

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DIAGNÓSTICO DA CIRCOVIROSE SUÍNA EM CRIAÇÕES
INTENSIVAS NO ESTADO DE GOIÁS**

Tatyane Penha Sales
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA
2011

TATYANE PENHA SALES

**DIAGNÓSTICO DA CIRCOVIROSE SUÍNA EM CRIAÇÕES
INTENSIVAS NO ESTADO DE GOIÁS**

Dissertação apresentada para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal, junto à
Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás.

Área de concentração:
Patologia, clínica e cirurgia

Linha de pesquisa:
Patobiologia animal, experimental e comparada

Orientador:
Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo - EV/UFG

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Jurij Sobestiansky - EV/UFG
Prof^a. Dr^a. Moema Pacheco Chediak Matos - EV/UFG

GOIÂNIA
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

S163d Sales, Tatyane Penha.
Diagnóstico da circovirose suína em criações intensivas no Estado de Goiás [manuscrito] / Tatyane Penha Sales. - 2011.
64 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo; Co-orientadores: Prof. Dr. Jurij Sobestiansky; Prof^a. Dr^a. Moema Pacheco Chediak Matos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

Bibliografia.

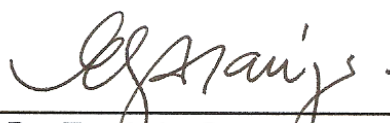
Inclui lista de figuras, abreviaturas e tabelas.

1. Circovirose – Diagnóstico. 2. Histopatológico. 3. PCR 3, PCV2. I. Título.

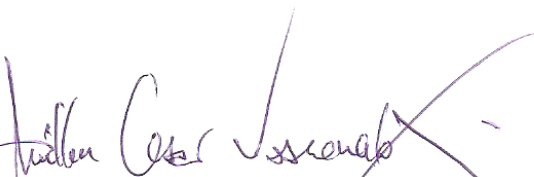
CDU: 619:636.4(817.3)

TATYANE PENHA SALES

Dissertação defendida e aprovada em **25/03/2011**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos - ICB/UFMG



Prof. Dra. Wília Marta Elsner D. de Brito

Dedico esse
trabalho aos meus pais Nilsom Sales França e
Ivoneide M. Silva e Sales, por todo apoio e
esforço dedicados à minha educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pela presença em minha vida.

Aos meus pais, pelo amor e por terem me dado condições de estudar e por isso ter várias conquistas na vida.

Aos meus irmãos e amigos, que sempre estiveram ao meu lado me dando força e apoio em todas as minhas decisões.

Ao Leandro Costa, pelo amor, confiança, companheirismo e paciência de estar ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, pelos ensinamentos, equilíbrio e confiança no meu trabalho.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Jurij Sobestiansky e Prof^a. Dr^a. Moema Pacheco Chediak Matos, pelos ensinamentos, ajuda nas coletas de materiais e palavras de conforto.

À Prof^a. Dr^a. Wília Marta Elsner Diederichsen de Brito, pelos ensinamentos, apoio e incentivo na pesquisa, pela amizade e palavras nas horas difíceis.

À Prof^a. Dr. Anilton Cesar Vasconcelos, por aceitar nosso convite de ser membro da banca e pelas sábias considerações.

À minha amiga e companheira trabalho Patrícia Soares, por tudo que passamos juntas, pela ajuda em todos os momentos da nossa pesquisa.

Aos meus amigos da patologia, Prof^a Ms Marina Pacheco Miguel e Hugo Henrique Ferreira, pela força e positividade e por me ajudar na execução do experimento, sem o qual não teria conseguido em tempo hábil.

À Prof^a Dr^a. Keili Maria Cardoso de Souza e à Duanne Alves da Silva, que me auxiliaram no aprendizado da técnica de PCR.

Aos veterinários de Marcos L. Lucena e Paulo Henrique Curado que ajudaram na identificação e no deslocamento até as granjas.

Aos suinocultores, que confiaram no nosso trabalho e cederam os animais deste experimento.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (CNPq/MAPA), pelo financiamento do projeto e a bolsa de estudos a mim concedida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Etiologia e resistência do PCV2	4
2.3 Epidemiologia.....	6
2.4 Patogenia	8
2.5 Manifestações clínicas	11
2.6 Lesões macroscópicas e microscópicas	12
2.7 Diagnóstico.....	13
2.8 Controle e profilaxia	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Região estudada	17
4.2 Colheita e conservação de materiais	19
4.3 Exame microscópico	19
4.4 Análise molecular	20
4.5 Identificação do PCV-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	21
4.5 Análises dos resultados.....	22
5. RESULTADOS	23
5.1 Sinais clínicos.....	23
5.2 Lesões macroscópicas.....	24
5.3 Lesões microscópicas	28
5.4 Análise molecular	32
6. DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mapa do estado de Goiás dividido em regiões e microrregiões. Pontos vermelhos marcam a localização das granjas estudadas. 17
- Figura 2: Fotografias de suínos com suspeita de circovirose. A- Suíno com 17 semanas com emagrecimento acentuado. B- Sinais de diarreia (setas). C e D – Alterações na pele..... 24
- Figura 3: Fotografias de pulmões de suínos com suspeita clínica de circovirose: A- pulmão com hepatização vermelha (setas), B- pulmão não colapsado, C- aderência de pulmão com pleura (seta), D- evidência do lóbulo cranial com hepatização e edemaciação (seta)..... 26
- Figura 4: Fotografia de achados de necropsia de suínos com suspeita clínica de circovirose: A- aderências de saco pericárdico (setas), pericardite fibrino-purulenta (estrela) e presença de exsudato sanguinolento no tórax (asterisco), B- rim: presença de petéquias (detalhe), C- linfonodo mediastínico edemaciado e hemorrágico, D- evidência de vasos do mesentério e aumento de volume dos linfonodos mesentéricos. 27
- Figura 5: Fotomicrografia pulmão e rim de suínos com suspeita de circovirose. A- Pneumonia intersticial difusa (10x H&E). B- pneumonia broncointersticial (40x H&E). C- Rim: degeneração de túbulos (100x H&E). D- Rim: Infiltrado linfo-histiocitário acentuado difuso (glomerulonefrite) (100x H&E). 30
- Figura 6: Fotomicrografia de fígado e linfonodo de suínos com suspeita de circovirose. A- Fígado: infiltrado mononuclear multifocal acentuado, com formação de células gigantes multinucleadas (seta) (H&E 10x). B- Fígado: infiltrado mononuclear (seta) e esteatose difusa (H&E 40x). Linfonodo: linfo-histiocitário. C- linfonodo: infiltrado mononuclear, presença de célula gigante (seta) (H&E 40x). D- Linfonodo com presença de infiltrado mononuclear multifocal (H&E 40x). 31
- Figura 7: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) de tecidos suínos coletados em granja B animal 8 do estado de Goiás. Da esquerda para a direita nas linhas: M, marcador molecular ladder 100pb (Ludwig); 1-controle negativo; 2-controle positivo; 3- fígado; 4-pulmão; 5-rim; 6-baço, linfonodos: 7-inguinal superficial, 8-mesentérico e 9-mediastínico; 10-tonsila, 11-intestino, e M marcador molecular ladder 100 pb. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de animais por granja, idade em semanas e fases de criação.	18
Tabela 2: Número e frequência da ocorrência dos principais sinais clínicos observados nos suínos com suspeita clínica de circovirose.	23
Tabela 3: Número e frequência das principais alterações macroscópicas observadas em suínos com suspeita clínica de circovirose.	25
Tabela 4: Principais lesões microscópicas e frequência observadas em pulmões, fígado e rim de suínos com suspeita clínica de circovirose.	29
Tabela 5: Número e frequência das principais lesões microscópicas observadas em tecidos linfoides de suínos com suspeita clínica de circovirose.	32
Tabela 6: Resultados reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) realizadas em diferentes órgãos de suínos estudados.	33
Tabela 7: Frequência de resultados positivos e negativos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) realizadas em diferentes órgãos dos suínos estudados.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
AGS	Associação Goiana de Suinocultores
BALT	Tecido linfóide associado aos brônquios
DCRS	Doença do complexo respiratório suíno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ORF	Quadros de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV	Circovírus suíno
PCV1	Circovírus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PPV	Parvovírus suíno
PRRSV	Vírus síndrome reprodutiva e respiratória suína
SDNS	Síndrome da dermatite e nefropatia suína
SMDS	Síndrome multissistêmica do definhamento suíno

RESUMO

A circovirose, causada por circovírus suíno tipo 2 (PCV2), tem se manifestado clinicamente como Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS), Síndrome Dermatite Nefropatia dos Suínos (SDNS) e outras doenças que cursam com sintomas reprodutivos, pneumônicos e entéricos. Essas doenças são consideradas emergentes e de significativo impacto econômico na suinocultura. O objetivo deste estudo foi identificar o PCV2, caracterizar alterações macroscópicas e microscópicas em animais com suspeita clínica de circovirose em rebanhos suínos criados de forma intensiva no estado de Goiás. Para isso, foram identificadas seis propriedades e 20 animais com suspeita clínica. Esses animais foram submetidos à eutanásia e necropsia na qual foram identificadas alterações macroscópicas e colhidos baço, rim, pulmão, fígado e linfonodos para exames histopatológico e identificação do agente por PCR. Foram observados achados microscópicos compatíveis com os já descritos para a circovirose. Foi identificado o DNA do PCV2 em todos os animais testados advindos de granjas de sistema intensivo de produção do estado de Goiás. Entretanto, quando comparado com as lesões macroscópicas, em apenas 16 dos 20 suínos foi identificada a doença clínica.

Palavras chaves: histopatológico, PCR, PCV2;

ABSTRACT

Circovirosis, a disease associated to porcine circovirus 2 (PCV2), has been clinically reported as postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) and other diseases presenting reproductive, respiratory and digestive clinical manifestations. Such diseases are considered emergent and economically important for the pig industry. This study aimed to identify the agent and characterize the clinical, gross and microscopic changes of circovirosis in pig intensive production farms in the state of Goiás, Brazil. For that purpose, 20 pigs with clinical signs of circovirosis from six farms were used. After clinical examination, the pigs were slaughtered, submitted to gross inspection and samples from the spleen, kidneys, lungs, liver and lymph nodes were collected for microscopic analysis and PCV2 identification by PCR. Microscopic changes typical of PCV2 infection were found. PCV2 DNA was identified in all tested animals; however, when compared to clinical signs and gross findings data, only 16 of 20 pigs showed signs of circovirosis. Taken together, the data may support a routine protocol of circovirosis identification and prevention in the state of Goiás.

Keywords: Histopathological, PCV2; PCR

1. INTRODUÇÃO

O comércio internacional de carne suína movimenta 5,4 milhões de toneladas e gera uma receita anual aproximada de 12 bilhões de dólares. Está concentrado em cinco países importadores: Japão, Federação Russa, México, Coreia do Sul e China (Hong Kong). Os Estados Unidos, a União Europeia, o Canadá, o Brasil e a China são responsáveis por 96% das exportações mundiais. O principal destaque dos últimos anos é o desempenho das vendas externas brasileiras que, em dez anos, ampliaram sua participação nas exportações mundiais de 4% para 11%. Mesmo com as barreiras sanitárias, com o aumento dos subsídios europeus e o crescimento da concorrência internacional, as exportações brasileiras cresceram acima da média dos competidores (ABIEPCS, 2010).

O aumento da renda interna do país, o crescimento da população e das exportações são os três principais fatores que têm garantido uma sólida base de expansão da cadeia produtiva. A produção brasileira aumentou nos últimos cinco anos mais de 20%. No período, a produção industrial de suínos foi a que mais se ampliou (36,7%), enquanto a produção de subsistência, destinada ao consumo interno nas propriedades, as quais eventualmente vendem algum excedente, registrou queda de -34,1%, indicando que a atividade suinícola no país está em rápido processo de profissionalização (ABIEPCS, 2010).

