíveis macroscopicamente. Em animais clinicamente saudáveis, a massa viral se encontra mais baixa e, portanto, as lesões apresentam-se com intensidades mais leves quando comparados a suínos na fase inicial da doença (Quintana et al., 2001). O ácido nucléico do PCV-2 é detectado no citoplasma de histiócitos, de células gigantes multinucleares e outras células da linhagem de macrófagos e monócitos, assim como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas de tecidos linfóides (Allan & Ellis, 2000; Rosell et al., 1999).

As principais lesões histopatológicas da PMWS estão relacionadas com o sistema linfocitário, apresentando processos de depleção linfóide, perda da arquitetura tecidual, infiltração histiocitária, que frequentemente contém corpos de inclusão citoplasmáticos, basofílicos e que são vistos como grandes inclusões individuais (sincícios) ou como corpos pequenos múltiplos (Allan et al., 1998; Fenaux et al., 2002; Rosell et al., 1999). Em casos mais crônicos, a depleção linfocitária tende a ser menos severa com menor proliferação de histiócitos e menor infiltração de células gigantes multinucleadas (Quintana et al., 2001). Além disso, lesões leves a moderadas típicas da PMWS podem ser observadas em animais clinicamente normais, indicando que a infecção subclínica pelo PCV-2 ocorre frequentemente em granjas afetadas e não afetadas pela PMWS (Rodríguez-Arriola et al., 2000). Segundo Chianini et al. (2003), os diferentes estágios de lesões podem ser classificados e padronizados, em “sem lesão significativa (SLS)”, estágio I, estágio II, estágio III, de acordo com a severidade das mesmas.

Uma percentagem de animais afetados pela PMWS pode apresentar também atrofia e descoloração hepática, principalmente em casos de ocorrência de icterícia tipicamente evidente, e o córtex renal com focos de necrose (Segales & Domingo, 2002).

Outras lesões histológicas apresentadas pela PMWS incluem a presença de linfocitos e granulomas inflamatórios nos pulmões e rins, assim como, depleção linfóide (Clark, 1997). Pneumonia intersticial subaguda é comum nas lesões pulmonares (Rossell et al., 1999). Em alguns casos é possível ver grandes histiocitos e células gigantes multinucleares na área alveolar. Nos casos crônicos, é possível verificar bronquiolite fibrosa. As lesões hepáticas têm sido descritas pela ocorrência de infiltrado inflamatório na área portal, necrose de hepatócitos, expansão e vacuolização do citoplasma de hepatócitos (Clark, 1997).

O diagnóstico definitivo das doenças relacionadas ao PCV-2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões e sinais clínicos causados pela doença. Não há efeito citopático causado pelo PCV em cultivo celular. Métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV-2 incluem hibridização *in situ* (IHS), imunohistoquímica (IHC), ensaios de imunofluorescência (IIF) (Ellis et al., 1998; Ellis et al., 1999; Morozov et al., 1998), assim como a reação da polimerase em cadeia (PCR) (Allan et al., 1999b; Laroche et al., 1999) e mais recentemente a PCR em tempo real (Fenaux et al., 2004; Madson et al., 2009; Opriessnig et al., 2006).

2.7 Vias de transmissão

A transmissão horizontal do PCV-2 é considerada muito eficiente entre os suínos, devido ao contato contínuo destes animais durante toda a vida (Grau-Roma et al., 2009). O PCV-2 está presente em todas as vias de secreção e excreção do hospedeiro, sendo encontrado tanto em suínos afetados pela PMWS e em suínos não afetados. Porém, as maiores cargas virais estão associadas aos animais clinicamente acometidos (Segales et al., 2005b). O PCV-2 foi igualmente detectado no leite das porcas, incluindo colostro (Ha et al., 2009), e em sêmen

de cachaços, sem que existam alterações na morfologia ou viabilidade dos espermatozoides (McIntosh et al., 2006).

Em um estudo recente, no qual os leitões foram monitorados, a partir da primeira semana de vida até o surgimento da doença, observou-se uma correlação entre a viremia e a carga viral em secreções nasais e em fezes, sugerindo a importância de ambas as vias para a excreção do PCV-2. O mesmo estudo mostrou uma maior prevalência de PCV-2 em secreções nasais do que nas fezes, apoiando a ideia de que a via oro - nasal é, provavelmente, a principal via de transmissão horizontal do PCV-2 (Lopez-Soria et al., 2008).

Apesar de não se conhecer bem os mecanismos nem a frequência com que ocorre a transmissão vertical do PCV-2, evidências mostram o isolamento do vírus em leitões abortados, com lesões características no miocárdio (Pujols et al., 2008).

O vírus foi detectado em sêmen de cachaços infectados naturalmente e experimentalmente, mesmo após o aparecimento de anticorpos no soro. A excreção pelo sêmen foi detectada entre os dias 5 e 47 após a infecção, mostrando ser um importante meio de transmissão. O vírus também é capaz de se replicar na zona pelúcida de embriões, levando à morte embrionária (Mateusen et al., 2007).

2.8 Impactos econômicos causados pelo PCV-2

As manifestações clínicas associadas ao PCV-2 no Brasil têm sido frequentes e comuns nas principais regiões produtoras do país, o que acarreta diminuição da produtividade e grandes prejuízos econômicos ao setor (Morés, 2005). Estudos sorológicos utilizando o teste de ELISA mostraram que tem sido difícil identificar plantéis sorologicamente negativos para o PCV-2, sugerindo que a infecção é distribuída mundialmente (Bogdan et al., 2001).

Embora não exista nenhum estudo que revele a prevalência da PCVAD no Brasil, estima-se que os impactos econômicos da doença ainda têm sido subestimados. Estudos realizados na região Sul do país mostraram índices de mortalidade variando entre 2 a 10 % e a ocorrência em 2003 foi estimada em 62% das unidades produtoras de leitão (UPL) e 66,7% das terminações estudadas. Estes dados levam a estimativa de prejuízo em torno de 33 milhões de reais por ano, apenas para a região sul do Brasil (Morés, 2005). Em outros países, mais especificamente no Reino Unido e França, foi observado um impacto econômico da doença com uma queda de 15% de crescimento por animal (Ciacci-Zanella et al., 2006). Nos Estados Unidos, as perdas foram estimadas em US\$ 3,00- 4,00 por suíno, chegando a picos de até US\$ 20,00 por animal (Gillespie et al., 2009).

Tão importante quanto a avaliação clínica dos animais, o acompanhamento dos índices de produção torna-se essencial para detecção de problemas presentes nas granjas, principalmente em se tratando de doenças subclínicas (Guedes, 2005).

3 OBJETIVOS

Analisar os dados laboratoriais de suínos de abate subclínicamente infectados pelo PCV-2 e associar com os parâmetros produtivos, como peso vivo (PV) e peso da carcaça quente (PCQ).

3.1 Objetivos específicos

- Quantificar a carga viral no linfonodo inguinal e no soro dos animais;
- Mensurar o título de anticorpos neutralizantes;
- Avaliar o grau de lesão histopatológica nas amostras de linfonodos inguinais;
- Associar os achados laboratoriais com o peso vivo e peso da carcaça quente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de animais e obtenção de parâmetros produtivos

Sessenta e quatro suínos de abate, sendo 35 fêmeas e 29 machos clinicamente saudáveis, de mesma linhagem genética (Pic agroceres) e com diferença de idade variando entre duas semanas, foram separados e identificados por brincos numerados no dia anterior ao transporte para o abatedouro. Este procedimento aconteceu em uma granja comercial de ciclo completo, situada em Patrocínio-MG. O abate foi realizado no período noturno, nas dependências do frigorífico PIF-PAF, também localizado no mesmo município. A granja comercial, chamada Cinco Estrelas, é assistida por veterinários e possui controles sanitários bem elaborados, como limpeza e desinfecções de todos os galpões, na entrada e saída dos lotes (“todos dentro, todos fora”), nutrição balanceada em todas as fases de criação, controle de vacinação contra os principais agentes que afetam os suínos, exceto para o PCV-2, manejo rigoroso em todas as fases de crescimento e demais procedimentos comuns às granjas comerciais convencionais. Portanto, durante a escolha dos animais, procurou-se eliminar o maior número de variáveis que poderiam influenciar os resultados.

