

**ALBANNO LEONARD BRAZ CAMPOS PINHEIRO**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE ROEDORES PERIDOMÉSTICOS COMO  
RESERVATÓRIO DO *Porcine circovirus 2* (PCV2)**

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  
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P654i  
2011

Pinheiro, Albanno Leonard Braz Campos, 1975-  
Investigação do potencial de roedores peridomésticos  
como reservatório do *porcine circovirus 2* (PCV2) / Albanno  
Leonard Braz Campos Pinheiro. – Viçosa, MG, 2011.  
xiii, 38f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Aberlardo Silva Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-38.

1. Suíno - Doenças. 2. Rato como transmissor de doenças.  
3. Circovírus suíno. 4. Epidemiologia. 5. *Porcine circovirus 2*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.40896964

**ALBANNO LEONARD BRAZ CAMPOS PINHEIRO**

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE ROEDORES PERIDOMÉSTICOS COMO  
RESERVATÓRIO DO *Porcine circovirus 2* (PCV2)**

**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: 22 de novembro de 2011

---

Profa. Márcia Rogéria de A. Lamêgo  
(Co-orientadora)  
(UFV)

---

Prof. Sérgio Oliveira de Paula  
(UFV)

---

Prof. Abelardo Silva Júnior  
(Orientador)  
(UFV)

---

Profa. Maria Aparecida S. Moreira  
(UFV)

*“O que seriam das minhas vitórias sem a excelente educação que ganhei no meu berço? Obrigado Antônio Flávio e Suelena Teixeira.”*

*“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais, e, neste dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a humanidade.”*

*(Leonardo da Vinci)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de aprendizado nessa vida, mesmo que muitas vezes esqueço-me de parar e avaliar todos seus ensinamentos.

Meus “paisdrinhos” Antônio Flávio Teixeira e Suelena Braz de Barros Teixeira por me ensinarem que a vida tem suas voltas e ciclos e que cada uma nos surpreende, porém com preparo, respeito, bondade e perdão nos tornam aptos a vencer! Meus irmãos Leandro e Flávia Teixeira por entenderem que famílias são formadas pelos mais complexos motivos, mas que o amor faz a sua parte.

Minha namorada Carla Rodrigues, por me ajudar em todos os passos que dei desde sua chegada à minha vida, trazendo paz, carinho, sorte e alegria! Desejando sucesso após o término de seu doutorado.

Meus amigos/irmãos/pais QMF: Adriano Rosado, Eduardo dos Santos, Luciano Rosado, Alexandre dos Santos, Pitita, Ana Rita Rosado, Ronaldo e Efigênia Drumond, Guilherme Drumond, Arthur M. Lobo, Maria do Carmo Mendes e Aymoni Henrique. Partes de minha história e certamente do meu futuro.

Ao apoio do LIMA nas pessoas de: Fernanda Miquelito, Mariana Costa, Ethel, Tiago e Yasmin. Especial às professoras Márcia Rogéria Lamêgo e Juliana L. R. Fietto.

Ao meu orientador pela compreensão, paciência, ensinamentos e amizade. A vida nos traz desafios enormes e boas notícias, agradeço ao Prof. Abelardo por entender que elas poder vir juntas.

À Genetiporc do Brasil, principalmente ao Dr. Werner Meincke e Luciano Ferreira, por permitirem e apoiarem esse projeto. Uma empresa se faz de pessoas; é um enorme prazer fazer parte desse crescimento.

Aos suinocultores e colegas de profissão Dr. José Lúcio dos Santos, Dr. Lucas dos Santos, José Geraldo, Dr. Júlio Maria Pupa, Dr. Roberto Guedes, Med. Vet. Lúcio Flávio, Adolfo Pereira Terra e Med. Vet. Michelle Gabardo (UFMG).

Minha casa, a Universidade Federal de Viçosa, por me acolher desde o COLUNI em 1990. Não é perfeita, mas nos faz aprender que as imperfeições são oportunidades e que algumas pessoas complicadas no meio acadêmico, servem de estágio para o que vamos encontrar após as “quatro pilastras”.

Ao apoio estrutural: FAPEMIG, CNPq, FUNARBE e Depto. de Biologia Animal.

## **BIOGRAFIA**

ALBANNO LEONARD BRAZ CAMPOS PINHEIRO, filho de Antônio Flávio Teixeira, Suelena Braz de Barros e Maria Braz de Barros, nasceu na cidade de Taguatinga, Distrito Federal, em 11 de setembro de 1975.

Em janeiro de 1990 ingressou no colégio de aplicação da Universidade Federal de Viçosa (COLUNI), Viçosa.

Em janeiro de 1994, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Medicina Veterinária em março de 2000.

Em janeiro de 2004 ingressou no programa MAST (Minnesota Agricultural Student Trainee), onde participou de atividades e disciplinas relacionadas à suinocultura industrial nos Estados Unidos.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, tendo defendido a dissertação em 22 de novembro de 2011.

Desde novembro de 2009 atua como coordenador comercial e consultor técnico prestando serviços à Genetiporc do Brasil LTDA.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Características dos roedores das espécies estudadas.....	<b>3</b>
2.2. Etiologia e aspectos moleculares do circovírus suíno.....	<b>4</b>
2.3. Patogênese.....	<b>5</b>
2.4. Epidemiologia.....	<b>6</b>
2.4.1. Infecção em demais espécies.....	<b>7</b>
2.4.2. Infecção em suínos.....	<b>7</b>
2.4.3. Susceptibilidade relacionada a raças e linhagens.....	<b>8</b>
2.5. Sinais clínicos e aspectos patológicos.....	<b>9</b>
2.5.1 Síndrome da Refugagem Multissistêmica Pós desmama (PMWS).....	<b>10</b>
2.5.2 Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS).....	<b>10</b>
2.5.3 Pneumonia Necrotizante Proliferativa (PNP).....	<b>10</b>
2.5.4 Falhas reprodutivas (“Litter effect”).....	<b>11</b>
2.6 Diagnóstico.....	<b>11</b>
2.7 Controle.....	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS GERAIS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Objetivos específicos.....	<b>15</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. Descrição e Geolocalização das propriedades, armadilhas e locais de captura.....	<b>16</b>
4.2. Roedores e coleta de amostras.....	<b>18</b>
4.3. Histopatologia e Imunohistoquímica.....	<b>19</b>
4.4. Sorologia - Avaliação da resposta humoral por ELISA indireto.....	<b>20</b>
4.5. Nested PCR.....	<b>21</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>31</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>APÊNDICE 1: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICADO DVT/UFV.....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Características morfológicas do roedor da espécie <i>Rattus rattus</i> ...	<b>03</b>
<b>Figura 2:</b> Características morfológicas do roedor da espécie <i>Mus musculus</i> .	<b>03</b>
<b>Figura 3:</b> Estado de Minas Gerais dividido em Mesorregiões.....	<b>17</b>
<b>Figura 4:</b> Mesorregião “Zona da Mata” de Minas Gerais.....	<b>17</b>
<b>Figura 5:</b> Mesorregião Oeste de Minas Gerais.....	<b>18</b>
<b>Figura 6:</b> Corte histológico de linfonodo ilustrando uma leve rarefação linfocitária. Aumento de 40 vezes.....	<b>24</b>
<b>Figura 7:</b> Corte histológico de pulmão mostrando uma leve pneumonia intersticial linfocítica e focalmente extensiva. Aumento de 100 vezes.....	<b>24</b>
<b>Figura 8:</b> Marcação obtida pela técnica de imunohistoquímica. Tecido: Baço de camundongo MM. Aumento de 40 vezes.....	<b>25</b>
<b>Figura 9:</b> Marcação obtida pela técnica de imunohistoquímica. Tecido: Pulmão de camundongo MM. Aumento de 100 vezes.....	<b>26</b>
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose de produtos de Nested PCR.....	<b>28</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Resumo das principais práticas de manejo que podem influenciar o risco de desenvolvimento da PMWS em suínos.....	<b>13</b>
<b>Quadro 2.</b> Localização das propriedades rurais fontes dos camundongos estudados para investigação da presença do PCV2: município, número de matrizes, mesorregião, geolocalização e quantidade por espécie.....	<b>16</b>
<b>Quadro 3.</b> Amostras de órgãos dos roedores enviadas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica.....	<b>20</b>
<b>Quadro 4.</b> Amostras de soro dos camundongos capturados enviadas para ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-PCV2.....	<b>21</b>
<b>Quadro 5.</b> . Amostras de tecidos das espécies <i>Rattus rattus</i> (RR) e <i>Mus musculus</i> (LM) enviadas para o teste de nested PCR.....	<b>22</b>
<b>Quadro 6.</b> Resultados da avaliação histopatológica e de marcação para a imunohistoquímica.....	<b>25</b>
<b>Quadro 7.</b> Resultados de densidade óptica (OD) obtidos com amostras de soro pela técnica de ELISA segundo Fausto (2010)....	<b>26</b>
<b>Quadro 8.</b> Resultados obtidos nas técnicas de nested PCR e imunohistoquímica em amostras de tecidos das espécies <i>Mus musculus</i> e <i>Rattus rattus</i> .....	<b>28</b>

## RESUMO

PINHEIRO, Albanno Leonard Braz Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2011. **Investigação do potencial de roedores peridomésticos como reservatório do *Porcine circovirus 2 (PCV2)***. Orientador: Abelardo Silva Júnior. Coorientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O *porcine circovirus-2 (PCV2)* é atribuído como um dos agentes relacionados a doenças associadas ao circovírus (PCVAD), ocasionando perdas econômicas significativas na produção mundial de suínos. Poucos trabalhos são realizados a respeito da infecção em outras espécies pelo PCV2 e sua participação na epidemiologia das doenças associadas ao vírus. O propósito desse estudo foi investigar a ocorrência de infecção em roedores peridomésticos das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus* pelo PCV2 em granjas comerciais de suínos. Animais dessas espécies foram capturados em importantes centros de produção no estado de Minas Gerais. Amostras de órgãos (linfonodos, baço, rins, fígado, pulmão) e sangue foram coletadas. Os fragmentos de tecidos coletados foram submetidos ao teste de imunohistoquímica e Nested PCR. Adicionalmente, foram realizadas avaliações histológicas em amostras de baço, rim e pulmão. Presença de anticorpos anti-PCV2 foram avaliados pela técnica de ELISA. O teste de imunohistoquímica demonstrou marcações encontradas em 12 animais, principalmente no baço (região subcapsular), no pulmão (macrófagos alveolares) e nos rins (interior dos túbulos). A análise do soro pela técnica de ELISA não detectou anticorpos contra o PCV-2 nas 12 amostras avaliadas.. A histopatologia demonstrou em algumas amostras, uma pneumonia bronco-intersticial neutrofílica e linfocítica, multifocal e moderada, com formação de nódulos linfóides associados a vasos e bronquíolos. No ensaio de nested-PCR foi detectado DNA viral em diferentes tecidos avaliados de seis animais. Os resultados citados demonstram que os roedores domésticos das espécies estudadas podem exercer importante papel na epidemiologia das doenças relacionadas ao PCV2. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar a transmissão do PCV2 dos roedores para os suínos.