Na região Centro-Oeste, especialmente nos Estados de Goiás e Mato Grosso, houve nos últimos anos um incremento na produção de suínos com conseqüente aumento de sua expressão no cenário nacional, com investimentos de empresas nacionais e multinacionais (GIROTTI, 2003). A suinocultura goiana, que conta com 64% de produtores integrados a indústrias e 36% independentes, ocupa a sétima posição no ranking nacional na produção de suínos, com 80 mil matrizes, contabilizando, um total de 35 mil toneladas de carne exportada e 1,6 milhões de animais abatidos em 2009 (KAMOGAWA, 2009).

A suinocultura, moderna, intensiva e confinada, caracteriza-se pelo aumento no tamanho dos sistemas de produção e conseqüentemente aumento da densidade animal em determinadas áreas geográficas. Paralelamente a essa

modernização e a intensificação da atividade houve mudança do perfil sanitário, pois tal situação é ideal para a disseminação, manutenção de agentes patogênicos e ocorrência de surtos de enfermidades que acarretam prejuízos econômicos. Além disso, a intensificação do comércio de animais e seus produtos e a movimentação de animais de uma região para outra, representam riscos para a propagação de agentes infecciosos e doenças transmissíveis (SOBESTIANSKY, 2002).

A circovirose suína, uma enfermidade multifatorial, que causa queda da imunidade nos animais afetados, está bastante difundida na suinocultura mundial e brasileira e é considerada a maior causa de refugagem em rebanhos suínos (ALLAN, 2007; CIACCI-ZANELLA & MORÉS, 2003; CHAE, 2004). O circovírus suíno tem sido associado a diversas síndromes e manifestações clínicas, tais como a síndrome de dermatite e nefropatia dos suínos (SDNS) (ALLAN et al., 2000; ROSELL et al., 2000; CHAE, 2005), a falhas reprodutivas (WEST et al., 1999; KIM & CHAE et al., 2004), enterite (KIM et al., 2004a; JENSEN et al., 2006), doenças do complexo respiratório dos suínos (DCRS) (KIM et al., 2003b; ELLIS et al., 1999), pneumonia proliferativa necrosante (DROLET et al., 2003; GRAU-ROMA & SEGALÉS, 2007) e a síndrome multissistêmica do definhamento suíno (SMDS) que representa maior impacto econômico (ELLIS et al., 1998).

As perdas econômicas com a circovirose são expressivas e estão relacionadas não só com mortes e gastos com medicamentos, mas com a diminuição dos coeficientes de crescimento, declínio na conversão alimentar e refugagem de suínos debilitados.

Na Europa, o custo da SMDS em uma propriedade foi estimado em aproximadamente 10 euros por suíno comercializado (CIACCI-ZANELLA & MORÉS, 2003). Os índices de mortalidade podem aumentar em cerca de 20% (HARDGE et al., 2003). O índice de conversão alimentar aumenta significativamente, havendo aumento do consumo de alimento de cerca de 60g/kg/animal e queda no ganho de peso de cerca de 1,7kg por suíno. O ganho econômico com a venda de animais sofre uma queda de 11,56 euros para 7,62 euros por animal e os gastos com serviços veterinários aumentam de 0,35 euros para 0,77 euros por suíno (CIACCI-ZANELLA & MORÉS, 2003).

No Brasil, ainda não foram realizados estudos pormenorizados que avaliem as perdas econômicas causadas pela circovirose. Estima-se que o prejuízo para as perdas decorrentes desta infecção foi acima de 33 milhões de reais em 2004, somente em uma integração do sul do Brasil (ZANELLA, 2005).

O vírus foi detectado pela primeira vez no Brasil em 2000, no Estado de Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA et al., 2001). Posteriormente, foi descrito nos estados do Rio Grande do Sul (PESCADOR et al., 2003), Paraná, São Paulo (CASTRO et al., 2003), Rio de Janeiro (FRANÇA et al., 2005), Espírito Santo (CHIARELLI-NETO et al., 2005), Minas Gerais (PINTO et al., 2003; BARBOSA et al., 2005) e Bahia (CHIARELLI-NETO et al., 2007). Entretanto, em estudo retrospectivo de tecidos de suínos estocados em blocos de parafina, o PCV2 foi identificado no país desde 1988, o que fica claro que o PCV2 está presente há algum tempo, mas só a partir do 2000 a SMDS e a SDNS apresentaram-se de forma clinicamente evidente (CIACCI-ZANELLA et al., 2006).

Em Goiás, a evidências clínicas sugere que o vírus pode ter estado envolvido em surtos de mortalidade de suínos em 2002 (ARAÚJO et al., 2002). Em 2009, identificou-se o PCV2 em suínos de criações extensivas de Goiás não devidamente diagnosticados (BARTHASSON, 2009). Assim, visa-se com este estudo conhecer a possível infecção pelo PCV-2 em amostras clínicas provenientes de criações intensivas de suínos em Goiás, caracterizando as formas clínicas que a doença se apresenta no estado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia e resistência do PCV2

O circovírus suíno (*porcine circovirus* - PCV) foi identificado primeiramente por TISCHER et al. (1974) com a utilização de microscopia eletrônica. Os autores descreveram um vírus morfolologicamente semelhante a um picornavírus, que causava infecções persistentes em cultivo celular de rim suíno (PK-15) sem induzir efeito citopático, sendo considerado não-patogênico por TISCHER et al., (1986). Posteriormente, uma variante de PCV foi isolada de suínos com a síndrome da refugagem multissistêmica (ALLAN et al., 1998) que já havia sido descrita em 1991 no Canadá (HARDING, 1996). Esta variante foi denominada PCV2 por ser filogeneticamente e sorologicamente distinta da contaminante cultura de células PK-15, denominado PCV1 (MEEHAN et al., 1998).

O PCV se caracteriza por ser pequeno, com aproximadamente 17nm de diâmetro, icosaédricos, circulares, não-envelopados (TISCHER et al., 1974). Possui um dos menores genomas entre os vírus que infectam vertebrados, com aproximadamente 1.760 nucleotídeos (TODD, 2000) e por ser o primeiro vírus animal a apresentar um genoma circular de DNA, um novo nome foi proposto e passou a constituir um novo gênero, denominado *Circovírus* (TISCHER et al., 1982; LUKERT et al. 1995). Posteriormente, o agente foi agregado a outros vírus de genoma circular pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral, em uma nova família de vírus DNA, denominada *Circoviridae* (LUKERT et al., 1995).

No genoma de PCV2 existem pelo menos três sequências abertas de leitura (ORFs) funcionais já estudadas: ORF1, ORF2 e ORF3. A ORF1 codifica uma proteína essencial para a replicação do DNA viral, a proteína Rep. A ORF2 codifica a proteína do capsídeo viral, chamada Cap (NAWAGITGUL et al., 2000) enquanto que a ORF3 é uma proteína não essencial para replicação, mas com importante participação na indução de apoptose (KARUPPANNAN et al., 2009; LIU et al., 2005). Um estudo comparativo realizado entra as três ORFs para identificação de regiões de

imunoreatividade identificou cinco áreas. Sendo que quatro delas foram observadas na ORF2 que podem apresentar variabilidade entre diferentes amostras virais analisadas. Estes resultados indicam a possibilidade de uso da ORF2 para elaboração de testes diagnósticos bem como a diferenciação entre amostras virais (KARUPPANNAN et al., 2009).

Estudos recentes demonstraram que a ORF3 tem envolvimento com a patogênese do vírus *in vivo*, servindo como um fator de ajuda na disseminação viral (LIU et al., 2006; KARUPPANNAN et al., 2009). A interação da ORF3 com uma proteína do hospedeiro denominada pPirh2 causa uma diminuição da degradação da p53, uma proteína supressor tumoral, levando a acumulação deste e consequente apoptose nas células infectadas pelo vírus (KARUPPANNAN et al., 2009).

Por meio de análise filogenética, o PCV2 foi classificado em dois subgrupos, também chamados de genótipos. Nomenclatura utilizada na América do Norte descreve os subgrupos em PCV-2a e PCV-2b, os quais eram classificados pela Comunidade Européia como PCV-2 do grupo 2 e PCV-2 do grupo 1, respectivamente. Recentemente, o consórcio para estudos sobre a circovirose suína da comunidade européia propôs o sistema de nomenclatura norte-americana como uma classificação padrão (GRAU-ROMA et al., 2008).

Investigações epidemiológicas dos surtos ocorridos no final da década de 90 na Europa e Sudeste Asiático e, em 2004-2005, nas Américas do Norte e do Sul sugerem que o genótipo 2a, potencialmente menos virulento, teria sido o genótipo mais freqüente durante muito tempo, representando os casos esporádicos da enfermidade ocorridos entre os anos de 1993 a 1996. O surgimento de um genótipo mais patogênico, presumidamente o genótipo 2b, poderia ter sido o responsável pela emergência dos surtos ocorridos entre 1997 e 2006 (DUPONT et al., 2008).

O genótipo PCV2b, atualmente, é mais prevalentes em infecções naturais (ALLAN et al., 2007; CHIARELLI-NETO et al., 2008; DUPONT et al., 2008; CORTEY et al., 2010). Os genótipos PCV2b e 2a têm sido associados com fazendas SMDS afetados e não afetados, respectivamente (GRAU-ROMA et al., 2008; WIEDERKEHR et al., 2009). Além disso, avaliação filogenética PCV2a sugere que é mais antigo em termos evolutivos, que PCV2b (GRAU-ROMA et al., 2008).

Curiosamente só PCV2a foi identificado na Austrália, onde SMDS não tem sido relatada (DUPONT et al., 2008). Recombinação entre os genótipos PCV2a e 2b tem sido relatada recentemente (HESSE et al., 2008).

Um estudo dinamarquês revelou a existência de um terceiro genótipo do PCV2. Detectado em amostras de suínos correspondentes aos anos de 1980, 1987 e 1990, o genótipo 2C apresentou a menor patogenicidade dentre os três genótipos conhecidos até o momento. Este fato sugere que houve um aumento gradativo da patogenicidade, desde os anos 80 até a atualidade, que segue a sequência genotípica 2c, 2a e 2b (DUPONT et al., 2008).

2.3 Epidemiologia

A infecção pelo PCV2 é ubíqua em suínos domésticos (ALLAN & ELLIS, 2000) e SMDS foi diagnosticada em todos os cinco continentes. Na Austrália, embora a presença de infecção viral tenha sido demonstrada, o país é considerado livre da SMDS (RAYE et al., 2005).

Os estudos retrospectivos demonstraram a infecção pelo PCV2 em suínos desde 1962 (JACOBSEN et al., 2009) e os achados histopatológicos característicos de lesões de circovirose em conjunto com o antígeno do PCV2 foram identificados em animais a partir de 1985 (JACOBSEN et al., 2009). No Brasil foi identificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) desde 1988 em estudo retrospectivo de tecidos de suínos estocados em blocos de parafina por CIACCI-ZANELLA et al., (2006).

A infecção por PCV2 tem sido descrita em todos os tipos de granjas, incluindo ciclo-completo e granjas multi-sítios. Os índices de morbidade e mortalidade são variáveis e dependem do tipo de granja, práticas de reprodução e de manejo e co-infecções presentes. Níveis esperados de morbidade são em torno de quatro a 30% e mortalidade varia de quatro a 20%. Tem sido relatado que animais com baixo peso ao nascimento e desmame e aqueles mais leves no começo da engorda tendem a desenvolver SMDS com maior frequência (SEGALÉS, 2008). Estudos

sorológicos no Brasil e em outros países indicaram que anticorpos contra PCV2 estão presentes na maioria dos rebanhos suínos e a maior parte dos animais se infecta ao redor da terceira e quarta semanas após o desmame (ZANELLA 2007).