O peso vivo (PV) foi mensurado individualmente durante a identificação dos animais na granja. Outro parâmetro de produção, peso da carcaça quente (PCQ), foi obtido durante o abate dos animais no próprio frigorífico. Estes dados individuais foram armazenados para posterior associação com os dados laboratoriais.

4.2 Análises laboratoriais

4.2.1 Coleta de amostras

Durante a linha de abate foram feitas coletas individuais de sangue no momento da sangria e armazenados em tubos de 15 mL, sem EDTA, visando a separação do soro. Após a total coagulação do sangue, o soro foi estocado em microtubos de 1,5 mL e armazenado a -20 °C.

Também foram coletados linfonodos inguinais individualmente, sendo um fragmento armazenado em recipientes contendo formol 10%, destinado ao exame histopatológico, e outro armazenado a -20 °C, destinado ao teste de quantificação viral pela técnica de PCR em tempo real.

4.2.2 Extração de DNA e realização da PCR em tempo real

As amostras de DNA total foram obtidas a partir de 20 mg dos linfonodos inguinais utilizando o kit *Wizard Genomic DNA Purification from tissue kit*® (PROMEGA, Madison, USA) e seguindo as instruções do fabricante. A técnica é baseada na purificação do DNA tecidual, por meio de colunas carregadas positivamente, que retém o material genético durante o processo até a sua eluição final.

As amostras de DNA do soro foram extraídas a partir de 300 µL de soro total submetidos ao processo de precipitação em etanol, utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification kit*® (PROMEGA, Madison, USA) seguindo as instruções do fabricante.

As amostras de DNA dos linfonodos inguinais e do soro foram examinadas quanto à carga viral. Foi utilizado o método *Taq Man*®, com o uso do *kit TaqMan Universal PCR Master Mix*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O genoma completo do PCV-2

clonado no vetor *pGEM T Easy®-Promega* (Silva Júnior, 2005) foi utilizado como plasmídeo na construção da curva padrão para quantificação absoluta, sendo diluído para as concentrações finais de 10^{10} a 10^1 cópias de plasmídeo do PCV-2/ μL . O DNA do PCV-2 foi quantificado utilizando os oligonucleotídeos e sonda (Tabela 1) previamente descritos (Olvera et al., 2004). As reações foram realizadas em placas ópticas de 96 poços, incluindo amostras e padrões. Um controle negativo utilizando água deionizada autoclavada como molde foi adicionado a cada placa. Cada reação consistiu em um volume final de $25\mu\text{L}$, contendo 900nM de cada oligonucleotídeo, 150nM de sonda, $12,5\mu\text{L}$ *TaqMan Universal PCR Master Mix®* e 500ng do DNA total de cada amostra de linfonodo previamente mensurado em espectrometria de U.V (Thermo Scientific, evolution 60). No caso do soro, foram utilizados $5,0\mu\text{L}$ do DNA total extraído em cada reação. Foi utilizado o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA). Em cada curva de amplificação, o valor de Ct (*threshold cycle*) foi calculado, representando o número de ciclos da PCR em que a fluorescência do repórter foi detectável. A análise dos Cts foi realizada em triplicata e representaram a média do Ct de cada amostra. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , e 40 ciclos com 15 segundos a 95°C , 1 minuto a 60°C .

Tabela 1
Sequências dos oligonucleotídeos e da sonda utilizada.

Designação	Sequência (5'-3')	Localização (pb)
PCV-2F (<i>Forward</i>)	CCAGGAGGGCGTTGTGACT	1535 → 1553
PCV-2R (<i>Reverse</i>)	CGCTACCGTTGGAGAAGGAA	1633 → 1614
PCV-2S (<i>Probe</i>)	AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT	1612 → 1592

4.2.3 Teste de neutralização viral (TNV)

As amostras de soro foram submetidas ao teste de neutralização viral (Fort et al., 2007, com modificações) para quantificação de anticorpos neutralizantes (AN) presentes no soro de cada animal. Cinquenta microlitros dos soros testados foram submetidos à diluição seriada na base dois de 1:16 a 1:2048 em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 1% L-glutamina, 10,000U/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina e 3% de aminoácidos não-essenciais em placas de 96 poços. Foram adicionados 50µL de PCV-2 (Isolado do Laboratório de Virologia Animal – UFMG, MG, Brasil) em cada poço, previamente diluído em DMEM, na concentração final de 200 TCID₅₀/50µL. Depois de 1 h de incubação, 50µL de DMEM, 10% SFB contendo $1,6 \times 10^3$ células PK15 recém tripsinizadas foram adicionadas em cada poço da placa e incubadas por 72 h à 37°C em 5% de CO₂. As células foram lavadas duas vezes, utilizando 100µL de PBS (1X) em cada poço, e fixadas com 50µL de acetona: metanol por 10min à temperatura ambiente. As placas foram então incubadas por 1 h a 37°C com o soro policlonal contra PCV-2 (*VRMD, Inc.*, Pullmann, USA) diluído 1:600 em solução de fosfato tamponado (PBS 1X) e 1% de albumina de soro bovino. Depois da lavagem com PBS-Tween, a proteína G marcada com peroxidase (*Molecular Probes Eugene, Oregon, USA*) diluída 1:4000 em 0,1 M de tampão acetato e 0,05% de peróxido de hidrogênio foi adicionada e as placas foram novamente incubadas por 1 h a 37°C. Finalmente, as placas foram lavadas com PBS-Tween e 3-amino-9-dietil-carbazole (AEC) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) foi adicionado para a revelação da reação. Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Em cada placa uma amostra de soro com título conhecido de anticorpos foi incluída como controle positivo. O DMEM completo foi usado como controle negativo. A leitura foi feita em microscópio de luz invertida, sob o aumento de 100X, com a contagem de células positivas de três campos. A porcentagem de soroneutralização (%SN) para cada diluição foi

calculada pela seguinte fórmula: %SN = [1 - (número de células positivas na diluição do soro/média do número de células positivas nos poços do controle negativo)] x 100. O título de AN foi calculado como a recíproca da última diluição em que cada amostra de soro foi capaz de reduzir em 50% o número de células infectadas com o PCV-2 (TNV50).

4.2.4 Análise histopatológica

As amostras de linfonodos inguinais foram processadas segundo a técnica de inclusão em parafina. Para isso, as amostras fixadas em formol 10% foram desidratadas com concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Posteriormente, foram realizados três banhos em parafina e a inclusão das amostras nos blocos. Os blocos de parafina, contendo as amostras, foram seccionados a 4 µm, com o auxílio de um micrótomo digital. Para a coloração, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados com concentrações decrescentes de álcool, corados com hematoxilina e posteriormente com eosina. As lâminas foram montadas e as alterações histopatológicas foram visualizadas com o auxílio de microscópio óptico e holografadas em fotomicroscópio Olympus BX-50.

As lâminas foram examinadas quanto à depleção linfóide, proliferação de histiócitos, presença de células gigantes multinucleadas, perda da arquitetura tecidual, ausência de centros germinativos e então classificadas em sem lesões significativas (SLS), estágios I (leve), II (moderada) e III (severa) de acordo com a severidade das lesões, seguindo a descrição de Chianini et al. (2003).

4.3 Análise estatística

Para testar a normalidade dos dados utilizou-se o teste Kolmogorov–Smirnov. Em seguida foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis para verificação de diferenças significativas entre os resultados obtidos dos parâmetros laboratoriais (cargas virais nos linfonodos e nos soros) e parâmetros produtivos (peso vivo e peso da carcaça quente), considerando os diferentes estágios de lesões teciduais, títulos de anticorpos neutralizantes e o sexo. Correlação por pontos de Spearman foi realizada para verificar se houve relação significativa entre os dados laboratoriais e os parâmetros produtivos. Os testes foram realizados pelo programa Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) e foram conduzidos com nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PCV-2 é aceito como o principal agente causador da PMWS, mas o mecanismo pelo qual este vírus causa a doença clínica e o porquê somente alguns animais a manifestam, ainda não está bem entendido (Misinzo et al., 2008; Opriessnig et al., 2007; Timmusk et al., 2009). As análises deste trabalho foram realizadas utilizando amostras de suínos que não manifestaram a doença clínica durante a vida produtiva e, portanto, chegaram até o abate subclínicamente infectados pelo PCV-2. Lesões histopatológicas, títulos de anticorpos anti-PCV-2 e a quantificação do DNA viral confirmaram a infecção (Tabela 2).