## ABSTRACT

PINHEIRO, Albanno Leonard Braz Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2011. **Investigation of the potencial of peridomestic rodents as reservoir of the *Porcine circovirus 2 (PCV2)***. Advisor: Abelardo Silva Júnior. Co-advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo and Juliana Lopes Rangel Fietto.

*Porcine circovirus-2 (PCV2)* has been related as the causative agent of the Post-weaning Multissystemic Wasting Syndrome (PMWS) and other diseases called porcine circovirus associated diseases (PCVAD). They are responsible for economic losses in pork production worldwide. There is only a few scientific studies describing the infection in other species but swine and their role at the epidemiologic dynamics of the diseases related to the PCV2. The aim of this study is to investigate the occurrence of infection by the PCV2 in wild mice (*Mus musculus* and *Rattus rattus*) captured in hog farms. The capture of the 40 sorted mice was made at 5 pig wean to finish farms in Minas Gerais, an important state of pork production in Brazil. Samples of tissues (lymph nodes, spleen, kidney, heart and lungs) and blood were collected from the mice. The tissue fragments collected were submitted to immunohistochemistry and Nested PCR. Additionally, samples from spleen and lungs were analyzed by histology assays. Presence of antibodies anti-PCV2 was tested by ELISA assays. Immunohistochemical analysis showed positive prints in 12 animals, mostly on spleen (sub scapular area), lungs (alveolar macrophages) and kidney (inside the tubules). The 12 serum analyzed by ELISA hasn't detected antibodies anti-PCV2. Histopathological analyses revealed in some samples, a multifocal and lympho-neutrophilic interstitial bronchopneumonia, with some nodule formations. Moreover, spleen samples showed a mild to moderate lymphocyte depletion related to the PCVAD. The Nested PCR assays showed the presence of viral DNA at different tissues from 6 tested rodents. Thus, the results found in this work, indicate that mice from the species *Mus musculus* and *Rattus rattus* can be naturally infected by the PCV2 and they would play a role in the epidemiology of PCVAD. However, more studies are necessary to confirm the transmission of the PCV2 from wild rodents to pigs.

## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira vem se desenvolvendo nos últimos anos e se tornado parte importante do agronegócio brasileiro. Segundo Roppa (2002), mais de 730 mil pessoas dependem diretamente da suinocultura, sendo essa atividade responsável pela renda de mais de 2,7 milhões de pessoas. A evolução do plantel nos últimos anos fez do Brasil o terceiro maior rebanho mundial de suínos com mais de 32 milhões de cabeças, sendo superado apenas pelos Estados Unidos, com um rebanho superior a 60 milhões de animais, e pela China que possui o maior rebanho de suínos, com mais de 460 milhões de animais. O plantel tecnificado (excluindo atividades de subsistência) em 2010 foi de 1.588.897 matrizes gerando uma produção 2.667 mil toneladas. Nos últimos 5 anos, houve uma diminuição da atividade de subsistência, com aumentos no número de abates fiscalizados pelo MAPA, passando de 23.134.111 toneladas em 2006 para 29.072.584 toneladas em 2010 (Abipecs, 2011). O plantel brasileiro vem se concentrando em grandes agroindústrias, tornando a produção de alta produtividade e competitividade. Estima-se que 88% da produção brasileira seja realizada por grandes empresas com maior concentração no sul do país (Abipecs, 2011).

A evolução sanitária, da produtividade e na gestão das empresas produtoras de carne são pontos importantes para aumentar a competitividade da carne suína no mercado externo. Aumentos no custo de produção e quedas na qualidade dos animais ao abate prejudicam a competitividade frente a outros países exportadores.

Dentro do panorama mundial de globalização, onde o desenvolvimento do setor mostra um intenso crescimento do trânsito de animais e produtos entre países, há maiores possibilidades da emergência de doenças consideradas exóticas e, portanto, demanda uma maior atenção nos programas de sanidade. Baseado neste contexto, os agentes infecciosos de suínos têm recebido grande atenção. A partir da década de 90, muitos países tiveram grandes perdas produtivas devido a agentes patogênicos, principalmente vírus.

A Síndrome de Refugagem Multissistêmica de Suínos (Postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS), atribuída ao *Porcine circovirus 2* (PCV2) e doenças associadas ao vírus como falhas reprodutivas, complexo da doença respiratória em suínos, nefrite, epidermite entre outras, elevam os custos de produção levando a perdas econômicas na suinocultura mundial. A intensidade

variável da sintomatologia em diversos rebanhos dificulta uma estimativa dos prejuízos econômicos para a suinocultura. Segundo estimativas (Infosuínos, 2010), as perdas com mortalidade, desuniformidade de lotes, conversão alimentar e medicações extras são por volta de R\$ 19,00/suíno abatido. Isso geraria num plantel de 10.000 matrizes um potencial prejuízo anual por volta dos R\$ 4.666.000,00. O entendimento dos vários fatores da cadeia epidemiológica é uma ferramenta importante nas estratégias de prevenção e controle visando à diminuição desses prejuízos, em especial as doenças associadas ao PCV2. Estudos em modelos murinos utilizando-se camundongos vêm sendo realizados para entendimento da patogenia de várias doenças, inclusive o PCV2, a exemplos de Li et al. (2010) e Kiupel et al. (2005). A infecção experimental do PCV2 em roedores levanta o questionamento sobre a possibilidade da infecção natural e participação de camundongos peridomésticos na dispersão do vírus em granjas de suínos. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar a ocorrência de infecção pelo PCV2 em roedores *Mus musculus* e *Rattus rattus* presentes em granjas comerciais de suínos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características dos roedores das espécies estudadas

Os roedores peridomésticos das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus* são comuns a instalações onde se alojam suínos no Brasil. Mesmo em unidades de alta tecnificação, a disponibilidade de alimento, abrigo e água para os roedores é de difícil controle, gerando menores ou altas infestações. Os galpões de gestação, maternidade, creche e fábricas de ração são locais propícios para a proliferação desses roedores pela disponibilidade de abrigo, ração e água (Funasa, 2002). Os roedores tem contato direto com os suínos, assim como comedouros, bebedouros e outros utensílios, variando de acordo com as estratégias para controle de infestação.

A classificação taxonômica dos roedores foi realizada segundo a publicação “Brazilian Rodents Guide and Taxonomical Keys (Pan American Health Organization, 2008)” e pelo manual FUNASA – 2002. As figuras 1 e 2 mostram as características dos roedores utilizados no experimento.

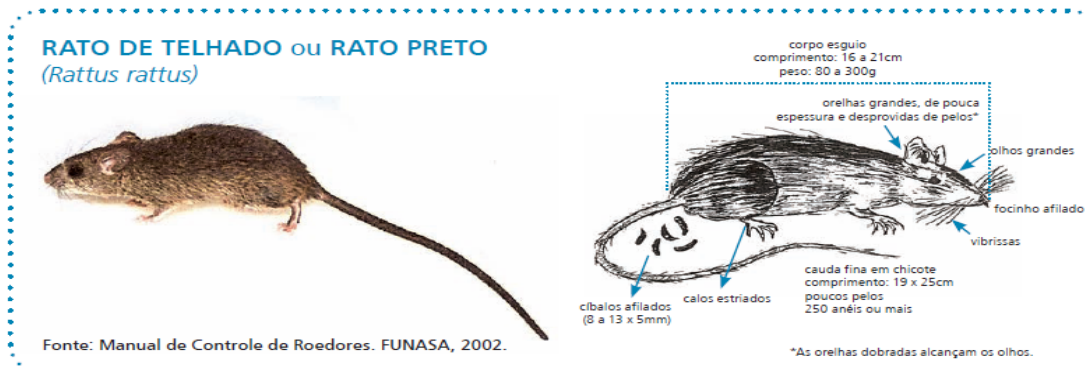


Figura 1. Características morfológicas do roedor da espécie *Rattus rattus*.



Figura 2. Características morfológicas do roedor da espécie *Mus musculus*.

## 2.2. Etiologia e aspectos moleculares do circovírus suíno

O PCV é um vírus não envelopado que contém uma fita simples de DNA de 1,76 Kb. O PCV é classificado dentro da família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*. Outros representantes da família incluem o vírus da anemia infecciosa das galinhas, vírus da doença do bico e das penas de psitacídeos e circovírus dos pombos (Mankertz et al., 2000; Bassami et al., 1998; Meehan et al., 1998; Mankertz et al., 1998a; Meehan et al., 1997).

Os genomas do PCV1 e PCV2 contêm 1759pb e 1768pb, respectivamente (Meehan et al., 1997) e são organizados de forma similar possuindo 76% de identidade. O genoma do PCV2 é organizado em três principais fases de leitura aberta (ORFs – Open Reading Frames): ORF1, ORF2 (Hamel et al., 1998; Meehan et al., 1997; Meehan et al., 1998; Morozov et al., 1998) e ORF3 (Liu et al., 2005). Atualmente, o PCV2 foi subdividido em dois grupos baseados em análises filogenéticas: PCV2-grupo 1 (genótipo 2B) e PCV2-grupo 2 (genótipo 2A), sendo o grupo 1 mais comum. Cada grupo apresenta uma sequência particular de nucleotídeos ou de aminoácidos que podem servir como uma assinatura para distinção entre os grupos (Olvera et al., 2007).

Chiarelli-Neto et al. (2009), estudaram a variação gênica de isolados brasileiros filogenicamente e filogeograficamente, concluindo que no país encontram os subgrupos 1AB, 2D e 2, sendo a maioria pertencentes ao subgrupo 1AB. Os mesmos autores ainda sugeriram que o vírus foi introduzido no país em mais de uma vez, provavelmente pela importação de animais e sêmen. As análises filogenéticas realizadas pelos mesmos autores mostraram uma porcentagem alta de haplótipos semelhantes aos europeus, sugerindo que o vírus tenha sido introduzido no Brasil pela importação de animais e sêmen da Europa.

Gagnon et al. (2010) em estudos de amostras de suínos acometidos por um surto da doença denominada “*porcine reproductive and respiratory syndrome*” (PRRS), e após a investigação da participação do PCV2 nos quadros clínicos, ele encontrou uma variedade do PCV2 a qual ele denominou PCV1/2a baseado na análise das sequências gênicas obtidas. O mesmo autor relata que embora a prevalência levantada em Quebec, Canadá seja baixa (2,5% dos positivos para o PCV), mais estudos sobre as variações gênicas e suas origens devem ser estudadas.

## 2.3 Patogênese

As bases patogênicas que explicam as doenças associadas ao PCV2 ainda são pouco esclarecidas. De fato, a relação entre o PCV2 e algumas manifestações clínicas tem sido estabelecidas não somente na presença do vírus, como agente causal único da doença (Segales et al., 2004). Alguns autores têm argumentado a necessidade de uma co-infecção para o desenvolvimento da doença (Allan et al., 1999; Choi & Chae, 2000) ou a presença de co-fatores não infecciosos (Allan & Ellis, 2000; Krakowka et al., 2001; Kyriakis et al., 2002). Silva et al. (2011) demonstraram não haver diferença significativa entre a carga viral de linfonodos inguinais em animais com e sem PMWS. Além disso, os mesmos autores sugeriram que em animais com PMWS, os linfonodos apresentam uma carga viral não relacionada com a gravidade das lesões microscópicas.