Embora o PCV2 tenha capacidade de replicar e transmitir em camundongos (OPRIESSNIG et al., 2009a), espécies não-suínas não são susceptíveis ao PCV2 e não desempenham importância na sua epidemiologia. Em javalis, o PCV2 pode causar circovirose (ELLIS et al., 2003;), mas a importância epidemiológica nesta espécie também não está clara (VICENTE et al., 2004).

Acredita-se que a principal via de transmissão seja através do contato oronasal, e a infecção experimental por essa via já foi reproduzida (ELLIS et al., 1999). A detecção de PCV2 em secreção nasal, tonsilar, brônquica, urina e fezes levanta a hipótese de que o agente alui das secreções oronasais e também pode ser transmitido pelas fezes e urina (SEGALÉS & DOMINGO, 2002), o que indica a disseminação horizontal da doença (FERNANDES et al., 2003).

A associação do PCV2 com falhas reprodutivas indicam que a transmissão vertical também pode ser importante (MALDONADO et al., 2005). A transmissão do vírus por via placentária foi demonstrada após a infecção nasal de porcas gestantes três semanas antes do parto, com a identificação de PCV2 em leitões abortados ou nascidos vivos (PARK et al., 2005). O vírus também tem sido associado com miocardite em fetos abortados e natimortos (WEST et al., 1999; BRUNBORG et al., 2007). A presença do PCV2 ainda foi detectada em colostro, leite (SHIBATA et al., 2006; HA et al., 2009) e tecido mamário de porcas experimentalmente infectadas, demonstrando ser esta uma fonte viável de transmissão (PARK et al., 2009).

Machos infectados com PCV2 também podem excretar o vírus no sêmen (KIM et al., 2003a). Porcas inseminadas com sêmen enriquecidos com PCV2 apresentaram falhas reprodutivas e fetos infectados (MADSON et al., 2009) e um coeficiente de 13% dos fetos abortados e natimortos estão infectados com PCV2 (KIM et al., 2004). No entanto, ainda se desconhece número de partículas viáveis de PCV2 no sêmen suficiente para infectar porcas ou seus fetos. Em geral, o papel da infecção pelo PCV2 em falhas reprodutivas em suínos em condições naturais, ainda

é controversa. Alguns autores acreditam que a transmissão do vírus por esta via às porcas, pode não ser suficiente para desencadear a doença (MADSON et al., 2009). Entretanto, HARDING (2004), afirma que esse fato pode provocar a transmissão vertical, sendo esta via um mecanismo primário de disseminação e que colabora para uma rápida disseminação do PCV2.

Observações à campo sugerem que a susceptibilidade dos animais para a SMDS varia de acordo com a raça. Baixa mortalidade foi relatada em estudos de campo na raça Piétrain quando comparado às raças Large White e Duroc (LÓPEZ-SORIA et al., 2004). Outros estudos experimentais demonstraram uma maior predisposição em suínos da raça Landrace em relação ao Duroc, Large White e Pietrain (OPRIESSNIG et al., 2009b). Entretanto, ROSE et al. (2005), em um estudo de campo, não encontraram diferença na mortalidade quando comparavam essas mesmas raças. Se essas diferenças estão relacionadas com a raça ou se associadas a genes que podem conferir resistência suscetibilidade ainda se desconhece (GRAU-ROMA et al., 2011).

2.4 Patogenia

A patogenia do PCV2 e sua participação na SMDS permanecem pouco compreendidas. Pesquisas com o intuito de reproduzir experimentalmente a doença foram realizadas em vários locais do mundo no final da década de 90, mas não foi obtido um modelo adequado que reproduzisse as manifestações clínicas, induzindo somente a infecção com PCV2 (ALLAN et al., 1999). A doença clínica desenvolveu-se apenas quando o PCV2 foi inoculado juntamente com o parvovírus suíno (PPV) ou com o vírus da síndrome reprodutiva respiratória dos suínos (PRRSV) (ALLAN et al., 1999; ALLAN et al., 2000; ROVIRA et al., 2002). A inoculação única e exclusiva de PCV2 provocando a SMDS tal como se observava nos casos clínicos de campo foi obtida em 2001. A partir desse momento passou-se a admitir o PCV2 como agente causador da SMDS (HARMS et al., 2001). A disponibilidade de vacinas comerciais contra o PCV2 deve reduzir o impacto da SMDS. A eficácia destas

vacinas tem ajudado a confirmar indiretamente que o PCV2 é o agente essencial envolvido no desenvolvimento da SMDs. Apesar do PCV2 sozinho não ser suficiente para produzir todos os aspectos clínicos da SMDs, nenhum outro 'gatilho' é reconhecido como essencial para doença (TOMÁS et al., 2008).

Genoma do PCV2 foi detectado em uma ampla variedade de células, principalmente no citoplasma de histiócitos, células gigantes multinucleadas e em outras linhagens de células de monócitos e macrófagos como os macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas foliculares dos tecidos linfóides (ALLAN & ELLIS, 2000, GILPIN et al., 2003, ROSELL et al. 1999). Esporadicamente, também é possível a detecção do vírus no citoplasma de células renais, epiteliais respiratórias, no endotélio vascular, células acinares pancreáticas, ductular e nos núcleos de monócitos, macrófagos, células musculares lisas, hepatócitos e enterócitos (KIUPE et al., 1999; MCNEILLY et al., 1999; ROSELL et al., 2000b; ROSELL et al., 1999; SHIBAHARA et al., 2000; SIRINARUMITR et al., 2000).

Presume-se que as células mais eficientes para a replicação do PCV2 seriam aqueles com uma elevada atividade mitótica (STEINER et al., 2008). Quando fetos suínos estão infectados, a distribuição de vírus PCV2 está relacionada com tecidos ou células com maior índice mitótico, como miocardiócitos (SANCHEZ et al., 2003). Sendo assim, o antígeno viral não é encontrado em células com baixa atividade mitótica, como linfócitos de repouso de suínos adultos (GILPIN et al., 2003). Diante dessa observação, alguns autores sugeriram que propriedades fagocitárias de macrófagos são as principais responsáveis para a presença do vírus no citoplasma dessas células, e que monócitos e macrófagos não são as principais células de replicação do PCV2 (GILPIN et al., 2003).

Duas hipóteses acerca de como o PCV2 entra na célula têm sido exaustivamente debatidas. A primeira seria através da endocitose de células infectadas e a segunda pela possível existência de um receptor para PCV2 na superfície de macrófagos. Entretanto, esse receptor, até o momento, não foi identificado. Talvez a infecção do PCV2 ocorra por ambos os mecanismos (DARWICH et al., 2004). Acredita-se também que os monócitos infectados podem atuar como veículos reservatórios de vírus, espalhando o vírus pelos sistemas,

incluindo os órgãos linfóides, além de impossibilitar o contato do PCV2 com os anticorpos específicos (VINCENT et al., 2003).

A depleção linfocítica e leucopenia são as principais lesões histopatológicas encontradas tanto em animais sub-clinicamente infectados pelo PCV2 quanto em animais acometidos pela SMDS (ALLAN & ELLIS, 2000; ELLIS et al., 1999). Alguns autores afirmaram que a depleção linfocítica dos órgãos linfóides não é causada pelo efeito citopático direto do PCV2, pois ele não replica em linfócitos (MANDRIOLI et al., 2004; VINCENT et al., 2003; OPRIESSNIG et al., 2007). Outros autores sugeriram que a depleção linfóide induzida pelo PCV2 seja causada pela diminuição da proliferação linfocítica e não pela apoptose (MANDRIOLI et al., 2004).

O PCV2 utiliza uma rota alternativa para desregular o sistema imune dos suínos, possibilitando a ocorrência da SMDS. DARWICH et al., (2003) demonstraram que o PCV2 desregula o sistema imunológico, causando diminuição na expressão do fator de crescimento IL-4 de células B, na ação do linfócito T citotóxico e citocina IL-2 ativadora de macrófagos, na resposta IFN antiviral e no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-8. Baseado nesse estudo, tem sido sugerido que o PCV2 atue através da modulação do sistema-imune, preservando-se de uma resposta anti-viral apropriada.

Após infecção por PCV2 e disseminação do vírus no organismo, há uma parcela de animais que não irá desenvolver a doença clínica. Atribui-se o fato à presença de co-fatores infecciosos e não-infecciosos responsáveis pelo aumento dos níveis de replicação do PCV2 (ZANELLA, 2007). A herança genética individual do animal, a herança imunológica e a capacidade de responder à infecções compõem o efeito individual. O efeito da leitegada está relacionado com o papel da matriz transferindo anticorpos maternos aos leitões ou como reservatório do vírus. Os efeitos do manejo são muito importantes, pois evitam a exposição dos animais a fatores estressantes como densidade elevada, baixa qualidade de ar, água e ração, ambiente inadequado, misturas de leitões de origens variadas e falhas na limpeza e desinfecção sem a realização de vazio sanitário (OPRIESSNIG et al., 2007).

O desenvolvimento de lesões clínicas associadas à infecção por PCV2 parece ser uma soma de diferentes fatores, como a presença de co-infecções com

agentes virais e bacterianos, o status imunitário do animal e imunoestimulantes (adjuvantes vacinais). Acredita-se que não há apenas um fator associado ao desenvolvimento de doenças associadas ao PCV2, mas sim diversos patógenos conhecidos, o que pode variar de acordo com a região produtora analisada, capazes de desencadear a progressão de infecção por PCV2 a PCVAD (OPRIESSNIG et al., 2007).

2.5 Manifestações clínicas

Os sinais clínicos, alterações macroscópicas e microscópicas podem ser muito variáveis nas circovirose. Esta variação ocorre pela presença de agentes de infecção secundária que podem aparecer junto com PCV2 ou pelas diferentes formas de apresentação da infecção por PCV2, que pode ser sistêmica ou associada a um sistema específico (entérico, respiratório, reprodutivo) ou ainda síndrome da dermatite nefropatia suína (OPRIESSNIG et al., 2007).

Os animais afetados podem apresentar atraso no crescimento com emagrecimento progressivo; palidez corporal; aumento dos linfonodos inguinais; icterícia ocasional; sinais respiratórios: taquipnéia, dispnéia e tosse e sinais digestivos como diarreia, que não regride com tratamentos antimicrobianos de uso comum na suinocultura (ALLAN & ELLIS, 2000; SEGALÉS & DOMINGO, 2002; CIACCIZANELLA & MORÉS, 2003; HARDING, 2004; SARRADELL et al., 2004).

Outros sinais, muitos deles relacionados com infecções secundárias por *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* sp, *Salmonella* sp, e *Streptococcus suis*, entre outros, podem estar presentes (ALLAN & ELLIS, 2000; SEGALÉS & DOMINGO, 2002; SEGALÉS et al., 2004). Além disso, a presença de agentes secundários habitualmente associados com imunossupressão como o *Pneumocystis carinii*, *Staphylococcus hyicus*, *Aspergillus* spp e *Chlamydia* spp, também têm sido identificados com frequência em animais com SMDS (SEGALÉS et al., 2004).

A frequência destes achados, além de ser variáveis, tem um aparecimento clínico de caráter individual, ou seja, os animais doentes estão distribuídos irregularmente nas baías em conjunto com animais sadios. Portanto, apesar da transmissão ser horizontal, existe também a susceptibilidade individual, provavelmente de origem genética (SEGALÉS, 2008).