Tabela 2
Análise descritiva dos parâmetros laboratoriais e produtivos de suínos de abate clinicamente sadios.

Parâmetros	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão
<i>Parâmetros laboratoriais</i>				
Carga viral (Linfonodo)*	64	4,96	0,69	0,62
Carga viral (Soro)**	64	2,16	0,68	0,08
Titulação de anticorpos	64	1593	656	82,02
<i>Parâmetros produtivos</i>				
Peso vivo (Kg)	64	116	11	1,4
Peso da carcaça quente (Kg)	64	81	10,2	1,3

*Cópias de PCV-2 (log10)/500ng de DNA total; **Cópias de PCV-2 (log10)/5µL DNA

De acordo com os resultados, a carga viral presente nos linfonodos inguinais e nos soros variou de $10^{3,82}$ a $10^{6,77}$ cópias de PCV-2/500ng de DNA total e de 0 a $10^{2,89}$ cópias de PCV-2/5µL de DNA, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os valores das cargas virais considerando o sexo (Tabela 3), mostrando possível semelhança da resposta imunológica ao PCV-2 entre machos e fêmeas.

Tabela 3

Valores de mediana (valores dos quartis 25-75) dos parâmetros laboratoriais e produtivos em relação ao sexo de animais de abate clinicamente sadios.

Parâmetros	Machos	Fêmeas	<i>H</i> *	<i>p</i>
<i>Parâmetros laboratoriais</i>				
Carga viral (Linfonodo)**	4,8 (4,4-5,5)	5,0 (4,5-5,3)	0,24	0,62
Carga viral (Soro)***	2,3 (2,1-2,5)	2,2 (2,1-2,5)	1,09	0,29
<i>Parâmetros produtivos</i>				
Peso vivo (Kg)	118 (103-124)	115 (109-123)	0,14	0,70
Peso da carcaça quente (Kg)	84 (69-89)	83 (76-88)	0,00	0,95

Teste Kruskal-Wallis*; *Cópias de PCV-2 (log10)/500ng de DNA total*; ****Cópias de PCV-2 (log10)/5µL DNA*

Segundo Quintana et al. (2001), as cargas virais encontradas nos tecidos de suínos clinicamente sadios são geralmente mais baixas, quando comparadas aos animais doentes, e as lesões teciduais nos linfonodos também se apresentam mais leves. Porém, neste trabalho, os valores da carga viral se mostraram variados, não havendo diferença significativa entre a carga viral nos tecidos analisados, considerando o estágio de lesão histopatológica no linfonodo. Os mesmos resultados foram encontrados por Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002), onde esses autores encontraram uma grande variação da carga viral em tecidos de suínos experimentalmente inoculados pelo PCV-2.

A interferência da carga viral no ganho de peso diário dos animais tem sido demonstrada em estudo, utilizando uma vacina comercial para o PCV-2 (Cline et al., 2008). Suínos vacinados aumentaram em até 9,3% o ganho de peso diário na fase final de crescimento, aumentando em até 8,8Kg de peso vivo, no momento de abate, em relação ao grupo controle (Horlen et al., 2008). Estes dados suportam a hipótese de que a carga viral, principalmente no soro, pode influenciar o desempenho produtivo dos suínos subclínicamente infectados. Apesar de ter sido detectada a presença do PCV-2 nos tecidos, não foi possível

encontrar nenhuma associação significativa com os parâmetros produtivos analisados neste trabalho (Tabela 4).

Tabela 4

Teste de correlação entre os parâmetros laboratoriais e produtivos de suínos de abate clinicamente sadios.

Par de Variáveis (x:y)	<i>n</i>	Spearman R***	t(N-2)****	<i>p</i>
Carga viral (Linfonodo) : PV*	64	0,01	0,10	0,92
Carga viral (Soro) : PV	64	- 0,07	- 0,55	0,58
Título de anticorpos neutralizantes : PV	64	- 0,18	- 1,50	0,14
Carga viral (Linfonodo) : PCQ **	64	- 0,01	0,10	0,90
Carga viral (Soro) : PCQ	64	- 0,02	- 0,15	0,88
Título de anticorpos neutralizantes : PCQ	64	- 0,24	- 1,98	0,05

* PV: Peso vivo; **Peso da carcaça quente; ***Teste de Spearman; ****Teste t com grau de liberdade N-2.

Os linfonodos inguinais foram avaliados quanto ao estágio de lesão tecidual. Trinta e quatro suínos (53,13%) não apresentaram nenhuma lesão significativa (Figura 1), sendo classificados em SLS - sem lesão significativa (Figura 2), 24 (37,5%) apresentaram centros germinativos conservados, leve depleção linfóide (Figura 3) e leve proliferação de histiócitos, sendo classificados como estágio I de lesão (Figura 4) e 6 (9,37%) apresentaram os centros germinativos alterados com moderada depleção folicular (Figura 5) e moderada proliferação de histiócitos, sendo classificado em estágio II de lesão (Figura 6). Estes resultados mostram que apesar da não manifestação clínica da doença, alguns animais estavam com os linfonodos inguinais lesionados em associação ao PCV-2.

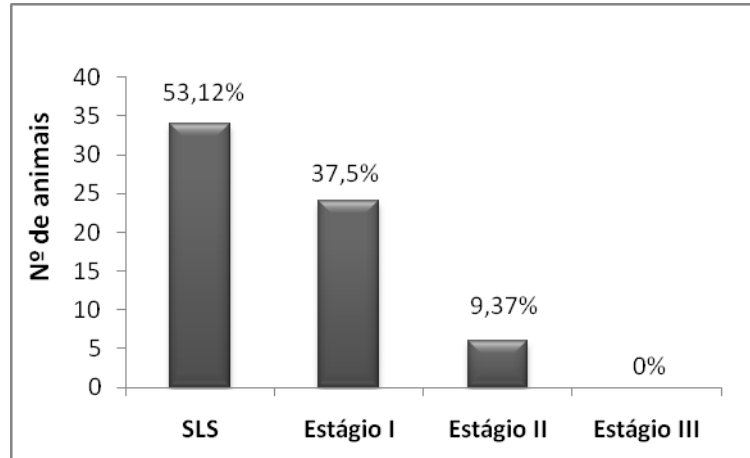


Figura 1. Frequência dos estágios de lesões encontrados nos linfonodos inguinais de suínos clinicamente saudáveis. (SLS - sem lesão significativa)

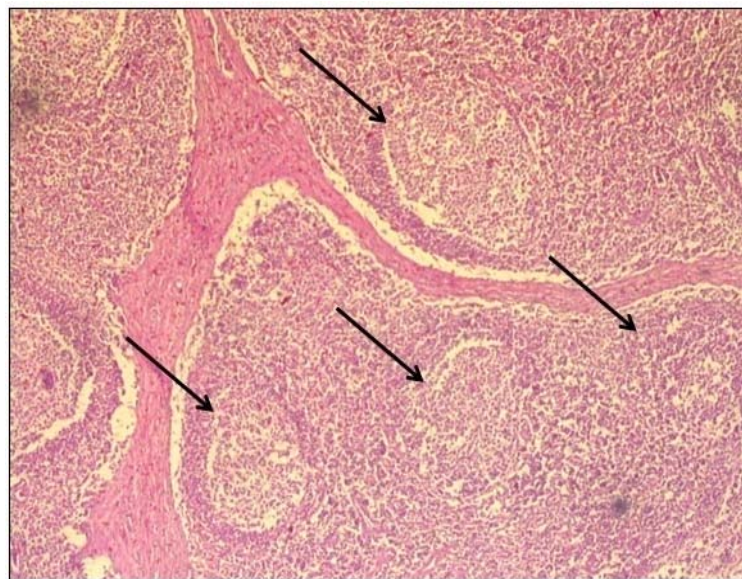


Figura 2. Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno sem lesões significativas (SLS) (aumento 100x); **Setas** mostram a presença de centros germinativos bem delimitados e íntegros.