Trabalhos como os de Juhan et al. (2010) e Liu et al. (2005 e 2006) demonstraram o envolvimento da proteína expressa pela ORF3 na patogenicidade do PCV2. Nestes trabalhos, os autores demonstram que os PCV2-mutantes para ORF3-deletada, apresentaram-se menos patogênicos em camundongos Balb/c em comparação ao vírus selvagem.

A PMWS tem sido associada à combinação do PCV2 com outros patógenos virulentos, como o vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV), vírus da influenza suína, parvovirus suíno (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kim et al., 2002; Pallares et al., 2002). Essas infecções podem confundir o diagnóstico e complicar a apresentação clínica da doença.

Segundo Fernandes et al. (2006), a manifestação de sinais clínicos e lesões associadas a PMWS ocorreram de forma leve em leitões SPF infectados exclusivamente com o PCV2. No entanto, o PCV2 foi detectado em outros órgãos, com um maior número de lesões histopatológicas e em maior proporção nos suínos co-infectados com PPV, quando comparados aos infectados somente com PCV2, reforçando a hipótese de que a infecção por PCV2 pode ser acentuada pela co-infecção por PPV.

Chang et al. (2005) observaram que o PCV2 foi capaz de causar uma significativa falha funcional nos macrófagos alveolares, incluindo uma diminuição transiente da fagocitose e uma redução persistente na capacidade microbicida. Além

disso, os macrófagos inoculados com o PCV2 também foram ineficazes na produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ . O desenvolvimento de pneumonia intersticial em suínos acometidos naturalmente pela PMWS ou experimentalmente infectados com PCV2 resulta provavelmente do recrutamento de células inflamatórias da fase aguda e de células fagocíticas mononucleares dos vasos sanguíneos para os septos interalveolares e espaço alveolar, devido à superexpressão de citocinas e quimocinas liberadas pelos macrófagos infectados com PCV2.

Macrófagos alveolares podem carrear o PCV2 em suínos infectados, e embora não apresentem citotoxicidade direta, o vírus pode impedir a capacidade de expressão de várias citocinas associadas a um decréscimo na atividade microbicida dependente de oxigênio, permitindo assim a infecção por patógenos secundários ou oportunistas nos pulmões. Várias citocinas e quimocinas são super-reguladas podendo intensificar o estresse respiratório e agravar a pneumonia intersticial pelo aumento de reações inflamatórias e recrutamento adicional de células fagocitárias inflamatórias mononucleares para os pulmões de suínos com PMWS (Chang et al., 2006).

As populações de leucócitos, principalmente envolvidas na patogênese da síndrome da dermatite e nefropatia suína (PDNS), são os neutrófilos, monócitos e células T citotóxicas. Células T  $\gamma\delta$  estão implicadas na resposta inflamatória e imune inicial, também podem ser de grande importância na PDNS (Sipos et al., 2005). A infecção pelo PCV2 sabidamente produz um efeito imunossupressor no hospedeiro e as lesões relacionadas são caracterizadas por depleção linfóide e leucopenia. Caracteristicamente há destruição de folículos linfóides (Ramamoorthy et al., 2008).

Exames hematológicos revelaram uma redução de linfócitos T  $CD4^+$  e células B, resultando em um quadro de depleção linfóide nos animais doentes (Segales et al., 2001). Os níveis de mRNA de IL-1 $\alpha$  e IL-10 demonstraram estar aumentados nos animais afetados, e níveis de mRNA de IL-2 e IL-2R $\alpha$  (CD25) parecem sofrer uma redução (Sipos et al., 2004). Chae e Choi (2011) demonstraram que a expressão do mRNA para IL-1 $\alpha$  e IL-8 foi aumentada na síndrome respiratória associada ao PCV2 enquanto que para IL-10 foi diminuída.

## **2.4. Epidemiologia**

### **2.4.1. Infecção em demais espécies**

O PCV1 tem mostrado ser capaz de infectar células de suínos e bovinos in vitro, mas não foi capaz de infectar células humanas ou de ovinos (Allan et al., 1994a). Jun et. al. (2010) demonstraram que camundongos “Kunming” poderiam ser experimentalmente infectados pelo PCV2 em virtude das lesões e soroconversão encontradas nesses roedores.

Lörincz et al. (2010) descreveram a presença do DNA do PCV2 em espécies de camundongos e ratos (*Mus musculus*, *Mus agrarius* e *Rattus norvegicus*), e que os mesmos capturadas fora das granjas de suínos não apresentaram o vírus. Ainda, Seo et. al. (2008), usando as técnicas de PCR e Real time-PCR, detectaram o PCV2 em diferentes órgãos nas espécies *Rattus norvegicus* e *Apodemus agrarius ningpoensis*.

Hattermann et. al. (2004) infectaram linhagens de células humanas com o PCV1 e PCV2. O objetivo foi investigar a ocorrência de infecção e replicação viral em células epiteliais e linfócitos humanos. O PCV1 persistiu na maioria das células, porém sem causar alterações visíveis. As células B transfectadas com o PCV2 apresentaram efeito citopático. No entanto, quando células livres de vírus foram inoculadas com o sobrenadante PCV-infectado, a infecção não foi reproduzida. Ellis et al. (2000) testaram o soro de 54 veterinários especialistas em suínos de campo, seis veterinários acadêmicos de rotinas em laboratórios (envolvidos na pesquisa em PCV2 por vários anos). Os autores utilizaram 3 técnicas de ELISA e todos os resultados foram negativos para anticorpos específicos contra PCV2 e PCV1. Allan et al. (2000) não detectaram anticorpos para o PCV2 em bovinos, ovinos e humanos e também a infecção experimental não produziu anticorpos detectáveis ou lesões características em caprinos.

### **2.4.2. Infecção em suínos**

A rota de transmissão oro-nasal é considerada a mais frequente via de infecção do PCV2 entre os suínos (Allan et al., 1999). Em condições de campo, a maior parte dos animais inicia a soroconversão entre 2 a 4 meses de idade (Larochelle et al., 2003). A transmissão horizontal do PCV2 tem sido demonstrada

em condições experimentais (Albina et al., 2001; Bolin et al., 2001). Gava et al. (2008) demonstraram a transmissão transplacentária e também pelo sêmen.

O ácido nucléico viral foi detectado em fezes, saliva e “swabs” oculares em suínos, após 31 dias de infecção com PCV2 isolado de cultivo celular (Krakowka et al., 2001). A técnica de PCR foi usada para detectar a presença do ácido nucléico do PCV2 em fezes, urina e “swabs” nasais de animais naturalmente infectados (Sibila et al., 2001). Baseado nesses estudos, o PCV2 pode também ser transmitido por secreções oronasais, fezes e urina (Segalés et al., 2002).

Segundo Yu et al. (2007), a replicação viral, níveis de lesões pelo PCV2 e de antígenos é maior em alguns órgãos (linfócitos mononucleares periféricos, linfonodos bronquiais, linfonodos inguinais, tonsilas, pulmões, fígado, rins, baço e timo), sendo na média, mais intensa aos 14 dias após a infecção. No entanto, sem aparecimento de sinais clínicos da PMWS ou doenças associadas ao PCV2. Os mesmo autores também sugerem que os mRNA's-Cap foram detectados nos linfócitos mononucleares periféricos somente 13 dias pós-infecção e em maior intensidade nos Linfócitos B dentre as células mononucleares periféricas.

A morbidade e mortalidade da doença são variáveis entre granjas e entre baias da mesma granja. Normalmente, as taxas variam entre 4-30% e 70-80%, respectivamente (Segalés et al., 2002).

### **2.4.3. Susceptibilidade relacionada a raças e linhagens**

No campo aproximadamente 42% das leitegadas de rebanhos com casos de PMWS não eram afetados, porém 16% dos animais acometidos eram responsáveis por 54% das perdas. Esta ocorrência indica uma susceptibilidade diferenciada entre leitões de um mesmo rebanho positivo para o PCV2 e com sinais da PMWS. Diante deste fato, atualmente as empresas de melhoramento genético buscam rastrear genes responsáveis por uma maior resistência às doenças associadas ao PCV2, uma vez que animais melhorados geneticamente poderiam reduzir a necessidade de custos com vacinas, mão-de-obra e medicamentos (Madec et al. 2000).

Trabalhos foram realizados com suínos das raças Duroc, Landrace, e Large White por Opriessnig et al. (2006) por meio da infecção experimental com o PCV2 pelas vias intravasal e intramuscular em animais de 5 a 7 semanas de vida. Nesse

experimento, 23 suínos Duroc, 19 Landrace, e 21 Large White foram inoculados com o PCV2. Os sinais clínicos típicos da PMWS foram diagnosticados apenas em três suínos da raça Landrace. Nenhum dos animais Duroc ou Large White desenvolveram graves lesões linfóides associadas à PMWS. Os resultados sugerem uma predisposição dos animais Landrace utilizados nesse experimento, a desenvolver lesões induzidas pelo PCV2. Posteriormente, Opriessnig et al. (2009a) demonstraram que animais da raça Pietrain são menos susceptíveis a lesões induzidas pelo PCV2 em relação a um grupo de animais da raça Landrace, mesmo em animais experimentalmente infectados às 21 semanas de idade, onde o sistema imune dos suínos está mais desenvolvido.

Sibila et al. (2005) quantificaram e compararam a carga viral no soro de suínos naturalmente infectados de duas idades em dois rebanhos espanhóis afetados pela PMWS. O rebanho possuía três diferentes linhagens paternas (A=100% Pietrain; B=50% Large White x 50% Pietrain e C=25% Large White x 75% Duroc). A mortalidade associada à PMWS ocorreu em maior número entre 9-15 semanas de idade e teve relação direta com os animais com maiores cargas virais no soro. Uma relação significativa entre animais de linhagem paterna C e altas cargas virais no soro foi observada em um dos rebanhos estudados.

Zhou et al. (2006) estudaram a soroprevalência para PCV2 em 46 suinoculturas localizadas em Zhejiang (China). Os autores observaram que 44,83% de todas as porcas eram Landrace e que 64,28% de suas leitegadas eram positivas para o PCV2, sendo maior que em fêmeas Yorkshire e Duroc. Segundo os autores, isso indica uma maior susceptibilidade de animais Landrace à infecção pelo PCV2. Ainda, os resultados indicam uma possível maior resistência dos animais da raça Pietrain ao PCV2.

## **2.5 Sinais clínicos e aspectos patológicos**

Manifestações de outras síndromes associadas à infecção pelo PCV2, além da PMWS, como desordens reprodutivas, doenças respiratórias, hepatites, enteropatias, doenças neurológicas e síndrome da dermatite e nefropatia suína, levaram alguns autores a renomear as doenças relacionadas ao vírus como “Doenças Associadas ao Circovírus Suíno” - (Porcine Circovirus-associated Disease - PCVAD) (Ramamoorthy & Meng, 2008).