2.6 Lesões macroscópicas e microscópicas

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

As lesões histopatológicas nos órgãos linfóides de animais com SMDS são características. Um grau variável de depleção linfocitária com perda da arquitetura folicular é visto em praticamente todos os animais apresentando a doença. O achado é acompanhado de uma infiltração multifocal ou difusa e de grau leve ou intenso de histiócitos, células gigantes multinucleadas ou ambas. Em um grande número de casos, inclusões citoplasmáticas de tamanhos variados, esféricas, basofílicas e bem demarcadas do PCV2 são vistas em histiócitos e em células dendríticas (SEGALÉS et al., 2004).

Os pulmões apresentam pneumonia intersticial com infiltrado mononuclear, composto predominantemente por macrófagos e linfócitos. Broncopneumonia purulenta dos lobos anteriores ou pneumonia necrótica, atribuídas a infecções bacterianas concorrentes também podem ser observadas (SEGALÉS et al., 2005). O fígado caracteriza-se por infiltração linfohistiocitária periportal, necrose individual de hepatócitos e presença de corpos apoptóticos (SEGALÉS et al., 2005). No rim verifica-se nefrite intersticial linfo-histiocitária de distribuição multifocal (CHAE, 2004). Esporadicamente, são observadas lesões na glândula adrenal, no pâncreas (pancreatite linfo-histiocitária multifocal) e encéfalo (meningite fibrino-purulenta e encefalite mononuclear) (ALLAN & ELLIS, 2000; PESCADOR et al., 2003).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da SMDS deve ser realizado baseado nas combinações entre os sinais clínicos observados, lesões patológicas macroscópicas e microscópicas e na detecção de antígeno ou ácido nucléico (DNA) de PCV2 (SORDEN, 2000).

Vários métodos foram desenvolvidos para detectar o PCV2. A imunoistoquímica e hibridização *in situ* são considerados os métodos eficazes de diagnóstico. Ambos os testes são realizados em tecidos fixados em formalina e parafinados (SORDEN, 2000). Em geral, imunoistoquímica é mais rápida e econômica, entretanto a hibridização *in situ* é menos susceptível às alterações estruturais causadas pela fixação em formalina (CHAE, 2004).

O isolamento do vírus é demorado e não parece ser tão sensível quanto às outras técnicas apresentadas. O PCV2 isolado é atualmente desejável para fins de pesquisa ou, eventualmente, para a produção de vacinas autógenas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode diferenciar PCV1 e PCV2 e é muito sensível, por isso é importante reconhecer que a infecção por PCV2 pode ocorrer na ausência da circovirose. A sorologia é de pouca utilidade no diagnóstico SMDS, mas pode ser

de valor para determinar a soroconversão nas fases de creche ou de terminação em animais de um determinado rebanho (SORDEN, 2000).

2.8 Controle e profilaxia

Antes da disponibilidade de vacinas contra o PCV2 em 2006 na América do Norte, o sucesso do tratamento e controle da circovirose tinha foco principalmente na garantia de boas práticas de produção (OPRIESSNIG et al, 2004). Um plano de 20 pontos de controle foi proposto por MADEC (2000) com o objetivo de minimizar o estresse, eliminar co-infecções ou minimizar seus efeitos, eliminando potenciais fatores desencadeantes que induzem a estimulação imune e a progressão da infecção pelo PCV2.

As recomendações daquele plano incluíam: prática de todos dentro todos fora; desinfecção; contato limitado com animais; evitar a mistura de lotes; isolamento ou eutanásia de animais doentes; manutenção adequada de temperatura, fluxo de ar e espaço dentro de baias e adequada utilização de tratamentos anti-parasitários e vacinação para controle de co-infecções. Há evidências conflitantes de campo e de estudos experimentais sobre o efeito do controle da co-infecção na gravidade da SMDS (MADEC, 2000; OPRIESSNIG et al, 2004; GENZOW et al., 2009;).

Antes da disponibilidade de vacinas comerciais, a soroterapia foi amplamente utilizada em rebanhos europeus para controle de PCVAD (OPRIESSNIG et al., 2008). Vacina autógena preparada com tecido linfóide de animais com lesões de PCVAD inativado com formoldeído 2% foi muito utilizada por alguns veterinários clínicos. A vacina autógena foi uma ferramenta encontrada para a redução dos grandes prejuízos causados pelas doenças associadas ao PCV2 quando o fornecimento das vacinas comerciais ainda era limitado (OPRIESSNIG et al., 2008).

Atualmente, as vacinas contra PCV2 estão entre as vacinas mais comumente utilizadas na produção de suínos. Estão disponíveis no mercado quatro vacinas comerciais, produzidas com vírus inativado. As vacinas comerciais foram primeiro disponíveis na Europa em 2004, seguida pela América do Norte em 2006 e

em 2008, introduzidas no Brasil (OPRIESSNIG et al., 2008).

O objetivo da vacinação contra PCV2 é a proteção do rebanho contra manifestações clínicas de PCVAD e diminuição da excreção viral no ambiente pelas vias fecais, ou de secreção nasal, oral e sêmen e dos efeitos da infecção subclínica. As vacinas comerciais são baseadas no genótipo PCV2a e têm se mostrado eficientes na prevenção de lesões e doenças associadas com PCV2a ou PCV2b. Os sítios candidatos à produção de vacina mais eficazes são aqueles que induzem resposta imune contra a ORF2, que tem sido identificada como o principal antígeno imunogênico de PCV2, induzindo resposta de proteção de anticorpos (NAWAGITGUL et al., 2000). Com o uso de vacina contra PCV2 em condições experimentais, tem sido relatados: diminuição da viremia no soro após desafio com PCV2, diminuição das lesões linfóides associadas, da quantidade de antígeno viral nos tecidos, da excreção nasal e fecal e da indução de anticorpos anti PCV2. Em condições de campo, foi observada melhora no ganho de peso diário e conversão alimentar, diminuição das taxas de mortalidade e gastos com medicação e aumento do número de animais terminados e de nascidos vivos (KIXMÖLLER et al., 2008).

O momento de maior eficácia para administração da vacina contra PCV2 é um período de pelo menos três a quatro semanas antes da fase de exposição ao vírus no ambiente da granja. Anticorpos maternos são observados em animais com uma semana de idade e apresentam queda gradual até alcançarem níveis mínimos ao redor das seis a sete semanas (GRAU-ROMA et al., 2008). Assim, em granjas onde PCVAD ocorra na creche, a vacina deve ser administrada em animais com dois a três semanas de idade (OPRIESSNIG et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- ✓ Identificar a circovirose suína em suínos de criações intensivas no Estado de Goiás.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar propriedades e animais clinicamente suspeitos de infecção pelo PCV2;
- ✓ Caracterizar alterações macroscópicas e microscópicas da infecção por PCV2 em suínos com suspeita clínica do estado de Goiás;
- ✓ Confirmar a presença do vírus PCV2 em animais suspeitos de circovirose por meio da reação em cadeia da polimerase.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Região estudada

O estudo foi realizado em seis granjas tecnificadas de ciclo completo denominadas A, B, C, D, E, F. Localizadas nos municípios de Silvânia, Paraúna, Morrinhos, Cristianópolis, Inhumas e Senador Canedo, respectivamente no estado de Goiás (Figura 1). Esses municípios estão situados nas regiões centro-sul, sendo a região sul a maior produtora de suínos no estado.



Figura 1: Mapa do estado de Goiás dividido em regiões e microrregiões. Pontos vermelhos marcam a localização das granjas estudadas.
Fonte: www.seplan.go.gov.br/sepin.
(SEPIN/SEPLAN 2005)

Com o auxílio de médicos veterinários que atuam no campo e da Associação Goiana de Suinocultores (AGS) foram identificadas granjas com histórico

de refugagem e elevadas taxas de mortalidade nas fases de creche e recria. Com a permissão dos proprietários, as propriedades foram visitadas, coletando-se informações sobre riscos evidentes de circovirose.

O número de indivíduos, bem como a fase de criação selecionadas em cada granja ocorreu de acordo com a permissão obtida junto aos proprietários. No entanto, a amostragem mínima pré-estabelecida de dois animais a serem submetidos à eutanásia foi mantida.

Foram selecionados 20 animais entre quatro e 16 semanas de vida com evidência clínica de circovirose como perda de peso, palidez, aumento de linfonodos inguinais superficiais, icterícia, diarreia e sinais respiratórios (Tabela 1). Os animais foram e submetidos à eutanásia e a necropsia utilizando-se tiopentato de sódio (10mg/Kg) e cloreto de potássio 10%, aplicados por via endovenosa, de acordo com a Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2002).

As amostras foram obtidas de suínos alojados em sistema intensivo de criação, com água e alimento à vontade, temperatura e umidade controladas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Universidade Federal de Goiás, protocolo número 259/10.

Tabela 1: Número de animais por granja, idade em semanas e fases de criação.

Granjas	Animais	Idade em semanas	Fase
A	1, 2, 3 , 4 e 5	6 a 15	2 creche 3 recria
B	6, 7, 8 e 9	4 a 8	1 creche 2 recria
C	10 e 11	4 a 15	1 creche 2 recria
D	12, 13 e 14	14 a 16	3 recria
E	15, 16 e 17	8 a 9	3 creche
F	18, 19 e 20	7 a 10	2 creche 1 recria
TOTAL: 6	20		9 creche 11 recria

4.2 Colheita e conservação de materiais

Durante a necropsia, foram verificados os aspectos macroscópicos das possíveis lesões em diversos órgãos e coletados fragmentos de aproximadamente dois centímetros de espessura do baço, rim, pulmão, fígado, tonsila e linfonodos (inguinal superficial, mesentérico e mediastínico) para exames histopatológicos, totalizando 180 órgãos. Estes foram conservados em frascos identificados contendo solução de formol a 10%, na proporção de uma parte do órgão para 20 partes da solução por 24 horas. Posteriormente, esses fragmentos foram recortados com aproximadamente três milímetros de espessura e transferidos para frascos com álcool a concentração de 70%.

Outros fragmentos dos mesmos órgãos e lesões foram colocados em sacos plásticos esterelizados identificados e enviados sob refrigeração até a chegada ao laboratório onde foram conservados à -80°C.

4.3 Exame microscópico

As amostras destinadas ao exame histopatológico foram inicialmente desidratadas pela passagem em alcoóis nas concentrações crescentes de 70%, 80%, 90% por 30 minutos cada e álcool absoluto por cinco passagens de 40 minutos. Posteriormente, diafanizados ou clarificados pelo xilol em duas passagens de 30 minutos, embebidas ou impregnadas pela parafina a 60°C em duas passagens de uma e duas horas respectivamente e, em seguida, incluídas em bloco de parafina. Posteriormente, foram realizados cortes dos materiais parafinados de aproximadamente cinco micrometros. Esses cortes foram fixados em lâminas histológicas e corados com a técnica de hematoxilina e eosina, segundo metodologia proposta por LUNA (1968).

Os cortes foram avaliados em microscópio óptico e identificadas as possíveis alterações evidentes de circovirose. Essas alterações foram descritas e as frequências encontradas foram calculadas.

4.4 Análise molecular

Todos os tecidos foram submetidos à extração de DNA como descrito por DEZEN et al. (2009) e modificados como segue. Previamente homogeneizou-se 10mg de todos os tecidos em microtubos de 1,5ml. Após, a suspensão foi digerida com solução de lise contendo 800µl de TEN (10mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaCl), 80µl SDS a 10% e 5µl de proteinase K (20mg/ml) e incubados a 56° C, por duas horas. Em seguida, o produto da digestão foi centrifugado por 30 segundos a 14000rpm, 300µl do sobrenadante coletado, adicionando a igual volume de água ultra pura e duas vezes o volume de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1. Essa solução foi homogeneizada por cinco minutos e centrifugada por mais cinco minutos a 8000rpm. Após a centrifugação, 550µl do sobrenadante foi retirado, tratado com o mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizado por um minuto e centrifugado novamente a 8000rpm por cinco minutos. Outros 500µl do sobrenadante foram coletados e adicionados de 1000µl de etanol absoluto gelado, incubados por 30 minutos a -20°C para promover a precipitação do DNA.