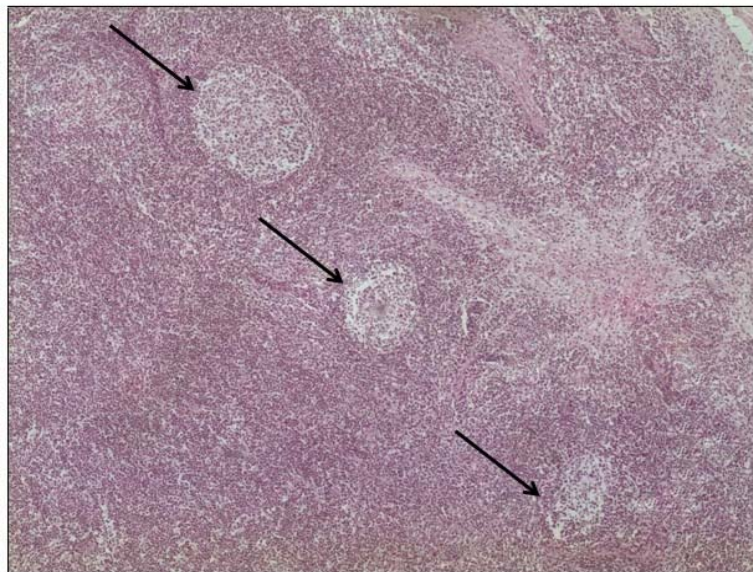


Figura 3. Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio I (aumento de 40x); **Setas** mostram centros germinativos conservados e leve diminuição da quantidade de linfócitos nos folículos.

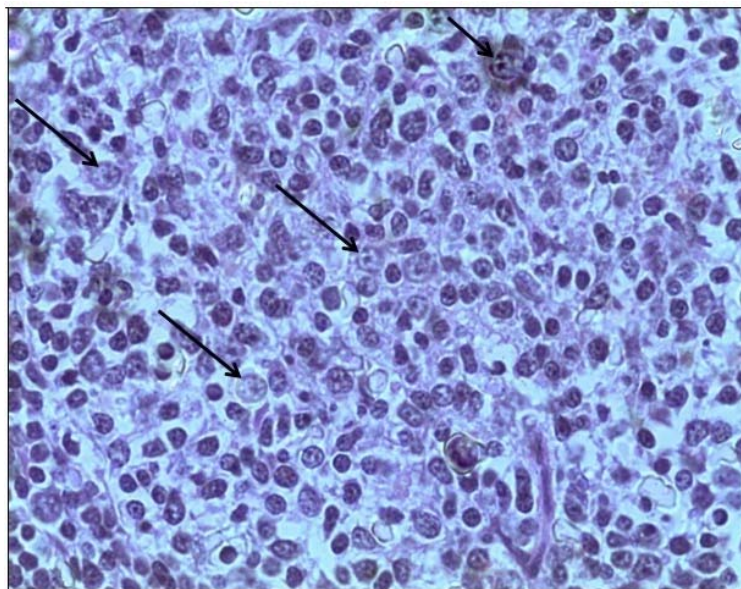


Figura 4. Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio 1 (aumento de 400x); **Setas** mostram leve infiltrado de células do sistema mononuclear fagocítico (macrófagos).

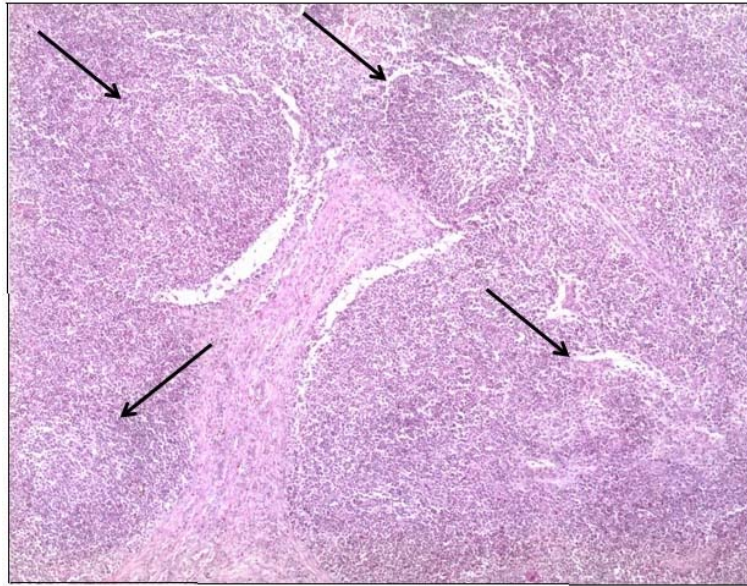


Figura 5. Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio II (aumento de 100x); **Setas** mostram centros germinativos alterados e sem arquitetura mantida.

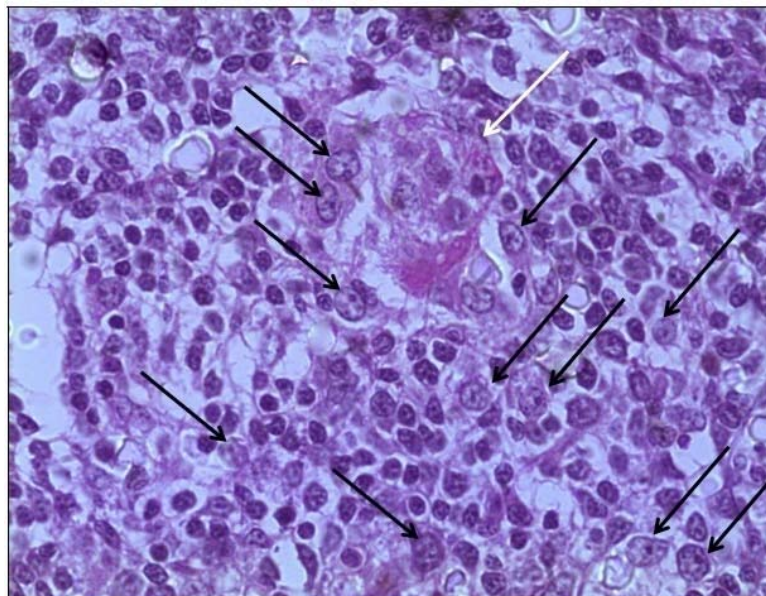


Figura 6. Fotomicrografia de linfonodo inguinal de suíno classificado como estágio II (aumento de 400x); **Setas pretas** mostram moderado infiltrado do sistema mononuclear fagocítico com presença de inúmeros macrófagos substituindo os linfócitos residentes. **Seta branca** mostra a formação de célula gigante indicando processo inflamatório mais avançado.

Resendes et al. (2004) mostraram que quanto mais severa a lesão, maior a carga viral no soro. Porém, não houve diferença significativa entre os valores da carga viral no linfonodo e no soro, considerando os diferentes estágios de lesão tecidual (Tabela 5). Apesar disso, foram encontradas depleções linfóides consideráveis entre os animais analisados, mostrando que o PCV-2 pode estar envolvido no aparecimento de lesões histopatológicas em órgãos linfóides de suínos subclínicamente infectados, indo de acordo com os achados de Krakowka et al. (2005), onde se detectou depleção linfóide em amostras de linfonodos de animais saudáveis, porém positivos para PCV-2.

Tabela 5
Valores de mediana (valores dos quartis 25-75) dos parâmetros laboratoriais e produtivos em relação aos estágios de lesão histopatológica dos linfonodos de animais de abate clinicamente saudáveis.

Parâmetros	Sem lesão significativa (SLS)	Estágio I	Estágio II	H*	p
<i>Parâmetros laboratoriais</i>					
Carga viral (Linfonodo)**	5,0 (4,8-5,7)	4,6 (4,2-5,2)	4,6 (4,5-4,8)	5,82	0,05
Carga viral (Soro)***	2,3 (2,1-2,5)	2,2 (2,1-2,5)	2,3 (2,2-2,4)	0,05	0,97
<i>Parâmetros produtivos</i>					
Peso vivo (Kg)	115 (108-124)	119 (105-125)	113 (112-114)	0,32	0,84
Peso da carcaça quente (Kg)	83 (76-89)	84 (69-88)	78 (77-79)	2,53	0,28

*Teste Kruskal-Wallis; **Cópias de PCV-2 (log10)/500ng de DNA total; ***Cópias de PCV-2 (log10)/5µL DNA.