### **2.5.1 Síndrome da Refugagem Multissistêmica Pós desmama (PMWS)**

A PMWS é a síndrome mais importante causada pelo PCV2 (Harding, 2004). Os sinais clínicos que formam a base para o diagnóstico preliminar são perda de peso, dispnéia, aumento dos linfonodos, diarreia, palidez da pele e icterícia (Segalés et al., 2004). Os sinais clínicos da PMWS são tipicamente encontrados em animais de 7 a 15 semanas de idade (Harding et al., 1998). O aumento de volume dos linfonodos (principalmente o inguinal, submandibular, mesentérico e mediastínico) é uma das alterações patológicas mais comuns em animais com PMWS. Em menor proporção de ocorrência, os linfonodos podem apresentar áreas de necrose multifocal visíveis macroscopicamente. Uma porcentagem 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 (Segalés & Domingo, 2002).

As principais lesões histológicas apresentadas pela PMWS incluem a presença de linfocitos e granulomas inflamatórios nos pulmões, rins e tecidos linfóides, assim como, depleção linfóide. As lesões hepáticas têm sido descritas pela ocorrência de infiltrado inflamatório na área portal com necrose, expansão e vacuolização do citoplasma de hepatócitos (Clark, 1997).

### **2.5.2 Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS)**

A Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS) é uma doença que afeta animais de 1,5 a 4 meses de idade (Smith et al., 1993). Nos casos fatais, são observadas lesões cutâneas que consistem em vasculites necrotizantes que afetam a derme, levando a necroses subcutâneas e úlceras hemorrágicas dérmicas (Choi & Chae, 2001; Thibault et al., 1998).

### **2.5.3 Pneumonia Necrotizante Proliferativa (PNP)**

A Pneumonia Necrotizante Proliferativa (PNP) foi inicialmente descrita em 1990 no Canadá, como um 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 do PRRSV e PCV2 (Pesch et al., 2000).

Pneumonia intersticial subaguda é comum nas lesões pulmonares. Em alguns casos é possível ver grandes histiócitos e células gigantes multinucleares na área alveolar. Nos casos crônicos, é possível verificar uma bronquiolite fibrosa (Rossell et al., 1999).

#### **2.5.4 Falhas reprodutivas (“Litter effect”)**

Existem estudos da associação do PCV2 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).

Mateusen et. al. (2007) sugerem uma alta mortalidade em embriões infectados pelo PCV2 até os 21 dias de gestação. Os embriões do grupo positivo foram experimentalmente infectados com  $10^{5,0}$  TCID<sub>50</sub> PCV2/mL e transplantados em fêmeas soropositivas para o PCV2 ao sétimo dia do ciclo gestacional. Os autores concluíram que o PCV2 pode se replicar em embriões até os 21 dias de crescimento, e levar a mortalidade embrionária. Posteriormente, algumas fêmeas retornaram regularmente ao estro, indicando que a morte embrionária se deu anteriormente aos 12 dias de gestação. Em contrapartida, parte das fêmeas receptoras de embriões expostos ao PCV2, não retornou regularmente ao estro. Parte dos embriões encontrados nessas fêmeas apresentaram degeneração tecidual, se tornando inviáveis e outros, mesmo com identificação viral na placenta, mesonéfrons e fígado, não apresentaram lesões macroscópicas (considerados embriões viáveis). Tal achado sugere diferenças na susceptibilidade individual dos embriões ao PCV2.

## **2.6 Diagnóstico**

O diagnóstico definitivo das doenças relacionadas ao PCV2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões e sinais clínicos causados pela doença (Allan & Ellis, 2000). Métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV2 incluem hibridização *in situ* (IHS), imunohistoquímica (IHC), ensaios de imunofluorescência (IFI), reação da polimerase

em cadeia (PCR) (Allan et al., 1999; Larochelle et al., 1999), e análises do polimorfismo dos fragmentos em ensaios de enzimas de restrição (RFLP) (Nayar et al., 1997). O ácido nucléico do PCV2 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., 2001).

Os diagnósticos diferenciais das doenças relacionados ao PCV2 podem ser amplos, dependendo dos sinais clínicos apresentados pelos animais da granja. Primeiramente e mais importante, é incluir na lista de doenças diferenciais as enfermidades respiratórias, principalmente a PRRS; pois, a soroprevalência do PRRSV é amplamente distribuída em muitos países, o que torna mais difícil a diferenciação da PCVAD e da PRRS (Segales et al., 2002). Além disso, todas as doenças ou condições que envolvem a refugagem de animais podem ser incluídas na lista de diagnóstico diferencial (Harding, 1997).

## **2.7 Controle**

O PCV2 é um vírus muito estável e persistente no meio ambiente da granja e a realização da erradicação viral torna-se muito difícil (Kamstrup et al., 2004). As mudanças devem ocorrer nas práticas de manejo de higiene e redução do estresse em diferentes estágios da criação. As medidas devem ainda incluir a redução na mistura de animais, fluxo adequado (todos dentro/todos fora) e redução na densidade de animais, especial cuidado na castração e atenção na qualidade do ar, qualidade de criação pós-desmame e nos períodos de crescimento (Segalés et al., 2002).

O PCV2 é muito resistente aos desinfetantes de uma maneira geral, principalmente por ficarem protegidos na matéria orgânica. Desta forma é importante uma limpeza geral com uso de detergentes antes do uso do desinfetante. Os desinfetantes recomendados são aqueles à base de uma mistura de peroximonosulfato de potássio e cloreto de sódio, seguidos dos produtos à base de hidróxido de sódio, de amônia quaternária, de hipoclorito de sódio e dos derivados fenólicos (Ciacci-Zanella, 2005).

Até o momento, vacinas comerciais são usadas contra a infecção pelo PCV2 em leitões e porcas. Os laboratórios tem utilizado diferentes estratégias vacinais

como segmentos de um vírus quimérico PCV1-2 (Fenaux et al., 2004), proteína recombinante do capsídeo viral expressa no sistema de baculovírus e partículas inativadas do PCV2, as quais são usadas na imunização de porcas (Ramamoorthy & Meng, 2008). Kristensen et al. (2011) analisaram 107 artigos científicos a respeito do efeito no ganho de peso diário (GPD) e mortalidade de leitões da desmama ao abate, para protocolos de vacinação dos principais laboratórios produtores de vacinas para o PCV2. Os trabalhos avaliados foram em relação às vacinas: Circovac® (Merial S.A.S., Lyon, França), Ingelvac® CircoFLEX (Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Alemanha), Suvaxyn® PCV2 (Fort Dodge Animal Health Limited, Southampton, Reino Unido), Porcilis® PCV (Intervet International BV, Boxmeer, Holanda), e Circumvent® PCV (Intervet/ScheringPlough Animal Health, Millsboro, EUA). Os autores concluíram que houve melhora significativa nos índices de GPD (30 a 40g) e mortalidade (4 a 5%) em relação aos grupos controle. No entanto, os autores também concluíram que não houve diferenças significativas entre as vacinas dos laboratórios testados, embora o volume de pesquisas científicas seja baixo para algumas vacinas. O quadro 1 resume as principais práticas de manejo que podem influenciar o risco de desenvolvimento da PMWS em suínos.

	Fatores aumentando o risco de PMWS	Fatores que diminuem o risco de PMWS
Instalações	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Grande número de matrizes de produção</li> <li>▪ Baías para grande número de animais na creche e recria/terminação</li> <li>▪ Proximidade a outras suinoculturas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fossas separadas para baias de engorda adjacentes</li> <li>▪ Instalações para banho de funcionários</li> </ul>
Práticas de manejo geral	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Uso indiscriminado de “cross-fostering”</li> <li>▪ Curtos períodos de vazio sanitário em creches e recrias</li> <li>▪ Variações de pesos e idades em mesmas instalações</li> <li>▪ Fluxo contínuo de animais</li> <li>▪ Compra de matrizes de reposição com falhas vacinais</li> <li>▪ Desmama precoce</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Sexagem já na creche</li> <li>▪ Aumentar peso mínimo dos leitões à desmama</li> <li>▪ Baías coletivas na gestação</li> <li>▪ Somente permitir visitas de pessoas que tenham evitado contato com suínos por vários dias</li> <li>▪ Uso de sêmen de central de Inseminação única</li> </ul>
Vacinação, tratamentos e nutrição	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Uso de vacinas contra <i>E.coli</i> em matrizes</li> <li>▪ Uso separado de vacinas contra Erisipelas e PPV em marrãs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Vacinação de matrizes contra rinite atrófica</li> <li>▪ Use de ocitocina durante partos</li> <li>▪ Uso de plasma “spray-dried” em dietas iniciais de creche</li> </ul>

**Quadro 1** - Principais práticas de manejo que podem influenciar o risco de desenvolvimento da PMWS em suínos. Fonte: Grau-Roma et. al. (2011).

Além dos métodos vacinais, 20 práticas citadas pelo denominado “Postulado de Madec” vem sendo utilizada para o controle das PCVAD. Basicamente, estas podem ser resumidas nas adequações para melhorar a lotação de animais, limpeza e desinfecção, uso do sistema “all-in-all-out”, evitar mistura de lotes (“cross-fostering”), identificação, isolamento e tratamento em tempo hábil de animais acometidos, manutenção da temperatura de conforto e qualidade de ar e o uso de vacinação e anti-parasitários (Madec et. al., 2000).

### **3. OBJETIVO GERAL**

Identificar a presença da infecção pelo PCV2 em roedores *Mus musculus* e *Rattus rattus* de granjas comerciais de suínos.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar se as lesões histopatológicas em órgãos dos animais estudados são compatíveis com a infecção do PCV2;
- Detectar nos animais avaliados a infecção produtiva do PCV2 por meio imunohistoquímica;
- Detectar a presença do DNA viral nos órgãos coletados dos animais avaliados;
- Classificar os genótipos virais detectados nas amostras avaliadas;
- Investigar a soroconversão nos animais avaliados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Descrição e geolocalização das propriedades, armadilhas e locais de captura

A Geolocalização das propriedades foi feita por meio do uso de um GPS (Garmin Nüvie pelo site [www.google.com/maps](http://www.google.com/maps)) no momento das capturas dos camundongos. Os roedores, objeto desse estudo, foram capturados em 5 granjas produtoras de suínos, localizadas em regiões importantes para a suinocultura nacional, onde aproximadamente 65 mil matrizes estão alojadas. São propriedades rurais situadas no estado de Minas Gerais – Mesorregiões da Zona da Mata e Oeste de Minas Gerais (figuras 3, 4 e 5). Os sistemas de produção são de ciclo completo e independentes (não integrados a empresas agroindustriais). As propriedades variam em grau de produtividade, sanidade, empresas fornecedoras de material genético e nutrição animal. No entanto, em todas houve facilidade na observação de fezes dos camundongos e condições propícias à proliferação dos roedores, segundo o Manual de controle de roedores – FUNASA (2002). O quadro 2 descreve a geolocalização das propriedades rurais visitadas para as coletas e o número de roedores capturados por espécie.