A solução precipitada foi centrifugado a 14000rpm, por 20 minutos, a 0°C., o sobrenadante foi removido e o pellet lavado com 1000µl de etanol 70%, invertendo o tubo por cinco vezes. O tubo foi então centrifugado por um minuto a 14000rpm e o sobrenadante, mais uma vez, foi removido. O sedimento foi secado, ressuspendido em 100µl de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4) e armazenado a -20°C.

Ao final de cada procedimento de extração foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose a 2%, tampão TBE, em cuba horizontal sob uma corrente de 100V para verificar a presença do DNA extraído. O gel era corado em brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5µg/mL e o DNA visualizado por meio de um transiluminador UV modelo DP-CF-011-C (VILBER LOURMAT®) e fotografado para registro dos resultados.

4.5 Identificação do PCV-2 por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A pesquisa do DNA do PCV2 foi feita por PCR. A reação foi realizada com dois microlitros de DNA da amostra a ser testada na concentração entre 25 e 50ng (determinada por meio da comparação com marcador de peso molecular LAMBDA[®]).

Para a amplificação do DNA viral foi utilizados os oligonucleotídeos [5'-CGG ATA TTG TAG TCC TGG TCG -3'] da sequência 1095 – 1115 para senso e o [5'- ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A -3'] da sequência 1570-1549 para o antissenso, específicos para a região da ORF2 do PCV-2 (KIM & CHAE, 2001).

A reação foi conduzida em 25µl de volume final e na presença de 1µl de cada primer a 10mM, 2µl de oligonucleotídeos a 1mM (100mM dNTP Set, PCR Grade, Invitrogen) , 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl) (Taq DNA Polymerase, Recombinant, Invitrogen), 2,5µl de tampão da amostra na concentração de 10X, 1,5µl de MgCl₂ a 1,5mM de enzima, 2µl do DNA extraído e 14,8µl de água ultra pura autoclavada (KIM & CHA., 2001), determinando concentrações finais de tampão 1x, dNTP's 0,4 mM, MgCl₂ de 1,2mM, primers 10pmoles e enzima 1,0U

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático (modelo MX-BCL-7 ESCO), sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C por cinco minutos, seguido de 34 ciclos com desnaturação da fita a 94°C durante um minuto, anelamento a 65°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. O produto final amplificado foi de aproximadamente 481pb.

Em todas as reações foram utilizadas como controle positivo, uma amostra do Laboratório de Virologia Animal do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás que amplificou o produto esperado (BARTHASSON, 2009), água esterelizada como controle negativo e padrão de peso molecular 100pb DNA Ladder (LUDWIG[®]). Os produtos amplificados por PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cuba horizontal sob uma corrente de 100V, em tampão TBE, posteriormente imersas em brometo de etídeo (0,5µg/ml), visualizadas por meio de um transiluminador UV modelo DP-CF-011-C (VILBER LOURMAT[®]) e fotografadas para registro dos resultados.

4.5 Análises dos resultados

Foram realizados estudos descritivos e frequência dos principais sinais clínicos, achados macroscópicos, microscópicos, dos suínos com suspeita clínica de circovirose em forma de tabela de contigência.

5. RESULTADOS

5.1 Sinais clínicos

Os sinais clínicos observados estão descritos na Tabela 2. Apatia foi o sinal clínico mais frequente encontrado em 90% dos casos, acompanhada de emagrecimento e palidez presentes em 65% dos animais.

Sinais entéricos foram observados em apenas três granjas A, B e D e em 20% dos animais (Figura 2).

Sinais respiratórios foram encontrados em 13 (65%) dos animais, nas granjas A, D, E e F. Sendo que tosse acompanhada de respiração abdominal taquipnéica foram os sinais clínicos mais observados (45% dos animais). Cianose das mucosas externas acompanhava casos respiratórios mais severos. Corrimento nasal seroso estava presente em 40% dos suínos. Não foi encontrada icterícia. Morte súbita estava presente em suínos da exploração A.

Lesões cutâneas leves sugerindo a Síndrome Dermatite e Nefropatia dos Suínos foram encontradas em duas granjas, A e D (Figura 2), e consistiam em lesões circulares, eritematosas, de tamanho variável entre um centímetro de diâmetro até pequenas placas distribuídas em sua maioria no trem posterior e períneo. Em alguns casos, essas lesões eram disseminadas pelo ventre, flanco, dorso, cabeça e orelhas.

Tabela 2: Número e frequência da ocorrência dos principais sinais clínicos observados nos suínos com suspeita clínica de circovirose.

Alterações	Total	Frequência
Apatia	18/20	90%
Palidez	13/20	65%
Emagrecimento	13/20	65%
Tosse	9/20	45%
Secreção nasal	8/20	40%
Aumento do volume linfonodo inguinal superficial	6/20	30%
Sinais entéricos	4/20	20%
Alterações de pele	2/20	10%

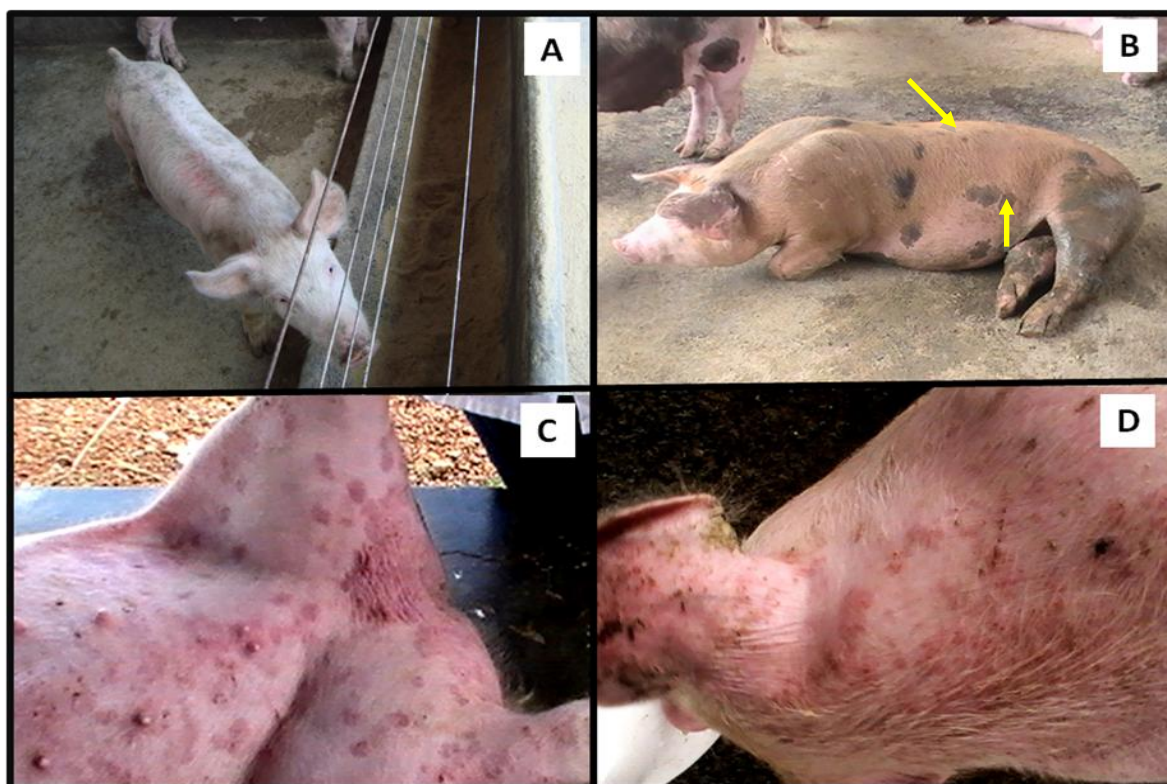


Figura 2: Fotografias de suínos com suspeita de circovirose. A- Suíno com 17 semanas com emagrecimento acentuado. B- Sinais de diarreia (setas). C e D – Alterações na pele.

5.2 Lesões macroscópicas

As alterações encontradas na necropsia e suas frequências estão descritas na Tabela 3.

O pulmão foi o órgão que mais foram identificadas alterações e estavam presentes em quase todos os animais. Hepatização vermelha foi a lesão mais observada (Figura 3A). O não colabamento pulmonar ou “pulmão armado” (Figura 3B e 3D) foi um achado constante 13/20 e, muitas vezes, estava acompanhando de edema interlobular. Abscessos únicos pulmonares também foram encontrados em 3/20 casos. Aderências pleurais e pleurite, muitas vezes com presença de fibrina na cavidade, foram e associados com infecções bacterianas secundárias, foram encontrados em dois casos.

Tabela 3: Número e frequência das principais alterações macroscópicas observadas em suínos com suspeita clínica de circovirose.

Órgãos	Alterações	Total	Frequência
Pulmão	Áreas de hepatização vermelha	16	80%
	Pulmão não colapsado	13	65%
	Aderência	4	20%
	Abcessos	3	15%
Coração	Pericardite	5	25%
	Aderência de pericárdio	3	15%
	Hidropericárdio	2	10%
	Mobilização da gordura pericárdica	2	10%
Linfonodo	Linfoadenomegalia	13	65%
	Linfonodo hemorrágico	5	25%
	Linfonodos edemaciados	4	20%
Tonsila	Tonsilas aumentadas	5	25%
Baço	Pontos hemorrágicos	2	10%
	Área de cicatrização	2	10%
Tórax	Aderência de torácica	3	15%
	Hidrotórax	2	10%
Mesentério/Abdômen	Vasos linfáticos aumentados	3	15%
	Aderências abdominais	2	10%
	Ascite	2	10%
Fígado	Fígado com aumento do padrão lobular	7	35%
	Aderência de peritônio	2	10%
Rim	Rins com pontos brancos	4	20%
	Rins com pontos vermelhos	2	10%
	Rins pálidos	1	5%
Trato digestivo	Aumento da parede dos intestinos	4	20%
	Congestão vascular nos intestinos	5	25%
	Fezes aspecto pastoso	4	20%
	Aumento dos vasos linfáticos	4	20%
	Hiperemia da mucosa gástrica	2	10%