Os animais adquiridos para a realização deste trabalho vieram de uma granja não afetada pela PMWS, ou seja, nenhum histórico da doença clínica foi observado até o momento da coleta. De acordo com Rodriguez-Arriola et al. (2000), as lesões histopatológicas típicas da PMWS podem também ser observadas em animais clinicamente normais, indicando que a infecção subclínica pelo PCV-2 ocorre frequentemente em granjas afetadas e não afetadas pela PMWS. Segundo Olvera et al. (2004), a dinâmica da infecção viral, relacionada

com o desenvolvimento da lesão e tempo de recuperação por conta do animal, ainda é desconhecida. Entretanto, a ausência da doença clínica não significa que o animal esteja fora do comprometimento produtivo (Grau et al., 2001; King et al., 2008).

A titulação de anticorpos neutralizantes (AN) mostrou-se variada entre os suínos analisados. Os títulos variaram de 64 a 2048, sendo este último representado por 65,62% dos animais (Figura 7). Foi encontrada diferença significativa entre os valores da carga viral nos linfonodos em relação aos títulos de AN ($p < 0,05$), sendo identificada entre os títulos 512 e 2048 (Tabela 6). Esses resultados mostram a relação entre a resposta imune humoral e a replicação viral no tecido linfóide de suínos subclínicamente infectados. De acordo com Opriessnig et al. (2007), indivíduos infectados pelo PCV-2 podem resistir à infecção por apresentarem um sistema imune bem desenvolvido e, portanto, baixos níveis de viremia, levando a uma soroconversão eficiente fazendo com que a doença permaneça na sua forma subclínica.

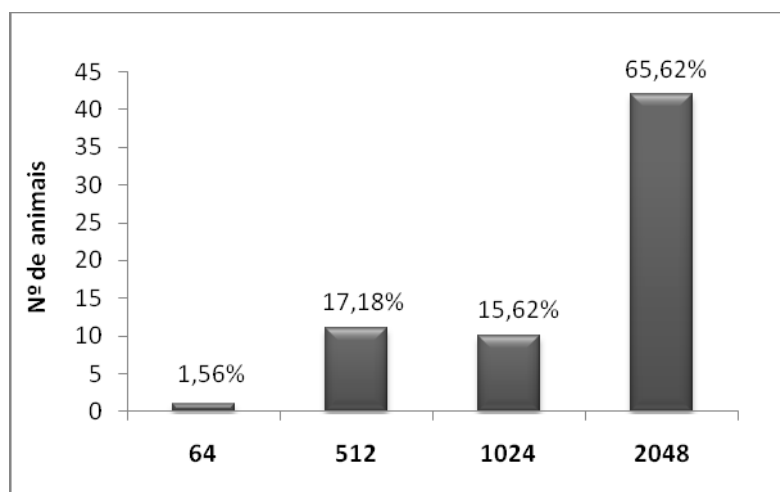


Figura 7. Frequência dos títulos de anticorpos neutralizantes encontrados em suínos clinicamente saudáveis.

Tabela 6

Valores de mediana (valores dos quartis 25-75) dos parâmetros laboratoriais e produtivos em relação aos títulos de anticorpos neutralizantes de animais de abate clinicamente sadios.

Parâmetros	64	512	1024	2048	H*	p
<i>Parâmetros laboratoriais</i>						
Carga viral (Linfonodo)**	3,9 (3,9-3,9) ^{a,b}	4,5 (4,2-4,9) ^a	4,8 (4,5-5,5) ^{a,b}	5,0 (4,7-5,7) ^b	9,29	0,02
Carga viral (Soro)***	0,0	2,3 (2,1-2,6)	2,3 (2,0-2,4)	2,2 (2,1-2,5)	2,82	0,42
<i>Parâmetros produtivos</i>						
Peso vivo	125 (125-125)	116 (109-126)	1121 (114-127)	115 (105-123)	3,29	0,34
Peso da carcaça quente	89 (89-89)	84 (78-90)	87 (79-92)	80 (69-85)	5,65	0,12

**Teste Kruskal-Wallis*. Medianas seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes pelo Teste U Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Cópias de PCV-2 (log10)/500ng de DNA total*; *Cópias de PCV-2 (log10)/5µL DNA*.

O aparecimento dos AN contra o PCV-2 acontece entre 14 e 21 dias pós-infecção e coincide com a diminuição da taxa de transmissão do vírus entre os animais (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007; Andraud et al., 2009) e consequente queda da carga viral (Pensaert et al., 2004). Suínos afetados pela PMWS apresentam uma menor resposta de AN quando comparados aos subclínicamente infectados (Meerts et al., 2006; Fort et al., 2007). Os títulos de AN dos animais avaliados neste trabalho possivelmente podem ser considerados suficientes por ter impedido a manifestação clínica da doença e, provavelmente, no momento do contato com o PCV-2, o sistema imune destes animais se mostrou bastante eficiente.

Os títulos de AN não apresentaram correlação significativa com os parâmetros produtivos (Tabela 4). Porém, estudos realizados com outros animais mostraram que o sistema imune exige grandes quantidades de energia sempre que é estimulado, implicando em maior mobilização de energia metabólica para o sistema imune e consequente diminuição no desenvolvimento produtivo do animal (Heugten et al., 1996).

Não houve diferença significativa entre os valores de peso vivo e peso da carcaça quente em relação ao estágio da lesão histopatológica dos linfonodos inguinais (Tabela 5). O mesmo aconteceu em relação ao título de AN (Tabela 6). Também não foi possível

demonstrar nenhuma associação entre os parâmetros produtivos e as cargas virais nos tecidos (Tabela 4).

Neste trabalho, amostras teciduais de animais subclínicamente infectados pelo PCV-2 foram examinadas e associadas aos parâmetros produtivos apresentados no abate. A possível influência de outros fatores como idade, idade ao desmame e presença de outros patógenos durante a vida destes animais não podem ser excluídos. Entretanto, foi demonstrada a ocorrência da doença subclínica associada ao PCV-2 no rebanho analisado. Desta forma, permanecem ainda como objeto de pesquisa maiores estudos sobre a implicação desta nova apresentação da doença nos rebanhos de suínos tecnificados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D., McNulty, M.S., 1994. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. *Zentralbl Veterinarmed B* 41: 17-26.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A., Adair, B., Ellis, W.A., McNulty, M.S., 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet Microbiol* 44: 49-64.
- Allan, G., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E.G., Harding, J., Espuna, E., Botner, A., Charreyre, C., 1998. Novel Porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142: 467-468.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with Porcine circovirus and porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 121: 1-11.
- Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12: 3-14.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S., 2000. Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145: 2421-2429.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Meehan, B., Kennedy, S., Johnston, D., Ellis, J., Krakowka, S., Fossum, C., Wattrang, E., Wallgren, P., 2002. Reproduction of PMWS with a 1993 Swedish isolate of PCV-2. *Vet Rec* 150: 255-256.
- Allan, G., McNeilly, F., Meehan, B., McNair, I., Ellis, J., Krakowka, S., Fossum, C., Wattrang, E., Wallgren, P., Adair, B., 2003. Reproduction of postweaning

- multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate. *J Vet Diagn Invest.* 15: 553-560.
- An, D.J., Roh, I.S., Song, D.S., Park, C.K., Park, B.K., 2007. Phylogenetic characterization of Porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res* 129: 115-122.
- Andraud, M., Grasland, B., Durand, B., Cariolet, R., Jestin, A., Madec, F., Pierre, J.S., Rose, N., 2009. Modelling the time-dependent transmission rate for Porcine circovirus type 2 (PCV-2) in pigs using data from serial transmission experiments. *J R Soc Interface* 6: 39-50.
- Balasz, M., Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A., Plana-Duran, J., 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121: 139-148.
- Balint, A., Tenk, M., Deim, Z., Rasmussen, T.B., Uttenthal, A., Csagola, A., Tuboly, T., Farsang, A., Fossum, C., Timmusk, S., Berg, M., Belak, S., 2009. Development of Primer-Probe Energy Transfer real-time PCR for the detection and quantification of Porcine circovirus type 2. *Acta Vet Hung* 57: 441-452.
- Banks, M., Grierson, S., Tucker, D., Bailey, M., Donadeau, M., Sargent, C., King, D., Mellencamp, M., 2006. Swine and circovirus. *Dev Biol (Basel)* 126: 107-113.
- Barbosa, C. N., Lobato, Z. I. P., Martins, N. R. S., Nascimento, E. F.. 2008. Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60: 815-820.
- Bogdan, J., West, K., Clark, E., Konoby, C., Haines, D., Allan, G., McNeilly, F., Meehan, B., Krakowka, S., Ellis, J.A., 2001. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can Vet J* 42: 548-550.