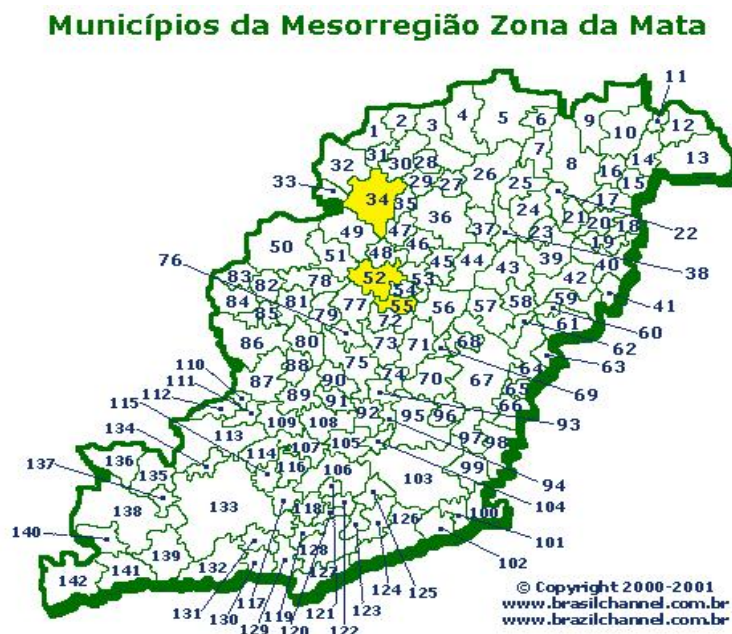
Propriedade	Município	Número de Matrizes	Mesorregião MG	Geolocalização	Quantidade de camundongos capturados	
					<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus rattus</i>
A	Mercês	200	Zona da Mata	-21° 10' 45.23", -43° 20' 36.68"	1	1
B	Coimbra	1800	Zona da Mata	-20° 49' 42.12", -42° 49' 43.87"	3	6
C	Ponte Nova	120	Zona da Mata	-20° 26' 57.32", -43° 20' 36.68"	4	5
D	Viçosa	80	Zona da Mata	-21° 10' 45.23", -42° 51' 58.03"	5	7
E	Pedra do Indaiá	60	Oeste	-20° 16' 21.03", -45° 12' 35.73"	0	8
<b>Totais</b>		<b>2260</b>			<b>13</b>	<b>27</b>

**Quadro 2** - Localização das propriedades rurais fontes dos camundongos estudados para investigação da presença do PCV2: município, número de matrizes, mesorregião, geolocalização e quantidade por espécie.

As figuras 3 a 5 descrevem a localização das propriedades rurais no estado, assim como sua posição em mesorregiões de Minas Gerais (em amarelo).



**Figura 3:** Estado de Minas Gerais dividido em Mesorregiões. Em amarelo as Mesoregiões onde se localizam as propriedades rurais visitadas para captura de camundongos. Fonte: [www.brasilchannel.com.br](http://www.brasilchannel.com.br).



**Figura 4.** Mesorregião “Zona da Mata” - MG. Onde os municípios 34, 52 e 55 correspondem aos municípios de Ponte Nova, Viçosa e Coimbra, respectivamente. Fonte: [www.brasilchannel.com.br](http://www.brasilchannel.com.br)

## Municípios da Mesorregião Oeste de Minas



Fonte: [www.brasilchannel.com.br](http://www.brasilchannel.com.br).

**Figura 5.** Mesorregião Oeste de Minas Gerais identificando a microrregião 34: Pedra do Indaiá.

### 4.2. Roedores e coleta de amostras

Para o experimento foram utilizados roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus*. Não houve avaliações a respeito de idade e sexo dos camundongos. Os roedores foram capturados utilizando-se armadilhas confeccionadas com canos de PVC (10cm diâmetro e 50cm de comprimento), baldes plásticos e armadilhas para captura de pequenos roedores fornecidas pelo Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa. As armadilhas foram posicionadas em locais visitados pelos camundongos.

Os camundongos da espécie *Rattus rattus* foram observados principalmente nos galpões de creche e fábricas de ração. Foi observada sua movimentação nas vigas de sustentação no teto das instalações, portanto, os canos de PVC foram posicionados ao longo dessas estruturas. Após 2 semanas, as duas aberturas do cano eram tapadas simultaneamente, aprisionando os ratos.

Os camundongos da espécie *Mus musculus* mostraram comportamento diferente, buscando alimento no chão e abrigo em buracos nas paredes e entulhos próximos aos galpões. Dessa forma, para sua captura, foram utilizadas as armadilhas e baldes no chão com as tampas furadas viradas para baixo nos galpões visitados pelos camundongos.

Para atrair os camundongos das duas espécies, foram utilizados pedaços de bacon queimados, bananas e ração de leitões. Após a captura, os animais eram mantidos em baldes com altura suficiente para evitar a fuga, com água e comida. Os baldes com os roedores foram posicionados em locais de pouca luz e com pouco trânsito de pessoas para evitar mortalidade. Num período máximo de 2 dias após a captura, os animais foram recolhidos nas propriedades e levados para o setor de anatomia patológica do Departamento de Veterinária - UFV para eutanásia e coleta dos órgãos, seguindo os procedimentos ditados pelo Conselho de ética para o uso de animais de experimentação, publicado pela instituição. Para as necrópsias, foram utilizados materiais cirúrgicos autoclavados e trocados a cada animal, além de luvas e máscaras. Durante a necrópsia, foram coletados: sangue cardíaco, fragmentos de pulmão, linfonodos, coração, baço, rins e fezes. As amostras de tecidos e fezes foram conservadas à temperatura de -20°C e posteriormente foram submetidas a nested PCR.

### **4.3 – Histopatologia e imunohistoquímica**

Para avaliações histopatológicas e imunohistoquímica, as amostras foram fixadas em formol 10% por 24 horas e depois transferidas para microtubos com álcool 70% até as análises.

As análises pela imunohistoquímica foram realizadas no laboratório de patologia veterinária da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Os fragmentos selecionados foram microtomizados em cortes de 4,5µm e, em seguida, transferidos para lâminas silanizadas. Após desparafinados, os tecidos foram submetidos à técnica de Streptavidina-Peroxidase (LSAB plus, DAKO) usando anticorpo policlonal anti-PCV-2 (Dr. Pat Halbur, Iowa State University), na diluição de 1:800. A marcação foi revelada com amino-etil-carbazol (AEC, Sigma) e coloração de fundo com hematoxilina de Harris por 1 minuto e novamente lavados em água destilada e então, colocadas em xilol e montadas com lamínulas e Entellan™ (Merck-chemicals) para posterior avaliação. Amostras de referência positivas e negativas foram incluídas nas análises.

O Quadro 3 mostra as amostras enviadas para avaliações histopatológicas e para o teste de imunohistoquímica. Uma amostra de linfonodo mediastínico (em realce no quadro 3) foi enviada para análise histopatológica, mas não para a IHQ.

Granja	Identificação do animal	Espécie		Órgãos				
		RR	MM	LM	LP	Rim	Pulmão	Baço
A	3	x		x		x	x	x
A	4		x	x		x	x	x
B	1		x	x		x	x	
B	3		x			x	x	x
B	4	x		x	x			x
C	8	x		x			x	x
C	5		x	x		x	x	x
C	2		x	x	x	x		x
C	3	x			x	x		
D	1	x		x		x	x	x
D	3	x				x	x	
D	2	x		x		x	x	x
D	7		x			x	x	x
D	9		x			x	x	x
D	5		x			x	x	x
D	8		x				x	x
D	4		x			x		x
D	6		x			x	x	x
E	10	x			x			x
E	4	x			x			x
E	12	x			x			x
E	7	x			x			x
E	5	x			x			x
E	11	x			x			x
TOTAL	24	13	11					

**Quadro 3.** Amostras de órgãos dos roedores enviadas para avaliação histopatológica e imunohistoquímica. (RR): espécie *Rattus rattus*, (MM): espécie *Mus musculus*. (LM em realce cinza): linfonodo mediastínico (enviada somente para avaliação histopatológica), (LP): linfonodo poplíteo.

#### 4.4. Sorologia - Avaliação da resposta humoral por ELISA indireto

Para a avaliação da resposta humoral dos animais ao PVC2, amostras de soro dos animais estudados foram submetidas ao teste de ELISA indireto. Os poços da microplaca de ELISA foram sensibilizadas com uma proteína primária recombinante “rCap-PCV-2” (Fausto, 2010).

A proteína “rCap-PCV-2” foi produzida por cepas competentes de *E. coli* da linhagem BL21 (DER)-RIL (Codon Plus) seguindo os protocolos de Silva Júnior (2009). Tal proteína purificada e dialisada foi diluída em tampão carbonato 50 mM e

pH 9,6 para a obtenção de uma solução com a concentração desejada. Em seguida, 100 µL da solução preparada foram utilizadas para sensibilizar cada poço, sendo a quantidade de proteína recombinante igual a 0,625µg/poço. A placa foi então incubada a 4 °C por cerca de 12 horas. Decorrido este período, a placa foi lavada três vezes com PBS contendo TWEEN 20 (PBST - NaCl 0,9 %; Tween-20 a 0,05 %; tampão fosfato 50 mM e pH 7,4). Posteriormente, 100 µL do tampão de bloqueio (caseína 3% diluída em PBS) foram adicionados a cada poço, permanecendo por 90 minutos sob agitação à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas com 100 µL/poço de amostras de soro diluídas 1/400 em solução de PBS contendo BSA a 1%, sendo cada amostra feita em duplicata. Após nova lavagem com PBS-T, a placa foi incubada com 100 µL/poço de anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase - Upstate) devidamente diluído (1:20.000) e 100 µL foram adicionados a cada poço e a placa incubada a 37°C por 1 hora. Finalmente, a placa foi lavada seis vezes com PBS-T e 100 µL da solução que continha o substrato (tampão citrato fosfato 100 mM, pH 6,0, 4mg de O.P.D. fenildiaminobenzeno e 2,5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes) foram adicionados em cada poço, sendo a placa incubada por um período de 15 minutos em local escuro. A reação foi paralisada adicionando-se 50 µL de solução de ácido sulfúrico 1:20 e a leitura realizada em leitor de placa a 492 nm. O quadro 4 demonstra as amostras de soro enviadas para o teste de ELISA indireto.

Granja	Identificação do animal	Espécie
A	3	RR
A	4	MM
B	2	MM
B	3	MM
B	1	RR
C	5	MM
C	5	MM
C	1	MM
C	3	RR

**Quadro 4.** Amostras de soro dos camundongos capturados enviadas para ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-PCV2.

#### 4.5. Nested PCR

As amostras de tecidos foram coletadas e submetidas ao teste de nested PCR. O DNA total das amostras foi extraído pelo Kit “Wizard® DNA Purification” (Promega, USA) seguindo instruções do fabricante. O quadro 5 mostra as amostras de tecidos utilizadas para nested PCR.

Granja	Identificação do animal	Espécie		Órgãos						
		RR	MM	Cor.	Fíg.	LM	LP	Rim	Pulmão	Baço
A	3	x		x	x	x		x	x	x
A	4		x	x	x	x		x	x	x
B	1		x	x	x	x		x	x	x
B	3		x	x	x			x	x	x
B	4	x		x	x	x	x	x	x	x
C	8	x		x	x	x		x	x	x
C	5		x	x	x	x		x	x	x
C	2		x	x	x	x	x	x	x	x
C	3	x		x	x		x	x	x	x
D	1	x		x	x	x		x	x	x
D	3	x		x	x			x	x	x
D	2	x		x	x	x		x	x	x
D	7		x	x	x			x	x	x
D	9		x	x	x			x	x	x
D	5		x	x	x			x	x	x
D	8		x	x	x				x	x
D	4		x	x	x			x		x
D	6		x	x	x			x	x	x
E	10	x					x			x
E	4	x					x			x
E	12	x					x			x
E	7	x					x			x
E	5	x					x			x
E	11	x					x			x
Totais	24	13	11	18	18	9	9	17	17	24

**Quadro 5.** Amostras de tecidos das espécies *Rattus rattus* (RR) e *Mus musculus* (LM) enviadas para o teste de nested PCR: (LM) linfonodo mediastínico, (LP): linfonodo poplíteo, (Cor): Coração, (Fíg): Fígado.