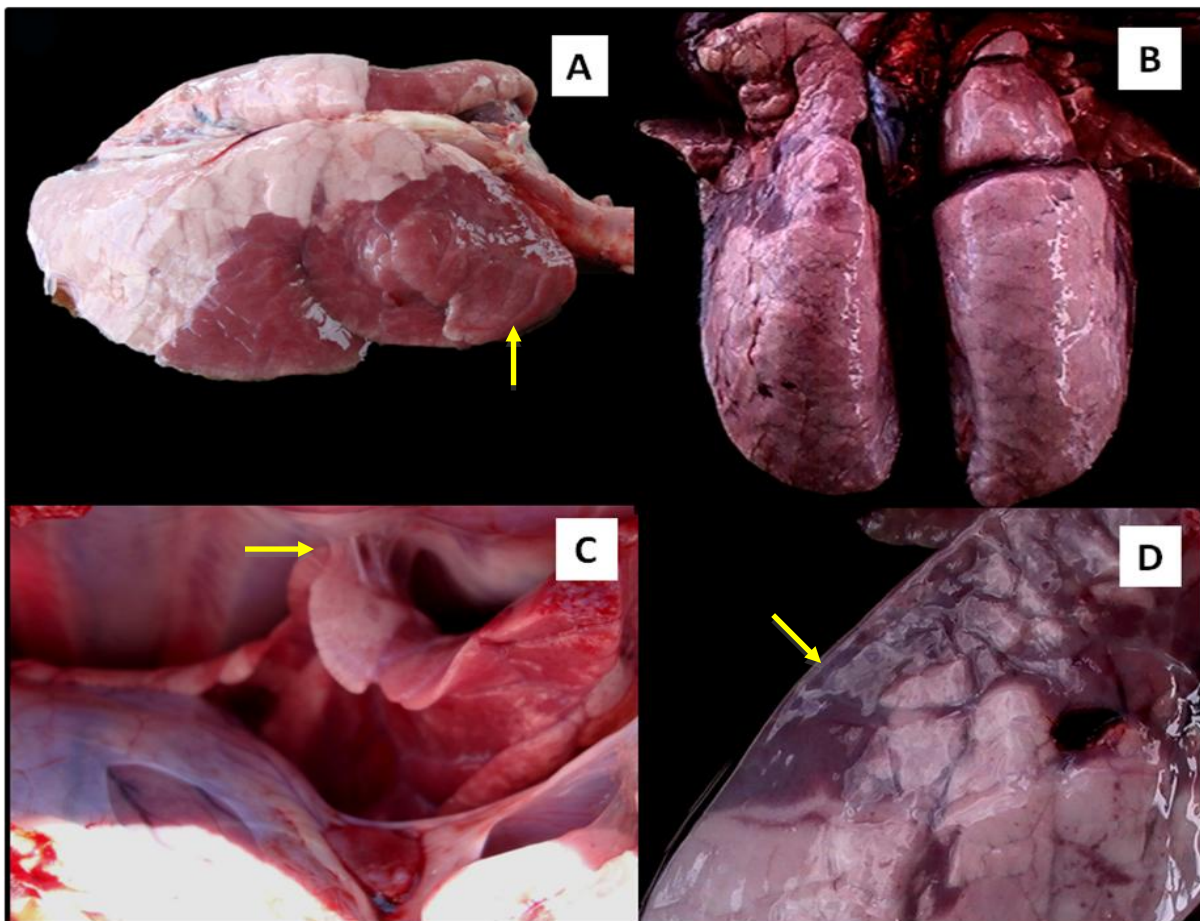


Figura 3: Fotografias de pulmões de suínos com suspeita clínica de circovirose: A- pulmão com hepatização vermelha (setas), B- pulmão não colapsado, C- aderência de pulmão com pleura (seta), D- evidência do lóbulo cranial com hepatização e edemaciação (seta).

No coração hidropericárdio de coloração citrina ou sanguinolento, acompanhado de atrofia da gordura cardíaca foram alterações mais evidentes. Aderências de saco pericárdico e pericardite fibrino-purulenta também foi encontrada. Atrofia da gordura cardíaca estava presente nos casos de emaciação.

Em dois suínos de duas granjas distintas, C e D, foram encontrados pleurite, pericardite, pulmão aderido à pleura, aderência de omento ao baço, grande quantidade de fibrina, hidrotórax, ascite e hidropericárdio com presença de líquido sanguinolento. Essas lesões podem existir em várias combinações de agentes bacterianos (Figura 4 A).

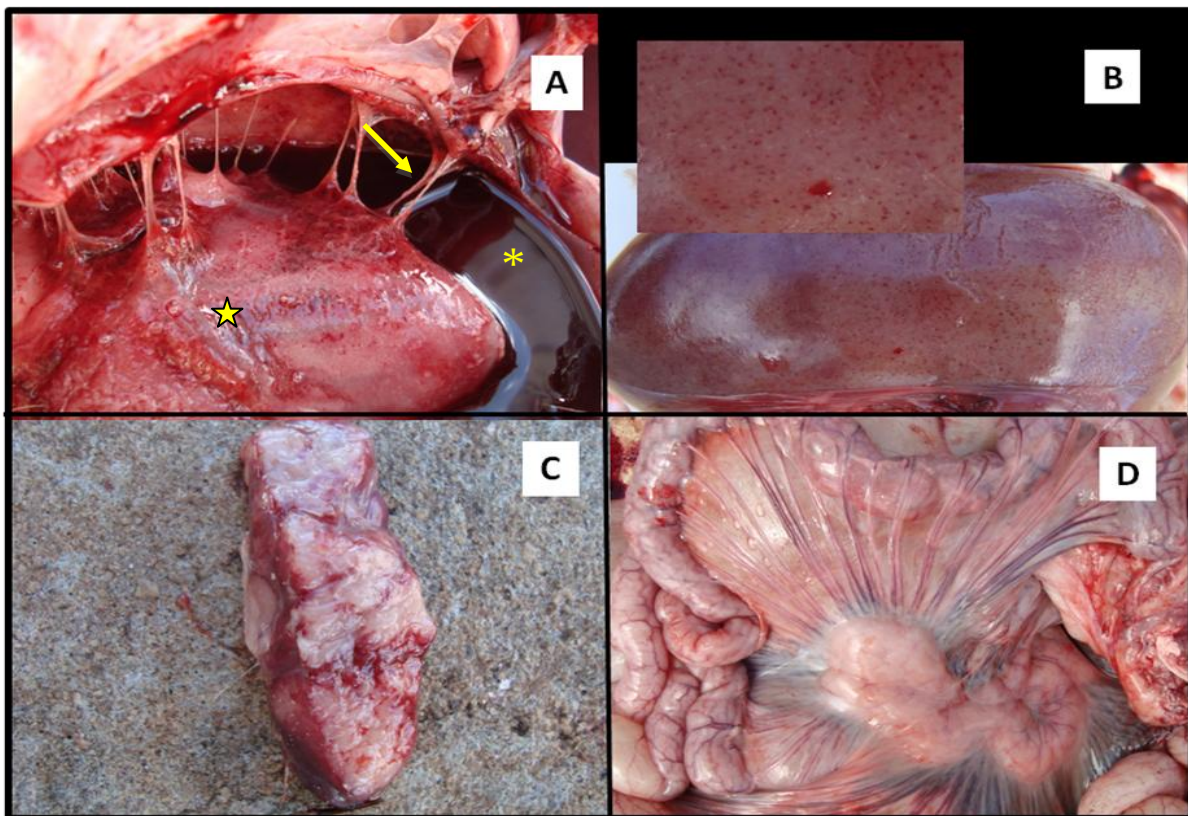


Figura 4: Fotografia de achados de necropsia de suínos com suspeita clínica de circovirose: A- aderências de saco pericárdico (setas), pericardite fibrino-purulenta (estrela) e presença de exsudato sanguinolento no tórax (asterisco), B- rim: presença de petéquias (detalhe), C- linfonodo mediastínico edemaciado e hemorrágico, D- evidenciação de vasos do mesentério e aumento de volume dos linfonodos mesentéricos.

Em 13 casos, os linfonodos estavam aumentados de volume principalmente os linfonodos inguinais superficiais e mesentérico e em cinco casos linfonodos mediastínicos (Figura 4 D) e inguinais apresentavam hemorrágicos (Figura 4 C). Os linfonodos aumentados de volume apresentavam edema gelatinoso e evidenciação do padrão de vasos linfáticos associados. Ao corte, havia protusão das porções internas e derramamento de líquido incolor ou levemente citrino. Linfonodos com volume diminuído encontrados em quatro casos. Edema acentuado de mesentério com evidenciação dos vasos linfáticos foi encontrado em animais com aumento de linfonodo mesentérico (Figura 4 D).

O espessamento e o aumento de volume tonsilares com evidenciação do

padrão das criptas foi o único achado desse órgão e estava presente em 5/20 animais.

Líquido claro em grande quantidade foi encontrado na cavidade abdominal de dois animais. No fígado encontraram-se áreas de cicatrização em três animais e o aumento do padrão lobular foi achado comum. Hepatomegalia e o órgão pálido foram menos evidentes. Rins com coloração pálidas foi achados em um animal e petéquias na região cortical foi encontrada dois casos (Figura 4 B).

Evidenciação de vasos linfáticos e edema de serosa foram acompanhados de edema de mesentério. Quatro animais apresentaram fezes pastosas e amareladas. Aumento de volume com evidenciação das placas de Peyer também foi notado no intestino delgado.

5.3 Lesões microscópicas

Os achados microscópicos observados nos órgãos analisados estão descritos na Tabela 4.

Os principais achados microscópicos correspondem ao trato respiratório. Doze dos 20 animais (55 %) apresentavam pneumonia intersticial multifocal variando de leve a acentuada (Figura 5 A). Dez animais (50%) apresentaram broncopneumonia purulenta moderada (Figura 5 B). Células gigantes foram encontradas em grande quantidade no pulmão de três animais, infiltrado perivascular predominantemente mononuclear foi encontrado em quatro animais. Hiperplasia do tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) esteve presente em sete animais 35% (Tabela 4).

Na maioria dos animais não apresentou alterações em nível renal, naqueles que apresentaram foram notadas infiltrado linfocitário (2/20) e histiocitário (2/20), além de congestão multifocal discreta (2/20).

No animal 17 da granja E encontraram-se alterações mais significativas como glomerulonefrite com infiltrado histiocitário multifocal acentuado, necrose e

degeneração de células tubulares, fibrose, presença de material hialino no interior de microtubos, presença de células gigantes e vasculite (Figura 5 C e D).

Também em relação ao fígado um grande número de animais não apresentou alterações. A principal lesão encontrada foi infiltrado histiocitário multifocal, caracterizando hepatite mononuclear em seis animais. Necrose individual de hepatócitos e infiltrado linfocitário foram observados em três animais (Figura 6 A e B). Células gigantes também foram encontradas em grande quantidade no fígado de um animal. (Figura 6 A).

Tabela 4: Principais lesões microscópicas e frequência observadas em pulmões, fígado e rim de suínos com suspeita clínica de circovirose.