- Bolin, S.R., Stoffregen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L., 2001. Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrum-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J Vet Diagn Invest* 13: 185-194.
- Carman, S., Cai, H.Y., DeLay, J., Youssef, S.A., McEwen, B.J., Gagnon, C.A., Tremblay, D., Hazlett, M., Lulis, P., Fairles, J., Alexander, H.S., van Dreumel, T., 2008. The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006. *Can J Vet Res* 72: 259-268.
- Castro, A.M.M.G., Cortez, A., Soares, R.M., Ruiz, V.L.A., Leomil, H., Richtzenhain, L.J., 2003. Partial sequencing of open reading frame-1 (ORF-1) of brazilian porcine circovirus type 1 (PCV-1). *Virus Reviews & Research* 13: 80-81.
- Castro, A.M., Cortez, A., Ruiz, V.L., Leomil, H., Moreno, A.M., Doto, D.S., Richtzenhain, L.J., 2004. Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. *Vet Rec* 154: 728-729.
- Chae, C., 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet J* 168: 41-49.
- Chae, C., 2005. A review of Porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J* 169: 326-336.
- Cheung, A.K., Lager, K.M., Kohutyuk, O.I., Vincent, A.L., Henry, S.C., Baker, R.B., Rowland, R.R., Dunham, A.G., 2007. Detection of two Porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 152: 1035-1044.
- Chianini, F., Majo, N., Segales, J., Dominguez, J., Domingo, M., 2003. Immunohistochemical characterisation of PCV-2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of

- pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 94: 63-75.
- Chiarelli-Neto, O., Yotoko, K.S., Vidigal, P.M., Silva, F.M., Castro, L.A., Fietto, J.L., Silva, A., Jr., Almeida, M.R., 2009. Classification and putative origins of Brazilian Porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Res* 140: 57-63.
- Choi, C., Chae, C., Clark, E.G., 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 12: 151-153.
- Choi, C., Chae, C., 2001. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol* 38: 436-441.
- Ciacchi-Zanella J. R. & Morés N., 2000. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. Memória Congresso Mercosur de Producción Porcina, Buenos Aires, EIP16.
- Ciacchi-Zanella, J. R., Morés, N., Simon, N. L., Oliveira, S. R., Gava, D., 2006, Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 36: 1480-1485.
- Ciacchi-Zanella, J.R., Simon, N.L., Pinto, L.S., Viancelli, A., Fernandes, L.T., Hayashi, M., Dellagostin, O.A., Esteves, P.A., 2009. Detection of Porcine circovirus type 2 (PCV-2) variants PCV-2-1 and PCV-2-2 in Brazilian pig population. *Res Vet Sci* 87: 157-160.
- Clark, E., G., 1997. Post-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners* 28: 499-501.

- Cline, G., Wilt, V., Diaz, E., Edler, R., 2008. Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Vet Rec* 163: 737-740.
- Csagola, A., Kecskemeti, S., Kardos, G., Kiss, I., Tuboly, T., 2006. Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Arch Virol* 151: 495-507.
- D'Allaire, S., Moore, C., Cote, G., 2007. A survey on finishing pig mortality associated with porcine circovirus diseases in Quebec. *Can Vet J* 48: 145-146.
- Darwich, L., Pie, S., Rovira, A., Segales, J., Domingo, M., Oswald, I.P., Mateu, E., 2003. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* 84: 2117-2125.
- Darwich, L., Segales, J., Mateu, E., 2004. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 149: 857-874.
- Darwich, L., Segales, J., Resendes, A., Balasch, M., Plana-Duran, J., Mateu, E., 2008. Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with Porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Res Vet Sci* 84: 194-198.
- Deen, J., Larriestra, A., 2004. Lost income in Grow/Finish: The problem of lightweight, cull and dead pigs. *Manitoba Swine Seminar*.
- Dulac, G.C., Afshar, A., 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* 53: 431-433.
- Edwards, S., Sands, J.J., 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* 134: 680-681.
- 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.
- Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S., McNeilly, F., 1999. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J Vet Diagn Invest* 11: 3-14.
- Ellis, J.A., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D.M., Harding, J., West, K.H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K., McNeilly, F., 2000. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12: 21-27.
- Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G.M., 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet Microbiol* 98: 159-163.
- Fachinger, V., Bischoff, R., Jedidia, S.B., Saalmuller, A., Elbers, K., 2008. The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine* 26; 1488-1499.
- Fenaux, M., Halbur, P.G., Gill, M., Toth, T.E., Meng, X.J., 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38: 2494-2503.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Meng, X.J., 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV1 in weanling pigs. *J Virol* 77, 11232-11243.

- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004. A chimeric Porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV-2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV-1 induces protective immunity against PCV-2 infection in pigs. *J Virol* 78: 6297-6303.
- Fernandes, L.T., Tomas, A., Bensaid, A., Perez-Enciso, M., Sibila, M., Sanchez, A., Segales, J., 2009. Exploratory study on the transcriptional profile of pigs subclinically infected with Porcine circovirus type 2. *Anim Biotechnol* 20: 96-109.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: Porcine circovirus 2. *J Virol* 83: 12813-12821.
- Fort, M., Olvera, A., Sibila, M., Segales, J., Mateu, E., 2007. Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol* 125: 244-255.
- Franza, B.R., Rauscher, F.J., Josephs, S.F., Curran, T., 1988. The Fos complex and Fos related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239: 1150-1153.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V., 2009. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med* 23: 1151-1163.
- Gilpin, D.F., McCullough, K., Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Stevenson, L.S., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S., Adair, B.M., Allan, G.M., 2003. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 94: 149-161.
- Girard, C., Morin, M., Elazhary, Y., 1992. Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet. Rec* 130: 206-207.

- Grasland, B., Loizel, C., Blanchard, P., Oger, A., Nignol, A.C., Bigarre, L., Morvan, H., Cariolet, R., Jestin, A., 2005. Reproduction of PMWS in immunostimulated SPF piglets transfected with infectious cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus. *Vet Res* 36: 685-697.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias, M., Cortey, M., Fraile, L., Olvera, A., Segales, J., 2008. A proposal on Porcine circovirus type 2 (PCV-2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet Microbiol* 128: 23-35.
- Grau-Roma, L., Hjulsager, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., Lopez-Soria, S., Enoe, C., Casal, J., Botner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segales, J., Larsen, L.E., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol* 135: 272-282.
- Grau, A.F., Dewey, C.E., Friendship, B., 2001. Effect of pig management on weight in grower finisher pigs. *American Association of Swine Veterinarians*. 521-526.
- Grierson, S.S., King, D.P., Sandvik, T., Hicks, D., Spencer, Y., Drew, T.W., Banks, M., 2004. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol* 149: 1171-1183.
- Guedes, R., M., C., 2005. Diarréia em suínos de recria e terminação - Agentes infecciosos e o processo diagnóstico. 1º Seminário Novartis Latino Americano Sobre Ileíte e Colite Suína. *Anais. Foz do Iguaçu, PR*. 55-55.
- Ha, Y., Ahn, K.K., Kim, B., Cho, K.D., Lee, B.H., Oh, Y.S., Kim, S.H., Chae, C., 2009. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Res Vet Sci* 86: 108-110.

- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72: 5262-5267.
- Hansen, M.S., Pors, S.E., Bille-Hansen, V., Kjerulff, S.K., Nielsen, O.L., 2009. Occurrence and Tissue Distribution of Porcine Circovirus Type 2 Identified by Immunohistochemistry in Danish Finishing Pigs at Slaughter. *J Comp Pathol.* 1-13.
- Harding, J.C., 1997a. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 27th Annu. Meet.*, 503.
- Harding, J.C., Clark, E.G., Strokappe, J.H., Willson, P.I., Ellis, J.A., 1998. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.* 6: 249-254.
- Harding, J.C., 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 98: 131-135.
- Harding, J.C., Baker, C.D., Tumber, A., McIntosh, K.A., Parker, S.E., Middleton, D.M., Hill, J.E., Ellis, J.A., Krakowka, S., 2008. Porcine circovirus 2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest* 20: 274-282.
- Hasslung, F., Wallgren, P., Ladekjaer-Hansen, A.S., Botner, A., Nielsen, J., Wattring, E., Allan, G.M., McNeilly, F., Ellis, J., Timmusk, S., Belak, K., Segall, T., Melin, L., Berg, M., Fossum, C., 2005. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* 106: 49-60.
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* 132: 201-207.

- Heugten, E., Coffey, M. T., Spears, J. W., 1996. Effects of immune challenge, dietary energy density, and source of energy on performance and immunity in weanling pigs. *Journal of Animal Science* 74: 2431-2440.
- Horlen, K.P., Dritz, S.S., Nietfeld, J.C., Henry, S.C., Hesse, R.A., Oberst, R., Hays, M., Anderson, J., Rowland, R.R., 2008. A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc* 232: 906-912.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S., 2001. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol* 38: 528-539.
- Jensen, T.K., Vigre, H., Svensmark, B., Bille-Hansen, V., 2006. Distinction between Porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *J Comp Pathol* 135: 176-182.
- Johnson, R.W., 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *J Anim Sci* 75: 1244-1255.
- Johnson R.W., Escobar J. & Webel D.M. 2001. Nutrition and Immunology of Swine. In: Lewis A.J. & Southern L.L. (Eds) *Swine Nutrition*. 2.ed. Nebraska: CRC Press. 545-562.
- Josephson, G., Charbonneau, G., 2001. Case report of reproductive problems in a new startup operation. *Journal of Swine Health and Production* 9: 258-259.
- Karuppanan, A.K., Jong, M.H., Lee, S.H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., Kwang, J., 2009. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology* 383: 338-347.

- Kawashima, K., Katsuda, K., Tsunemitsu, H., 2007. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J Vet Diagn Invest* 19: 60-68.
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan, G.M., 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with Porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Comp Pathol* 122: 9-24.
- Kennedy, S., Segales, J., Rovira, A., Scholes, S., Domingo, M., Moffett, D., Meehan, B., O'Neill, R., McNeilly, F., Allan, G., 2003. Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 15: 151-156.
- Kenneth, C., McCullough., Ruggli, N., Summerfield, A. 2009. Dendritic cells—At the front-line of pathogen attack. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 7–15.
- Kim, J., Chung, H.K., Chae, C., 2003. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 166: 251-256.
- Kim, J., Jung, K., Chae, C., 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet Rec* 155: 489-492.
- Kim, J., Chae, C., 2005. Necrotising lymphadenitis associated with Porcine circovirus type 2 in pigs. *Vet Rec* 156: 177-178.
- King, D., DuBois, P., Painter, T., Holck., T., Edler, R., Johnson, C., Diaz, E., 2008. Biologic and economic benefits of controlling subclinical PCVAD with vaccination. *American Association Of Swine Veterinarians*. 159-161.
- Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with Porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37: 254-263.

- Krakovka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with Porcine circovirus 2 (PCV-2). *Vet Pathol* 38: 31-42.
- Krakovka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Waldner, C., Allan, G., 2005, Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J Vet Diagn Invest* 17: 213-222.
- Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Storgaard, T., Botner, A., Allan, G., McNeilly, F., 2001. Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet Rec* 148: 759-760.
- Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Stadejek, T., Storgaard, T., Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Allan, G., Botner, A., 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with Porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Vet Microbiol* 89: 97-114.
- Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., Magar, R., 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80: 69-75.
- Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., 2002. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. *Virus Res* 90: 101-112.
- Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S., 2003, Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 67: 114-120.
- LeCann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Jestin, A., 1997. Piglet wasting disease. *Vet Rec* 141: 660.

- Liu, Q., Wang, L., Willson, P., Babiuk, L.A., 2000. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 38: 3474-3477.
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J., 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 79: 8262-8274.
- Liu, J., Chen, I., Du, Q., Chua, H., Kwang, J., 2006. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol* 80: 5065-5073.
- Liu, J., Zhu, Y., Chen, I., Lau, J., He, F., Lau, A., Wang, Z., Karuppanan, A.K., Kwang, J., 2007. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 interacts with porcine ubiquitin E3 ligase Pirh2 and facilitates p53 expression in viral infection. *J Virol* 81: 9560-9567.
- Lopez-Soria, S., Grau-Roma, L., Segales, J., 2008. Epidemiologia de la circovirosis porcina. *Suis*, 49: 14-23.
- Machado, G.S.; Fontes, D.O., 2005. Interações entre sanidade, ativação imunológica, produção e nutrição de suínos: uma nova abordagem. I Seminário Novartis latino-Americano sobre Ileíte e Colite Suína. *Anais. Foz do Iguaçu, PR.* 27-40.
- Madson, D.M., Patterson, A.R., Ramamoorthy, S., Pal, N., Meng, X.J., Opriessnig, T., 2009. Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with Porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 46: 707-716.
- Mateusen, B., Maes, D.G., Van Soom, A., Lefebvre, D., Nauwynck, H.J., 2007, Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology* 68: 896-901.
- McIntosh, K.A., Harding, J.C., Parker, S., Ellis, J.A., Appleyard, G.D., 2006. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in

- semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. *J Vet Diagn Invest* 18: 380-384.
- McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B.M., Foster, J.C., Clarke, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Adair, B.M., Allan, G.M., 1999. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new Porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods* 80: 123-128.
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., Todd, D., 1997. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 78 (Pt 1): 221-227.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V.A., Ellis, J.A., Hassard, L.E., Clark, E.G., Haines, D.M., Allan, G.M., 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 79 (Pt 9): 2171-2179.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., McNair, I., Walker, I., Ellis, J.A., Krakowka, S., Allan, G.M., 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Arch Virol* 146: 835-842.
- Meerts, P., Misinzo, G., Lefebvre, D., Nielsen, J., Botner, A., Kristensen, C.S., Nauwynck, H.J., 2006. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against Porcine circovirus 2 (PCV-2) and protection against replication of the virus and development of PCV-2-associated disease. *BMC Vet Res* 2: 6.
- Meerts, P., Van Gucht, S., Cox, E., Vandebosch, A., Nauwynck, H.J., 2005. Correlation between type of adaptive immune response against Porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol* 18: 333-341.

- Misinzo, G., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J., 2008. Inhibition of endosome-lysosome system acidification enhances Porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells. *J Virol* 82: 1128-1135.
- Mores, N., 2005. Impacto econômico da circovirose na produção de suínos. In: V Seminário Internacional de Aves e Suínos - Avesui, Florianópolis, SC. 9-13.
- Mori, M., Sato, K., Akachi, S., Asahi, S., Taniguchi, S., Narita, M., 2000. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. *Vet Pathol* 37: 667-669.
- Morin, M., Girard, C., Elazhary, Y., Fajardo, R., Drolet, R., Lagacé, A., 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *Can. Vet. J* 31: 837-839.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S., 1998. Detection of a novel strain of Porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36: 2535-2541.
- Nawagitgul, P., Morozov, I., Bolin, S.R., Harms, P.A., Sorden, S.D., Paul, P.S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81: 2281-2287.
- Nielsen, J., Vincent, I.E., Botner, A., Ladekaer-Mikkelsen, A.S., Allan, G., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 92: 97-111.
- O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G., Ellis, J.A., 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 42: 551-553.