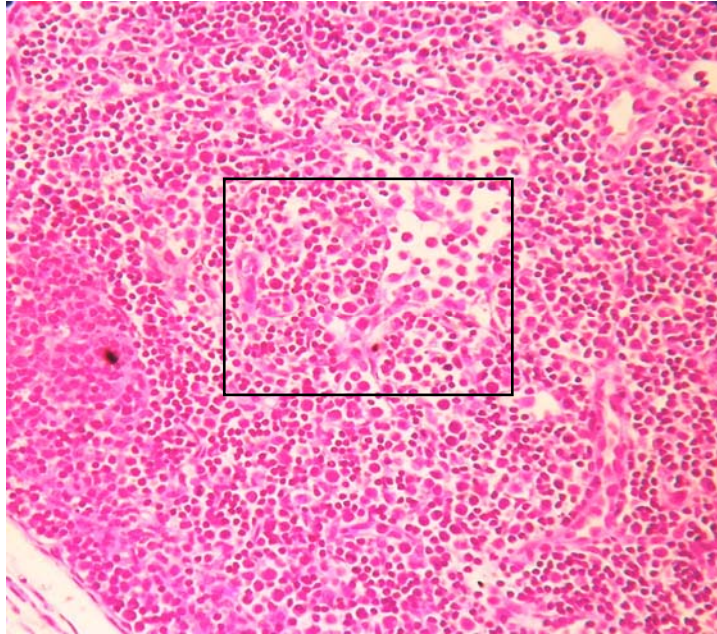
Para a amplificação dos dois genótipos, PCV2a e PCV2b, foram utilizados um conjunto de oligonucleotídeos descritos previamente por Lyoo et al. (2008). Os oligonucleotídeos anti-senso anelam na porção nucleotídica mais heterogênea entre os dois genótipos, enquanto que os oligonucleotídeos senso anelam em porções diferentes do genoma viral para garantir que os produtos de PCR possuam tamanhos diferentes. O par de oligonucleotídeos específicos 2a-F (5'-ACAATCCACGGAGGAAGG-3') e 2a-R (5'-GGGACCAACAAAATCTCY-3')

amplificam um produto de 568pb. Já o par de oligonucleotídeos específicos 2b-F (5'-CTGTTTTTCGAACGCAGTG-3') e 2b-R (5'-CTCAAACCCCGCTCTG-3') amplificam um produto de 360pb. A primeira série de reações foi realizada com os oligonucleotídeos VF-2 (5'-GAAGAATGGAAGAAGCGG-3') e Nest-R (5'-ACAGTCAGAACGCCCTCCT-3'). As amplificações foram realizadas em um volume final de 25µL. A mistura de reação foi constituída de 1,0 U de 2 µL de DNA molde, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 10 µL Go Taq Master Mix (Promega, USA). A amplificação de DNA foi realizada a partir de 30 ciclos de 94° C por 30 seg., 54° C por 30 seg. e 72° C por 40 seg.

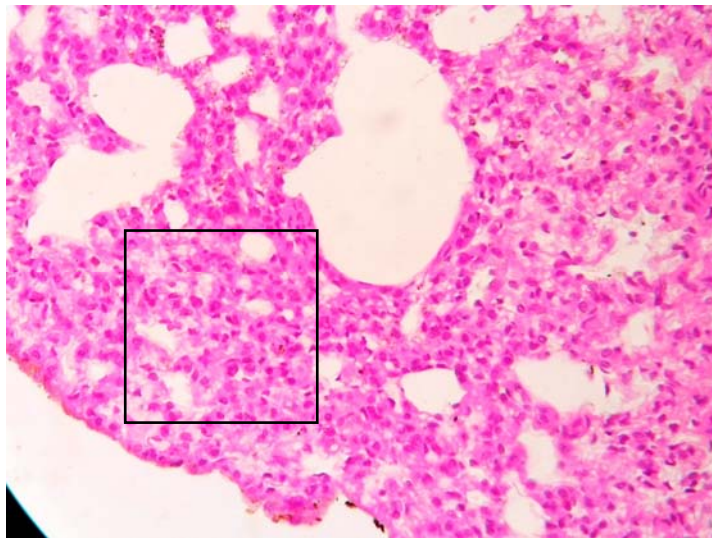
Para o nested PCR diferencial, o produto amplificado na primeira série de reações foi utilizado com cada par de oligonucleotídeos específicos (2a-F/2a-R e 2b-F/2b-R) em tubos separados. Um µL do primeiro produto de amplificação foi adicionado a uma nova mistura de reação constituída de 10 µL Go Taq Master Mix (Promega, USA) e 20 pmol de cada oligonucleotídeo. Os passos da nested PCR para ambos os grupos foram realizados a partir de 30 ciclos de 94° C por 30 seg., 57° C por 30 seg. e 72° C por 30 seg. Os produtos de PCR amplificados foram analisados em gel de agarose 1% e visualizados por luz ultravioleta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostras de tecidos e soro dos animais das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus* foram submetidas a análises histopatológicas, sorológicas e moleculares. Os resultados da avaliação histopatológica demonstram em algumas das amostras de pulmão uma pneumonia intersticial linfocítica e neutrofílica, focalmente extensiva e leve. As amostras possuem leve grau de autólise, porém ainda é possível identificar alterações histopatológicas compatíveis com as lesões de suínos acometidos por infecção por PCV2 (Segales et al., 2004) e em camundongos kunming citadas por Li et al. (2010). As alterações histopatológicas compatíveis com a infecção pelo PCV2 foram observadas em algumas amostras de tecido pulmonar e em linfonodos de um animal. Estes cortes histológicos mostram áreas de rarefação do número de linfócitos e leve histiocitose, porém ainda muito incipiente para classificar como depleção linfóide (figura 6). As lâminas de pulmão, mesmo com leve grau de autólise, ainda sugerem uma pneumonia intersticial linfocítica e neutrofílica (figura 7).



**Figura 6.** Corte histológico de linfonodo destacando uma leve rarefação linfocitária. Espécie *Mus musculus*, animal 1, propriedade “B” (segundo quadro 3). Aumento de 40X.



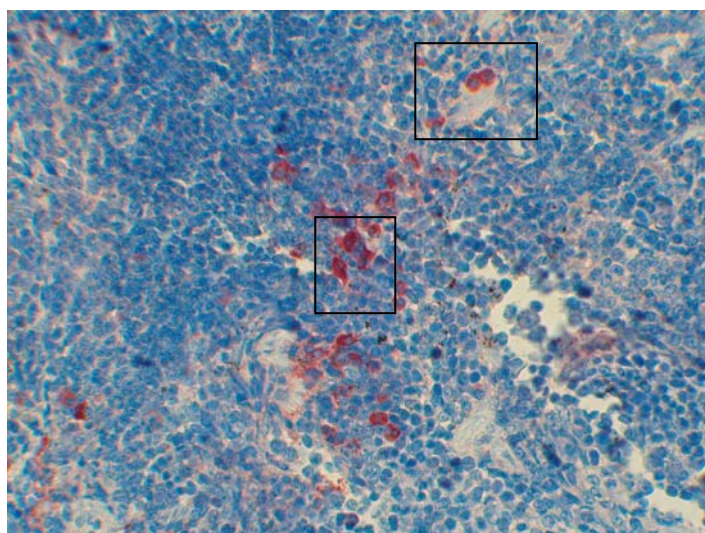
**Figura 7.** Corte histológico de pulmão destacando uma leve pneumonia intersticial linfocítica e focalmente extensiva. Espécie *Rattus rattus*, propriedade “B”, animal 4 (segundo quadro 3). Aumento de 100X.

O quadro 6 mostra que algumas alterações histopatológicas compatíveis com a infecção pelo PCV2 em suínos foram achadas em camundongos. Em paralelo, a detecção do antígeno viral foi demonstrada pela imunohistoquímica. As informações cruzadas de histopatologia e imunohistoquímica demonstram marcações para antígeno viral em amostras de tecidos com alterações histopatológicas compatíveis para animais acometidos pelo PCV2.

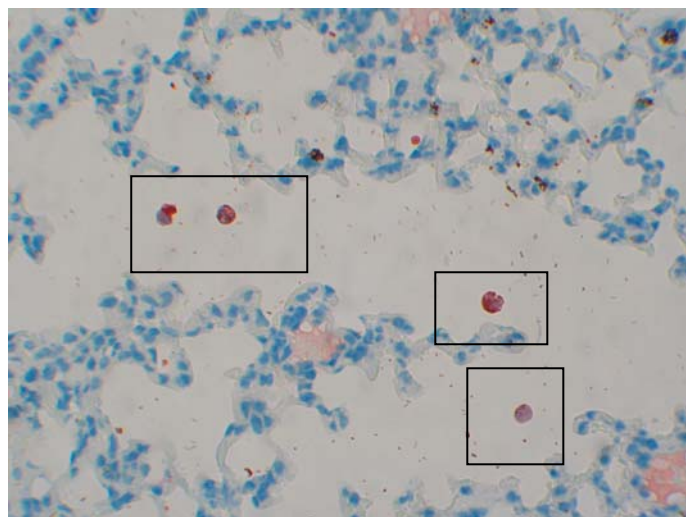
Granja	Identificação do animal	Espécie	Órgãos com alterações histopatológicas				Órgãos com marcação para imunohistoquímica			
			LM	Rim	Pulmão	Baço	LM	Rim	Pulmão	Baço
A	3	RR			X			-	+	+
A	4	MM			X			-	+	++
B	1	MM	X					-	++	+++
B	3	MM			X				++	+
B	4	RR			X					
C	8	RR								
C	5	MM						-	-	-
C	2	MM						+		-
C	3	RR								
D	1	RR						+	++	++
D	3	RR			X				++	
D	2	RR			X			-	++	++
D	7	MM			X			-	+	+++
D	9	MM							-	++
D	5	MM								
D	8	MM			X			+	+++	++
D	4	MM						-		

**Quadro 6.** Resultados da avaliação histopatológica e de marcação para a imunohistoquímica. Resultados da avaliação histológica: (x) presença de alterações, ( ) não realizado, (inc) presença de corpúsculo de inclusão. Resultados de imunohistoquímica: (-) não foi encontrada marcação, (+) marcação leve, (++) marcação moderada e (+++) marcação acentuada.

Os achados histopatológicos e as marcações encontrados na imunohistoquímica (figura 8 e 9) são compatíveis com os trabalhos de Li et al. (2010) e Kiupel et al (2005).



**Figura 8** - Marcação obtida pela técnica de imunohistoquímica. Tecido: Baço de camundongo da espécie *Mus musculus*. Os retângulos realçam segmentos marcados pelo anticorpo secundário marcado com peroxidase em macrófagos. Aumento de 40X.