Órgão	Alterações	Total	Frequência
Pulmão	Pneumonia intersticial mononuclear multifocal	12/20	60%
	Pneumonia broncointersticial	10/20	50%
	Hiperplasia de BALT	7/20	35%
	Infiltrado mononuclear perivascular	4/20	20%
	Edema intersticial/interlobular	3/20	15%
	Célula gigante	3/20	15%
	Pleuropneumonia	2/20	10%
	Infiltrado histiocitário multifocal	2/20	10%
	Sem alteração	2/20	10%
Rim	Infiltrado mononuclear perivascular	3/20	15%
	Infiltrado linfocitário multifocal	2/20	10%
	Congestão multifocal discreta	2/20	10%
	Infiltrado histiocitário multifocal	2/20	10%
	Material hialino em túbulos renais	2/20	10%
	Glomerulonefrite	1/20	5%
	Degeneração de túbulos	1/20	5%
	Sem alteração	11/20	55%
Fígado	Infiltrado histiocitário multifocal	6/20	30%
	Infiltrado linfocitário multifocal	3/20	15%
	Necrose individual de hepatócitos	3/20	15%
	Célula gigante	1/20	5%
	Sem alteração	7/20	35%

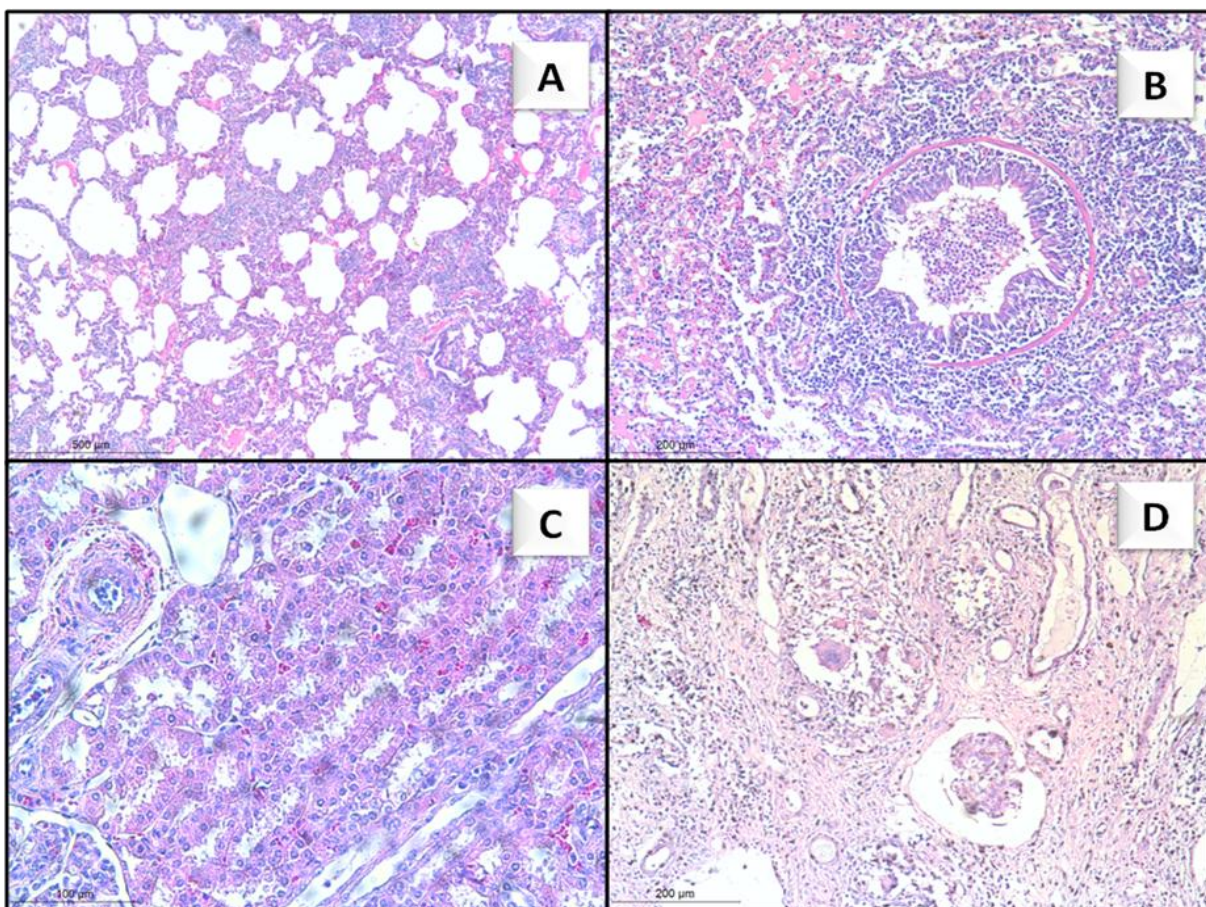


Figura 5: Fotomicrografia pulmão e rim de suínos com suspeita de circovirose. A- Pneumonia interstiicial difusa (10x H&E). B- pneumonia broncointersticial (40x H&E). C- Rim: degeneração de túbulos (100x H&E). D- Rim: Infiltrado linfo-histiocitário acentuado difuso (glomerulonefrite) (100x H&E).

Alterações no baço foram observadas em cinco animais. Foi observado infiltrado histiocitário ou neutrofílico multifocal moderado, além de necrose centrofolicular, em alguns animais como descrito na Tabela 5.

Edema subcapsular e dilatação de vasos linfáticos periféricos foram achados em cinco linfonodos (25%). Hiperplasia linfóide foi observada em três casos (15%). Em outros três casos, havia depleção centrofolicular mais severa. Células gigantes estava presente no linfonodo inguinal do animal 3 granja A.

Infiltrado histiocitário multifocal com variados graus de intensidade ocorreu em linfonodos de sete animais, sendo a lesão mais comum, 35% dos casos. Infiltrado

linfo-histiocitário multifocal moderado ocorre nos casos mais crônicos da doença e estava presente em dois (10%) animais (Figura 6 C e D). Hemorragia foi observada em outros quatro animais (20%).

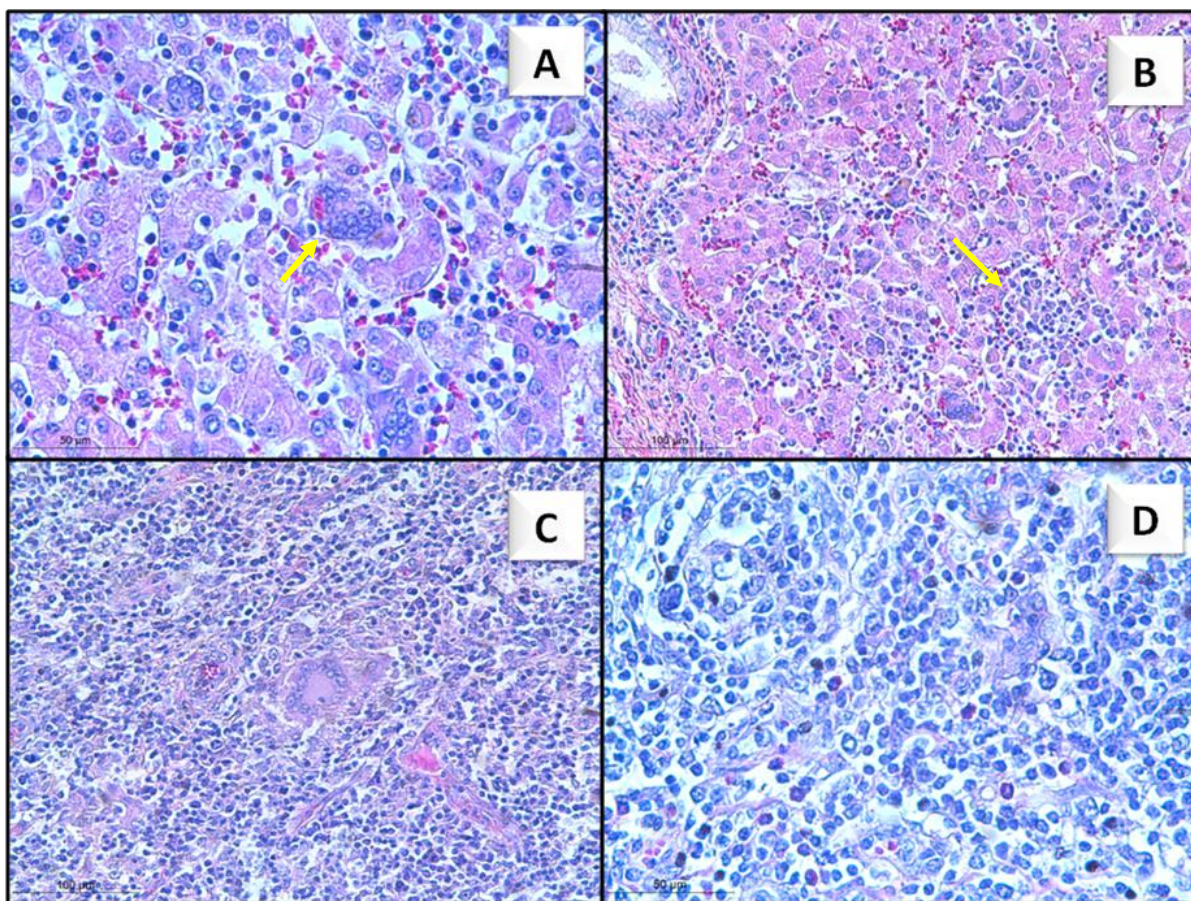


Figura 6: Fotomicrografia de fígado e linfonodo de suínos com suspeita de circovirose. A- Fígado: infiltrado mononuclear multifocal acentuado, com formação de células gigantes multinucleadas (seta) (H&E 40x). B- Fígado: infiltrado mononuclear (seta) e esteatose difusa (H&E 10x). Linfonodo: linfo-histiocitário. C- linfonodo: infiltrado mononuclear, presença de célula gigante (seta) (H&E 10x).D- Linfonodo com presença de infiltrado mononuclear multifocal (H&E 40x).

Tabela 5: Número e frequência das principais lesões microscópicas observadas em tecidos linfóides de suínos com suspeita clínica de circovirose.

Órgãos	Alterações	Total	Frequência
Baço	Infiltrado histiocitário multifocal	2/20	10%
	Infiltrado neutrofílico multifocal	1/20	5%
	Necrose centrofolicular	1/20	5%
	Hemoossiderose multifocal acentuada	1/20	5%
	Sem alteração	15/20	75%
Linfonodo	Infiltrado histiocitário	7/20	35%
	Infiltrado eosinofílico multifocal	6/20	30%
	Edema discreto região medular	5/20	25%
	Hemorragia	4/20	20%
	Depleção linfóide centrofolicular	4/20	20%
	Hiperplasia linfóide centrofolicular	3/20	15%
	Infiltrado linfo-histiocitário	2/20	10%
	Necrose multifocal	2/20	10%
	Células gigantes	1/20	5%
	Sem alteração	3/20	15%
Tonsila	Infiltrado histiocitário multifocal	10/20	50%
	Hiperplasia linfóide centrofolicular	5/20	25%
	Necrose de criptas	5/20	25%
	Abscessos de criptas	4/20	20%
	Infiltrado linfocitário multifocal	3/20	15%
	Necrose de folículos	3/20	15%
	Células gigantes	1/20	5%
	Sem alteração	3/20	15%

5.4 Análise molecular

Por meio da PCR (Figura 6 e 7), foi possível comprovar a ocorrência do DNA do PCV2 em granjas de criação intensiva no estado de Goiás. Os resultados das PCR nos diversos órgãos analisados dos 20 animais testados encontram-se detalhados nas Tabelas 7 e 8 e Figura 7.

Todas as granjas foram positivas para PCV-2 no PCR assim como todos os animais desse estudo tiveram reação positiva em pelo menos um órgão testado. O pulmão foi o órgão que mais se obteve resultados positivos sendo 95% positivos seguido do linfonodo inguinal (85%) e rim (80%).

Os animais 1, 2, 3, e 5 da granja A e 6, 8 e 9 da granja B tiveram todos os seus órgãos positivos para PCV2 por meio da PCR.

Tabela 6: Resultados reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) realizadas em diferentes órgãos de suínos estudados.

Granjas	A					B				C		D			E			F		
Animais	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Fígado	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Pulmão	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rim	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Baço	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L. inguinal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
L. mesentérico	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L. mediastínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Tonsila	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-
Intestino	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-

(+) Reação positiva (-) Reação negativa

Tabela 7: Frequência de resultados positivos e negativos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) realizadas em diferentes órgãos dos suínos estudados.