- Okuda, Y., Ono, M., Yazawa, S., Shibata, I., 2003. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J Vet Diagn Invest* 15: 107-114.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of Porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357: 175-185.
- Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 2004. Comparison of Porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *J Virol Methods* 117: 75-80.
- Opriessnig, T., Janke, B.H., Halbur, P.G., 2006a. Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with Porcine circovirus type 2. *J Comp Pathol* 134: 105-110.
- Opriessnig, T., McKeown, N.E., Zhou, E.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2006b. Genetic and experimental comparison of Porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from cases with and without PCV-2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *J Gen Virol* 87: 2923-2932.
- Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Elsener, J., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2008. Influence of maternal antibodies on efficacy of Porcine circovirus type 2 (PCV-2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV-2. *Clin Vaccine Immunol* 15: 397-401.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Madson, D.M., Pal, N., Rothschild, M., Kuhar, D., Lunney, J.K., Juhan, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2009. Difference in severity of Porcine

- circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J Anim Sci* 87: 1582-1590.
- Opriessnig, T., Thacker, E.L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and Porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41: 624-640.
- Pallares, F.J., Halbur, P.G., Opriessnig, T., Sorden, S.D., Villar, D., Janke, B.H., Yaeger, M.J., Larson, D.J., Schwartz, K.J., Yoon, K.J., Hoffman, L.J., 2002. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 14: 515-519.
- Pescador C., Rozza D.B., Zlotowski P., Borowski S.M., Barcellos D.E.S.N. & Driemeier D., 2003. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos do Rio Grande do Sul. *Anais XI Congr. Bras. Vet. Esp. em Suínos (Abraves), Goiânia.* 105-106.
- Pesch, S., Schmidt, U., Ohlinger, V.F., 2000. Proliferative necrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society.* 581.
- Pujols, J., Lopez-Soria, S., Segales, J., Fort, M., Sibila, M., Rosell, R., Solanes, D., Russell, L., Campbell, J., Crenshaw, J., Weaver, E., Polo, J., 2008. Lack of transmission of porcine circovirus type 2 to weanling pigs by feeding them spray-dried porcine plasma. *Vet Rec* 163: 536-538.
- Quintana, J., Segales, J., Rosell, C., Calsamiglia, M., Rodriguez-Arrioja, 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.
- Ramamoorthy, S., Meng, X.J., 2009. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev* 10: 1-20.
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., Segales, J., Balasch, M., Rosell, C., Quintant, J., Folch, J.M., Plana-Duran, J., Mankertz, A., Domingo, M., 2000. Serum antibodies to Porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 146: 762-764.
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., Segales, J., Calsamiglia, M., Resendes, A.R., Balasch, M., Plana-Duran, J., Casal, J., Domingo, M., 2002. Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* 63: 354-357.
- Rodriguez-Arrijoja, G.M., Segales, J., Rosell, C., Rovira, A., Pujols, J., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2003. Retrospective study on Porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50: 99-101.
- Rose, N., Eveno, E., Grasland, B., Nignol, A.C., Oger, A., Jestin, A., Madec, F., 2009. Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: a hierarchical Bayesian survival analysis. *Prev Vet Med* 90: 168-179.
- Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-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.
- Rosell, C., Segales, J., Ramos-Vara, J.A., Folch, J.M., Rodriguez-Arrijoja, G.M., Duran, C.O., Balasch, M., Plana-Duran, J., Domingo, M., 2000. Identification of porcine circovirus

- in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 40-43.
- Rovira, A., Balasch, M., Segales, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Porcine circovirus 2. *J Virol* 76: 3232-3239.
- Sarli, G., Mandrioli, L., Laurenti, M., Sidoli, L., Cerati, C., Rolla, G., Marcato, P.S., 2001. Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 83: 53-67.
- Sharma, R., Saikumar, G., 2010, Porcine parvovirus- and porcine circovirus 2-associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs. *Trop Anim Health Prod* 42: 515-522.
- Segales, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Del Pozo, M., Noval, R., Sacristan, C., De las Heras, A., Ferro, A., Latimer, K.S., 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec* 141: 600-601.
- Segales, J., Alonso, F., Rosell, C., Pastor, J., Chianini, F., Campos, E., Lopez-Fuertes, L., Quintana, J., Rodriguez-Arriola, G., Calsamiglia, M., Pujols, J., Dominguez, J., Domingo, M., 2001. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 81: 37-44.
- Segales, J., Domingo, M., 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet Q* 24: 109-124.
- Segales, J., Domingo, M., Chianini, F., Majo, N., Dominguez, J., Darwich, L., Mateu, E., 2004a. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol* 98: 151-158.

- Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., 2004b. Pathological findings associated with naturally acquired Porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98: 137-149.
- Segales, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 6: 119-142.
- Silva-Júnior, A., Braga, D. A. M., Silva, F. M. F., Myrra, L. V., Fietto, J. L. R., Vargas, M. I., Nero, L. A., Almeida, M. R., 2009. Detection of *Porcine circovirus* 2 DNA by real time polymerase chain reaction in 1978 brazilians archived porcine tissues. XX National meeting of virology 14: 108.
- Sipos, W., Duvigneau, J.C., Willheim, M., Schilcher, F., Hartl, R.T., Hofbauer, G., Exel, B., Pietschmann, P., Schmoll, F., 2004. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol* 99: 63-71.
- Sirinarumitr, T., Morozov, I., Nawagitgul, P., Sorden, S.D., Harms, P.A., Paul, P.S., 2000. 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 pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12: 562-565.
- Smith, W.J., Thomson, J.R., Done, S., 1993. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record* 132: 47.
- Sobestiansky, J.; Barbarino Jr., P.; Seyboth, L.; Matos, M., 2002. Circovirose suína e circovírus suíno. *Sanidade em Foco, Goiânia*, 52.
- Staebler, S., Sydler, T., Buergi, E., McCullough, K., McNeilly, F., Allan, G., Pospischil, A., 2005. PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. *Vet J* 170: 132-134.

- Steiner, E., Balmelli, C., Gerber, H., Summerfield, A., McCullough, K., 2009. Cellular adaptive immune response against Porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res* 5: 45.
- Street, B.R., Gonyou, H. W., 2007. Effects of housing finishing pigs in two group sizes and at two floor space allocations on production, health, behavior, and physiological variables. *J Anim Sci.* 86: 982-991.
- Thibault, S., Drolet, R., Germain, M.C., D-Allaire, S., Larochelle, R., Magar, R., 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology* 35: 108-116.
- Timmusk, S., Merlot, E., Lovgren, T., Jarvekulg, L., Berg, M., Fossum, C., 2009. Regulator of G protein signalling 16 is a target for a Porcine circovirus type 2 protein. *J Gen Virol* 90: 2425-2436.
- Tischer, I., Rasch, R., Tochtermann, G., 1974. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 226: 153-167.
- Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295: 64-66.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W., 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 91: 271-276.
- Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S., Germann, B., 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch Virol* 140: 737-743.
- Todd, D., 2000. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol* 29: 373-394.

- Tomas, A., Fernandes, L.T., Sanchez, A., Segales, J., 2010. Time course differential gene expression in response to Porcine circovirus type 2 subclinical infection. *Vet Res* 41: 12.
- Tomas, A., Fernandes, L.T., Valero, O., Segales, J., 2008. A meta-analysis on experimental infections with Porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Vet Microbiol* 132: 260-273.
- Turner, M.J., Medley, G.F., Woodbine, K.A., Slevin, J.A., Green, L.E., 2009. The relationship between Porcine circovirus 2 antigen score and antibody titre and histology of lymph nodes in 375 euthanased sick and healthy pigs from 113 British pig farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Prev Vet Med* 88: 213-219.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Herrmann, B., Meehan, B.M., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2003. Dendritic cells harbor infectious porcine circovirus type 2 in the absence of apparent cell modulation or replication of the virus. *J Virol* 77: 13288-13300.
- Vincent, I.E., Carrasco, C.P., Guzylack-Piriou, L., Herrmann, B., McNeilly, F., Allan, G.M., Summerfield, A., McCullough, K.C., 2005. Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology* 115: 388-398.
- West, K.H., Bystrom, J.M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G.M., Haines, D.M., Clark, E.G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J.A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11: 530-532.
- Yan, X. M., Ren, J., Huang, X., Zhang, Z. Y., Ouyang, J., Zeng, W. H., Zou, Z. Z., Yang, S. J., Yang, B., Huang, L.-S., 2009. Comparison of production traits between pigs with and without the *Escherichia coli* F4 receptors in a White Duroc x Erhualian intercross F2 population. *J Anim Sci.* 87: 334-339.

Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E., 2007. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 261-272.