**Figura 9** - Marcação obtida pela técnica de imunohistoquímica. Tecido: Pulmão de camundongo da espécie *Mus Musculus*. Pontos de marcação realçados em retângulos (macrófagos alveolares). Aumento de 100X.

No entanto, esses autores observaram soroconversão em animais experimentalmente infectados com o PCV2. O quadro 7 expõe em paralelo a densidade óptica obtida nas amostras, o controle positivo e negativo e os resultados para IHC e PCR.

Granja	Animal	Espécie	Densidade Óptica (OD)		Resultado ELISA	Resultado IHC/PCR
			Prova 1	Prova 2		
A	3	RR	0,067	0,062	(-)	+
A	4	MM	0,07	0,064	(-)	+
B	2	MM	0,06	0,058	(-)	ND
B	3	MM	0,067	0,069	(-)	+
B	1	RR	0,08	0,07	(-)	+
C	8	RR	0,092	0,094	(-)	+
C	5	MM	0,09	0,086	(-)	-
C	1	MM	0,081	0,094	(-)	ND
C	3	RR	0,085	0,081	(-)	+
C +			0,808	0,768	(+)	ND
C -			0,078	0,089	(-)	ND

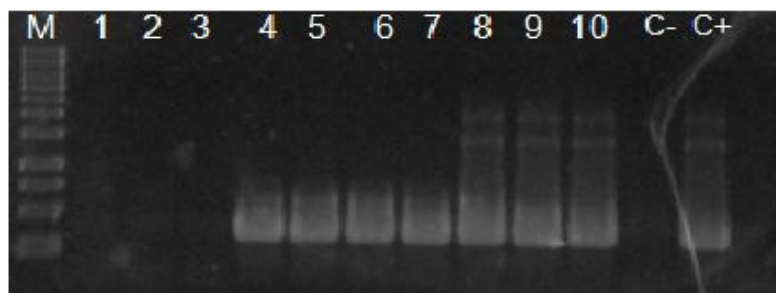
**Quadro 7.** Resultados de densidade óptica (OD) obtidos com amostras de soro de camundongos peridomésticos das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus* pela técnica de ELISA segundo Fausto (2010). Controle positivo (C+), controle negativo (C-).

Por outro lado, a soroconversão não foi observada por Opriessing et al. (2009) em camundongos também infectados experimentalmente. No presente trabalho, para realização e interpretação dos resultados de ELISA foi utilizada a padronização e dados gerados pelos estudos de Fausto, 2010. Todas as amostras analisadas foram consideradas negativas segundo os parâmetros de densidade óptica (DO)

utilizados. Todas as amostras foram analisadas em duas provas (1 e 2). Tal resultado pode gerar erros quanto ao perfil sorológico de uma população de roedores, pois foram realizados com pequeno número de amostras de soro, devido às dificuldades de coleta. Outra possibilidade a ser considerada na espécie *Ratus ratus* é a falta de reconhecimento do anticorpo secundário utilizado, uma vez que este foi preparado para a reação de especificidade em camundongos (anti-IgG). Além disso, os achados de sorologia em camundongos variam na literatura. Li et al., (2010) inoculou camundongos Kunming e observou que existia uma relação entre a carga viral inoculada, títulos de anticorpos, início das lesões e o tempo após inoculação. O que não é aplicável a animais de vida selvagem, onde não se pode conhecer a carga viral infectante e quando ela ocorreu. Assim, como a população de roedores na natureza varia em idade, pode-se inferir que resultados sorológicos positivos e negativos sejam achados para o PCV2. Um maior número de amostras de soro dos animais capturados poderia elucidar melhor esse aspecto.

Lorincz et al (2010) evidenciou a presença do DNA viral em camundongos e ratos por meio da técnica de nested PCR, além de não encontrar resultados positivos para o mesmo teste em roedores que não tiveram contato direto com suínos, mais afastados das propriedades rurais. Esses trabalhos sugerem uma infecção natural em animais peridomésticos que tem acesso às instalações onde são criados suínos. Oito animais dos 24 analisados (33,33%) nas diferentes granjas coletadas foram positivos. Os resultados obtidos pela nested PCR das amostras dos animais capturados (Figura 10 – resultados de parte das amostras) vão de acordo com os achados por Lorincz et al. (2010) e Li et al. (2010).

Alguns estudos têm mostrado que o vírus isolado de animais com PMWS seria classificado no genótipo 2B (grupo 1), enquanto os vírus isolados de animais saudáveis seriam classificados no genótipo 2A (grupo 2) (Grau-Roma et al, 2008; Chiarelli-Neto et al, 2009). As amostras de roedores do presente estudo foram testadas, a fim de classificar as variantes virais pela Nested-PCR previamente descrito por Lyoo et al. (2008). Apenas o genótipo 2B foi encontrado nestas amostras, fato que pode contribuir e potencializar as manifestações da infecção patogênica em suínos, considerando a hipótese de transmissão viral de roedores para suínos.



**Figura 10** – Eletroforese em gel de agarose de produtos de Nested PCR . M: marcador de tamanho molecular (Promega, USA). C+: controle positivo. C-: controle negativo. 1 e 2: amostras negativas. 4-10: amostras positivas (baço, pulmão e rim). Tamanho da banda 360 pb: entre a última e penúltima banda do padrão molecular.

Somente duas amostras foram positivas para os dois testes, porém algumas amostras sofreram degradação do DNA total o que possibilita resultados falsos negativos pelo nested PCR.

O quadro 08 apresenta as informações de resultados do nested PCR e imunohistoquímica.

Granja	# animal	Espécie	Avaliação dos resultados Imunohistoquímica x Nested PCR				
			Rim	Pulmão	Baço	Fígado	Coração
A	3	RR	-	+	+		
A	4	MM	-	+	++		
B	1	MM	-	++	+++		
B	3	MM		++	+		
B	4	RR					
C	8	RR					
C	5	MM	-	-	-		
C	2	MM	+		-		
C	3	RR					
D	1	RR	+	++	++		
D	3	RR		++			
D	2	RR	-	++	++		
D	7	MM	-	+	+++		
D	9	MM		-	++		
D	5	MM					
D	8	MM	+	+++	++		
D	4	MM	-				

**Quadro 8.** Resultados obtidos nas técnicas de nested PCR e imunohistoquímica em amostras de tecidos das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus*. Resultados de imunohistoquímica: (-) não foi encontrada marcação, (+) marcação leve, (++) marcação moderada e (+++) marcação acentuada. As amostras positivas para nested PCR estão em cinza.

Considerando esses resultados em frente a hipótese levantada e o objetivo deste trabalho de investigar a ocorrência da infecção em camundongos capturados em propriedades suínolas, a comparação entre as técnicas não foi objeto principal desse estudo. A presença de resultados positivos em órgãos dos animais estudados para as técnicas comprovam a infecção pelo PCV2 nos roedores capturados.

A infecção natural em roedores peridomésticos abre a discussão sobre a participação desses animais na epidemiologia das PCVAD, pois eles poderiam participar como vetores ou veículos na transmissão viral aos suínos susceptíveis.

A infecção experimental por PCV2 em camundongos têm sido descrita na tentativa de se encontrar modelos experimentais para estudar a patogenia, lesões e curso da infecção (Kiupel et al., 2001 e 2005; Cságola et al., 2008). Camundongos da espécie *Mus musculus* (grupos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ) foram infectados experimentalmente por Opriessning et al (2009). O autor conclui que existem limitações para o uso dessa espécie como modelo para entender a patogênese do PCV2, no entanto sugere grande importância na epidemiologia do vírus. Seo et. al. (2008) descreveram e detectaram a infecção do PCV2 em ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Apodemus agrarius ningpoensis*) capturados próximos a granjas de suínos. Li et. al, (2010) demonstrou que camundongos “Kunming” poderiam ser experimentalmente infectados pelo PCV2 em virtude das lesões e soroconversão encontradas nesses roedores.

A dificuldade técnica em se obter suínos gnotobióticos ou SPF para o PCV2, inviabiliza a confirmação científica sobre a transmissão do vírus dos roedores estudados aos suínos. Devida á transmissão intrauterina comentada anteriormente, os suínos neonatos já apresentam a infecção pelo vírus. Tal fato é agravado pelo fato de que a infecção pelo PCV2 por si só, pode não gerar os quadros clínicos das PCVAD. No entanto, a replicação viral foi constatada pelos resultados do nested PCR e imunohistoquímica vão de acordo com Cságola et al., (2008), que infectaram experimentalmente camundongos pelas vias intraperitoneal e oral e demonstrou a transmissão horizontal entre os camundongos. Mais trabalhos, no entanto, são necessários a respeito da transmissão do PCV2 de roedores peridomésticos aos suínos. As lesões histopatológicas nos órgãos destes animais em associação com a identificação do PCV2 por imunohistoquímica ou nested PCR reforçam um quadro de infecção produtiva nestes animais.

Neste trabalho, portanto, foram encontradas evidências do potencial papel de roedores peridomésticos na dispersão e manutenção do PCV2.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam a infecção pelo PCV2 em roedores peridomésticos das espécies *Mus musculus* e *Rattus rattus* capturados em granjas produtoras de suínos do Estado de Minas Gerais, Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albina, E., Truong, C., Hutet, E., Blanchard, P., Cariolet, R., L'Hospitalier, R., Mahe, D., Allee, C., Morvan, H., Amenna, N., Le Dimna, M., Madec, F. and Jestin, A. An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J. Comp. Pathol.*, 125(4), 292-303, 2001.
- Allan, G.M., Ellis, J.A. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3-14, 2000.
- Allan GM, McNeilly F, McNair I, Curran MD, Walker I, Ellis J, Konoby C, Kennedy S, Meehan B. Absence of evidence for porcine circovirus type 2 in cattle and humans, and lack of seroconversion or lesions in experimentally infected sheep. *Arch. Virol.* 145:853-857, 2000.
- Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J., Meehan, B.M., Adair, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121, 1-11, 1999.
- Allan, G.M., McNeilly, F., Foster, J.C., Adair, B.M., Infection of leucocyte cell cultures derived from different species with pig circovirus. *Vet. Microbiol.* 41, 267-279, 1994a.
- Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (Abipecs). Produtores de suínos apostam no mercado interno em 2011. In: [www.abipecs.org.br](http://www.abipecs.org.br). Acessado em setembro 2011.
- Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (Abipecs). Estatísticas. In: [www.abipecs.org.br](http://www.abipecs.org.br). Acessado em setembro 2011.
- Bassami, M.R., Berryman, D., Wilcox, G.E., Raidal, S.R. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249, 453-459, 1998.
- Bolin, S.R., Stoffengen, W.C., Nayar, G.P., Hamel, A.L. 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, 2001.
- Chae, J. S., Choi, K. S. Proinflammatory cytokine expression in the lung of pigs with porcine circovirus type 2-associated respiratory disease. *Res. Veterinary Science*, 90 (2), 321-323, 2011.
- Clark, E.G.. Post-weaning wasting syndrome. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, 28, 499-501, 1997.
- Chang, H.W., Jeng, C.R., Lin, T.L., Liu, J.J., Chiou, M.T., Tsai, Y.C., Chia, M.Y., Jan, T.R., Pang, V.F. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by *in vitro* inoculation. *Vet. Immunol Immunopathol*, 110, 207-219, 2006.
- Chang, H.W., Jeng, C.R., Liu, J.J., Lin, T.L., Chang, C.C., Chia, M.Y., Tsai, Y.C., Pang, V.F. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

- (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet. Microbiol.*, 108, 167-177, 2005.
- Chiarelli-Neto, O., Yotoko, K.S.C., Vidigal, P.M.P., Silva, F.M.F., Castro, L.A., Fietto, J.L.R., Silva Jr., A., Almeida, M.R. Classification and putative origins of Brazilian porcine circovirus 2 inferred through phylogenetic and phylogeographical approaches. *Virus Research*, 140 (1-2), 57-63, 2009.
- Choi, C., Chae, C. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.*, 123, 302-305, 2000.
- Choi, C., Chae, C. 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, 2001.
- Ciacchi-Zanella, J.R. Circovirose suína – Reflexos e ações. In: VII Simpósio Goiano de Avicultura e II Simpósio Goiano de Suinocultura – Avesui Centro-Oeste. ANAIS. Goiânia, GO, 2005.
- Ellis, J.A., Wiseman B.M., Allan, G., Konoby C., Krakowka, S., Meehan, B.M., McNeilly, F. Analysis of seroconversion to porcine circovirus 2 among veterinarians from the United States and Canada. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 217, 1645-1646, 2000.
- Fausto, M.C. Padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para sorologia, detecção e quantificação do circovírus suíno 2. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng X.J. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV-2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV-1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J. Virol.*, 78, 6297-6303, 2004.
- Fernandes, L.T., Ciacchi-Zanella, J.R., Sobestiansky, J., Schiochet, M.F., Trombetta, C. Experimental coinfection of SPF pigs with porcine circovirus type 2 isolated in Brazil and porcine parvovirus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58 (1), 1-8, 2006.
- Gava, D., Zanella, E.L., Morés, N., Ciacchi-Zanella, J.R. Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. *Pesq. Vet. Bras.*, 28, 70-76, 2008.
- Girard, C., Morin, M., Elazhary, Y. Experimentally induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia. *Vet. Rec.*, 130, 206-207, 1992.
- Gnagon, C.A., Music, N., Fontaine, G., Tremblay, D., Harel, Josée. Emergence of a new type of porcine circovirus in swine (PCV): A type 1 and a type 2 PCV recombinant. *Veterinary Microb.*, 144 (1-2), 18-23, 2010.
- Grau-Roma, L., Crisci, E., Sibila, M., Lopez-Soria, S., Nofrarias. M. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, 128, 23-35, 2008.

- Grau-Roma, L., Fraile, L., Segalés, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by *porcine circovirus* type 2. *The Veterinary Journal*, 187, 23-32, 2011.
- Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.*, 72, 5262-5267, 1998.
- Harding, J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract. 27th Annu. Meet.*, 503, 1997.
- Harding, J.C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet. Microbiol.*, 98, 131-135, 2004.
- Harding, J.C., Clark, E.G., Strokappe, J.H., Willson, P.I., Ellis, J.A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod.*, 6, 249-254, 1998.
- Hattermann, K., Roedner, C., Schmitt, C., Finsterbusch, T., Steinfeldt, T., Mankertz, A. Infection studies on human cell lines with Porcine circovirus type 1 and Porcine circovirus type 2. *Xenotransplantation*, 11, 284–294, 2004.
- Josephson, G., Charbonneau, G. Case report of reproductive problems in a new startup operation. *Journal of Swine Health and Production*, 9, 258-259, 2001.
- Juhan, N.M, Leroith, T., Opriessning, T., Meng, X.J. The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type 2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. *Virus research*, 147, 60-65, 2010.
- Kamstrup, S., Barfoed, A.M., Frimann, T.H., Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Botner, A. Immunisation against PCV2 structural protein by DNA vaccination of mice. *Vaccine*, 22, 1358-1361, 2004.
- Karuppanan, A.K., Jong, M.H., Lee, S.H., Zhu, Y., Selvaraj, M., Lau, J., Jia, Q., Kwang, J. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. *Virology*, 383(2), 338-347, 2009.
- Kim, J., Jung, K., Chae, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet. Rec.*, 155, 489-492, 2004.
- Kiupel, M., Stevenson, G.W., Choi, J., Latimer, K.S., Kanitz, C.L., Mittal, S.K. Viral replication and lesions in BALB/c mice experimentally inoculated with porcine circovirus isolated from a pig with postweaning multisystemic wasting disease. *Vet. Pathol.*, 38 (1), 74-82, 2001.
- Kiupel, M., Stevenson, G.W., Galbreath, E.J., North, A., HogenEsch, H., Mittal, S.K. Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes apoptosis in experimentally inoculated BALB/c mice. *Vet. Res.*, Oct 31, 1-7, 2005.
- Kristensen, C. S., Baadsgaard, N.P., Toft., N. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. *Preventive Veterinary Medicine*, 98 (4), 250-258, 2011.

- Ladekjaer-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., Storgaard, T., Botner, A., Allan, G., McNeilly, F. Transplacental infection with PCV-2 associated with reproductive failure in a gilt. *Vet. Rec.*, 148, 759-760, 2001.
- Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., Magar, R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods*, 80, 69-75, 1999.
- Larochelle, R., Magar, R., D'Allaire, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Journal of Vet. Res.*, 67, 114-120, 2003.
- Lorincz, M., Cságola A., Biksil, I., Szeredi, L., Dan, A., Tuboly, T. Detection of porcine circovirus in rodents - short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*, 58 (2), 265-268, 2010.
- Li, J., Yuan, X., Zhang, C., Miao, L., Wu, J., Shi, J., Xu, S., Cui, S., Wang, J., Ai, H. A mouse model to study infection against porcine circovirus type 2: viral distribution and lesions in mouse. *Virology Journal*, 7, 158, 2010.
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, 79, 8262-8274, 2005.
- Liu, J., Chen, I., Kwang, J. I. The ORF3 Protein of *Porcine circovirus* Type 2 Is Involved in Viral Pathogenesis *in Vivo*. *J. Virology*, 80, 5065-5073, 2006.
- Lyoo, K.S., Kim, H.B., Joo, H.S. Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of Porcine circovirus-2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 283-288, 2008.
- Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahé, D., Albina, E., Jesting, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Prod. Sci.*, 63, 223-233, 2000.
- Mankertz, A., Hattermann, K., Ehlers, B., Soike, D. Cloning and sequencing of columbid circovirus (coCV), a new circovirus from pigeons. *Arch. Virol.*, 145, 2469-2479, 2000.
- Mankertz, A., Buhk, H.J., Blaess, G., Mankertz, A. Transcription analysis of porcine circovirus (PCV). *Virus Genes* 16, 267-276, 1998.
- Manual de controle de roedores. FUNASA (2002), 130 p.
- Mateusen, B., Maes, D.G.D., Van Soom, A., Lefebvre, D., Nauwynck, H.J. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology*, 68, 896-901, 2007.
- Meehan, B.M., Creelan, J.L., McNulty, M.S., Todd, D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.*, 78 (1), 221-227, 1997.
- 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. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.*, 79 (9), 2171-2179, 1998.

- Morin, M., Girard, C., Elazhary, Y., Fajardo, R., Drolet, R., Lagacé, A. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *Can. Vet. J.*, 31, 837-839, 1990.
- Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2535-2541, 1998.
- Nayar, G.P., Hamel, A., Lin, L. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can. Vet. J.*, 38, 385-386, 1997.
- Normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV. Viçosa, 2006.
- O'Connor, B., Gauvreau, H., West, K., Bogdan, J., Ayroud, M., Clark, E.G., Konoby, C., Allan, G., Ellis, J.A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.*, 42, 551-553, 2001.
- Olvera, A., Cortey, M., Segales, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 385 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology*, 357, 175–185, 2007.
- Opriessnig, T., Fenaux, M., Thomas, P., Hoogland, M.J., Rothschild, M., Meng, X.J., Halbur, P.G. Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type 2-associated disease and lesions. *Vet. Pathol.*, 43, 281-293, 2006.
- 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. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 14, 515-519, 2002.
- Pesch, S., Schmidt, U., Ohlinger, V.F. 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, 2000.
- Ramamoorthy, S., Meng, X.J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *An. H. Res. Rev.*, 2, 1-20, 2008.
- Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., Balasch, M., Rodriguez-Arriola, G.M., 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. Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 81, 37-44, 2001.
- Roppa, L. *Competition from South American Pork Production*, 2002.
- Segales, J., Domingo, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Vet. Q.*, 24, 109-124, 2002.
- Segales, J., Rosell, C., Domingo, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 98, 137-149, 2004.

- Silva, F. M., Silva Júnior, A., Vidigal, P. M. P., Oliveira, C.R., Viana, V.W., Silva, C.H., Vargas, M.I., Fietto, J.L., Almeida, M.R. Porcine Circovirus-2 Viral Load versus Lesions in Pigs: Perspectives for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome. *Journal of Comparative Pathology*, 144 (4), 296-302, 2011.
- Seo, T.W., Hahn, T.W., Kim, H.C., Yoon, B.I., Woo, C.U., Han, J.H. Detection of swine viral pathogens in the wild rodents and cats living around pig farms in Korea. *Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa*, 22-26, 2008.
- Sibila, M., López-Soria, S., Segalés, S., Nofrarías, M., Ramírez, H., Mínguez, A., Serrano, JM., Marín, O., Callén, A. PCV2 load dynamics in two PMWS affected farms with three different genetic lines. In: *Proc. Intern. Conf. "Animal Circoviruses and Associated Diseases"*, Belfast, UK, 39, 2005.
- Silva Júnior, A., Castro L, A., Chiarelli-Neto, O., Silva F.M., F., Vidigal P.M., P., Moraes M.P. Development and evaluation of a recombinant DNA vaccine candidate expressing porcine circovirus 2 structural protein. *Pesq. Vet. Bras.*, 29, 76-82, 2009.
- Smith, W.J., Thomson, J.R., Done, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Veterinary Record*, 132, 47, 1993.
- Thibault, S., Drolet, R., Germain, M.C., D-Allaire, S., Larochelle, R., Magar, R. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Veterinary Pathology*, 35, 108-116, 1998.
- Tisher, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virology*, 91, 271-276, 1986.
- 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. Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J. Anim. Sci.*, 87, 1582-1590, 2009a.
- Opriessnig, T., Patterson, A.R., Jones, D.E., Juhan, N.M., Meng, X.J., Halbur, P.G. Limited susceptibility of three different mouse (*Mus musculus*) lines to Porcine circovirus-2 infection and associated lesions. *Can. J. Vet. Res.*, 73 (2), 81-86, 2009.
- 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. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 530-532, 1999.
- Yu, S., Opriessnig, T., Kitikoon, P., Nilubol, D., Halbur, P.G., Thacker, E. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet. Immunology and Immunop.*, 115, 261-272, 2007.
- Zhou, J.Y., Chen, Q.X., Ye, J.X., Shen, H.G., Chen, T.F., Shang, S.B. Serological investigations and genomic characterization of PCV2 isolates from different geographic regions of Zhejiang province in China. *Vet. Res. Commun.*, 30, 205-220, 2006.