Órgãos	Total de positivos	Frequência de positivos	Total de negativos	Frequência de negativos
Pulmão	19/20	95%	1/20	5%
L. inguinal	17/20	85%	3/20	15%
Rim	16/20	80%	4/20	20%
Tonsila	15/20	75%	5/20	25%
L. mesentérico	15/20	75%	5/20	25%
Fígado	15/20	75%	5/20	25%
Baço	15/20	75%	5/20	25%
L. mediastínico	13/20	65%	7/20	35%
Intestino	13/20	65%	7/20	35%

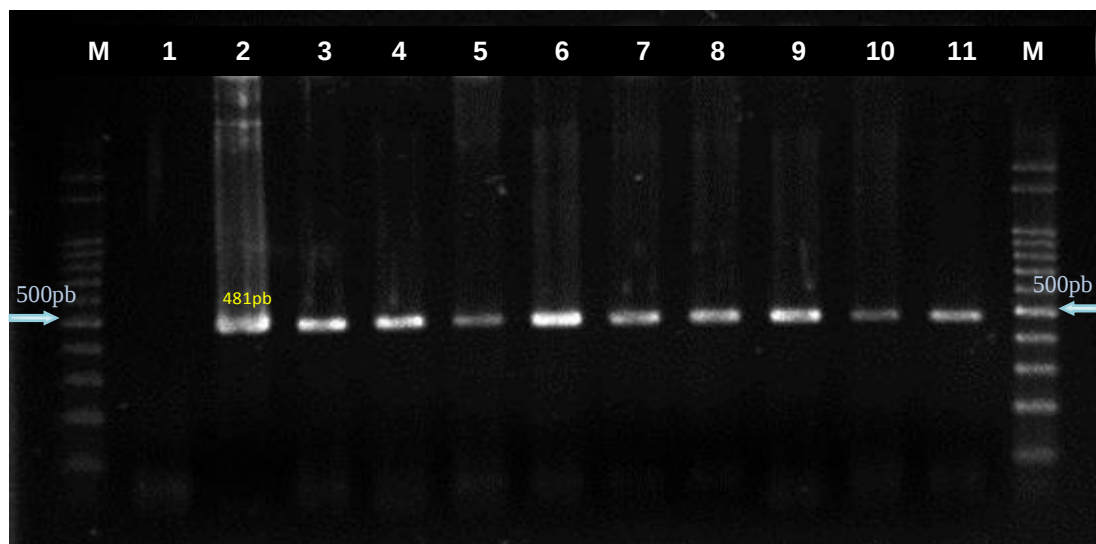


Figura 7: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,5% de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) de tecidos suínos coletados em granja B animal 8 do estado de Goiás. Da esquerda para a direita nas linhas: M, marcador molecular ladder 100pb (Ludwig); 1-controle negativo; 2-controle positivo; 3- fígado; 4-pulmão; 5-rim; 6-baço, linfonodos; 7-inguinal superficial, 8-mesentérico e 9-mediastínico; 10-tonsila, 11-intestino, e M marcador molecular ladder100 pb.

6. DISCUSSÃO

De acordo com SEGALÉS, et al. (2005) e SORDEN (2000), o diagnóstico da circovirose é realizado pela demonstração de lesões características associado com a presença de antígeno viral sendo a imunoistoquímica e a hibridização *in situ* considerados testes de eleição para detecção de PCV2 como parte do diagnóstico. Para OPRIESSNIG et al. (2007), o diagnóstico da circovirose suína é baseado nos sinais clínicos e demonstração antigênica do PCV2 em mais de um tecido linfóide, ou em um tecido linfóide e um órgão de outro sistema como pulmões, fígado, rim e intestino ou em dois órgãos de sistemas distintos. Deste modo, a detecção do ácido nucléico ou antígeno de PCV2 é considerada padrão ouro para o diagnóstico e os melhores testes para este fim são a reação em cadeia da polimerase ou hibridização *in situ* (DNA), além da imunoistoquímica (proteína).

No entanto, a imunoistoquímica nem sempre pode ser empregada como método diagnóstico de rotina, pois a disponibilidade de anti-soro anti-PCV2 é restrita. Ainda que um anticorpo monoclonal anti-PCV2 esteja disponível comercialmente no exterior, o diagnóstico definitivo ainda pode ser tecnicamente difícil com esse produto (OPRIESSNIG et al., 2007). No Brasil não há disponibilidade do anticorpo anti-PCV2 e tem-se grande dificuldade em encontrar esse anticorpo em outros países. Sendo assim, o PCR foi o teste utilizado neste trabalho para detecção do agente principal da circovirose e, em conjunto com a presença de sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas (SORDEN, 2000; QUINTANA et al., 2001; GAVA et al., 2005), pode-se demonstrar a presença da doença clínica difundida em suinoculturas intensivas no estado de Goiás.

Em 2001, ARAÚJO et al. (2002) encontrou sinais e lesões macroscópicas e microscópicas características de circovírus em Goiás e em 2009, BARTHASSON identificou a presença do PCV2 em suínos provenientes de criações extensivas, nas quais o controle sanitário é usualmente precário e a expressão econômica pouco significativa.

O presente estudo foi o primeiro a identificar a circovirose em criações intensivas de suínos no estado de Goiás. Teve como premissa básica identificar o

DNA viral e lesões macroscópicas e microscópicas em suínos que apresentassem sintomatologia compatível com circovirose suína em granjas com elevados índices de refugagem.

Os resultados aqui obtidos permitem, desse forma, confirmar as evidências anteriormente apontadas de que essa síndrome está presente em suínos de Goiás (ARAÚJO et al. 2002; BARTHASSON, 2009), a semelhança do que já foi observado em outros estados da federação (CIACCI-ZANELLA et al., 2001; PESCADOR et al., 2003; CASTRO et al., 2003; FRANÇA et al., 2005; CHIARELLI-NETO et al., 2005; PINTO et al., 2003; BARBOSA et al., 2005; CHIARELLI-NETO et al., 2007). Tais dados corroboram as afirmações de ALLAN (2007), CIACCI-ZANELLA & MORÉS (2003) e CHAE (2004) que afirmam que esta enfermidade está bastante difundida na suinocultura mundial e brasileira, sendo considerada a maior causa de refugagem.

MAGAR et al. (2000) afirma que o PCV2 pode muitas vezes ser isolado na ausência de sinais clínicos e lesões histológicas evidentes, sugerindo a ocorrência de infecção subclínica ou variação na virulência. No presente trabalho foram encontrado quatro animais, apesar de apresentarem sintomatologia de emagrecimento e apatia não apresentaram lesões macroscópicas e microscópicas características da doença. De acordo com GAVA et al., (2005), o fato de algumas amostras serem positivas por “nested-PCR”, mas não apresentarem lesões histológicas, indicam que o DNA viral está presente na amostra, mas sem causar a doença. KRAKOWKA et al. (2005) descreve suínos contaminados com o PCV-2, sem manifestação clínica da doença, eliminam o vírus ou DNA viral intermitentemente, servindo como potente fonte de infecção para outros animais, pois o mesmo é estável e pode sobreviver no ambiente por muitos meses.

Além disso, vários autores demonstraram que apesar da presença do PCV2 ser essencial para causar a doença, a existência de outros fatores concomitantes faz-se necessária para o desenvolvimento da SMDS (SORDEN, 2000). QUINTANA et al. (2001) e KRAKOWKA et al. (2005) determinaram que o estágio no qual a doença se encontra reflete também a presença ou ausência de lesões específicas. Desta forma, também foi possível encontrar antígeno ou ácido nucléico de PCV2 em

tecidos de animais clinicamente saudáveis, e neste caso, a quantidade de vírus e a intensidade de lesões estavam muito baixas ou nulas.

A variação da predileção do vírus por determinados órgãos está relacionada com a suscetibilidade do hospedeiro e/ou fatores ambientais. Apesar da técnica de PCR ser rápida, sensível e específica, esta não permite a localização do vírus no tecido ou células, e tampouco permite fazer uma diferenciação entre suínos infectados subcl clinicamente dos clinicamente doentes (BRUNBORG et al., 2004). LIU et al. (2000) mostraram que os níveis de DNA presentes em animais clinicamente doentes são significativamente maiores do que em animais clinicamente saudáveis. Esta observação sugere que para o desenvolvimento da SMDS é necessária uma quantidade mínima do PCV2.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais de neste estudo condizem com os achados de ALLAN & ELLIS, (2000); ZANELLA & MORÉS (2003) e SEGALÉS, et al. (2004). Seis sinais clínicos fundamentais foram descritos por HARDING et al., (1998) e MADEC et al., (2000) e são a base do diagnóstico clínico preliminar de SMDS, presentes na seguinte ordem de frequência: caquexia, dispnéia, linfadenopatia, diarreia, palidez e icterícia. Esses dados são condizentes com os principais sinais clínicos encontrados nesse trabalho, entretanto icterícia não estava presente nos casos estudados. Tosse, piroxia, úlcera gástrica, meningite e morte são menos comuns (WELLENBERG et al., 2000). Úlcera gástrica não foi encontrado no presente estudo, tosse estava presente em nas granjas A, D, E e F. Na granja A morte súbita de suínos foi observada, provavelmente, por se tratar de um estágio mais avançado de SMDS e outras doenças associadas.

Lesões macroscópicas e microscópicas foram condizentes aos achados por ROSELL et al. (1999); KIM et al. (2003a) e CORRÊA (2006).

Sinais respiratórios foram achados constantes nas granjas variando de entre mais e menos severo. Lesões pulmonares como hepatização, principalmente em lóbulos craniais, e pulmão não colabado estava presente em quase todos os animais, 80 e 65% dos casos, respectivamente, corroborando com os achados de LIU et al. (2002). Pneumonia intersticial linfo-histiocítica foram encontrados em 60% dos casos, infiltrados histiocitário difusos ou associados a brônquios e bronquíolos,

causando o espessamento dessas estruturas foi achado comum corroborando com os achados de ROSELL et al. (1999) e KIM et al. (2003a).

É digno de nota que o maior número de reações positivas na PCR ocorreu a partir de fragmentos de pulmão. Um importante aspecto da circovirose é que a doença está associada a doenças do complexo respiratório dos suínos. Essa infecção pelo PCV2 predispõe à ocorrência de doença respiratória aguda secundária, preferencialmente por bactérias, que causa considerável prejuízo econômico por debilitar severamente o leitão, podendo até mesmo levar à morte (ELLIS et al., 1999).

No fígado encontrou-se hepatite intersticial linfo-histiocítica periportal ou difusa acompanhada de vacuolização, tumefação hepatocelular, e necrose individual hepatócitos como descrito por ZANELLA & MORÉS, (2003); ROSELL et al. (1999) e KIM et al. (2002) verificou-se também, infiltrados mononucleares (ROSELL et al., 1999).

Podem ser consideradas significativas as frequências nos fragmentos de órgãos linfóides positivos, como baço, tonsilas e linfonodos. Já foi observado que as células alvo do vírus são as células apresentadoras de antígeno e os macrófagos, sendo frequente alterações em tecidos linfóides como consequência da circovirose (SEGALÉS et al., 2004).

Os órgãos linfóides freqüentemente afetados foram os de linfonodos e tonsilas (BASTIANELLO, 2004). Histologicamente, infiltrado histiocitário e linfóide foram lesões mais frequentes nos órgãos linfóides, características de PCV2 como relatado por SEGALÉS (2002). Outra lesão observada nos órgãos linfóides foi depleção linfocitária e hiperplasia linfocitária, sendo esta associada com a estimulação antigênica de qualquer tipo segundo FRY & MCGAVIN, (2007). No baço observou-se poucas alterações em contraste com os achados de ROSELL et al. (1999).

CHIANINI et al. (2003) e KRAKOWKA et al. (2005) definiram que a infecção subclínica está caracterizada por ausência de sinais clínicos e por mínima ou nenhuma lesão no tecido linfóide e parenquimatosos. Desta forma, pode ser verificados nos linfonodos hiperplasia linfóide muito leve e alguns histiócitos, embora

a hiperplasia linfóide seja mais proeminente em casos leves a moderados de circovirose.

Corpúsculos de inclusão não foram muito evidentes nos suínos pesquisados, pois de acordo com KIM et al. (2002), apesar de muito característicos, não são encontrados em todos os casos de circovirose.

No presente estudo, dois animais das granjas 1 e 4 encontrou-se lesões de pele. A identificação de alterações cutâneas em casos de circovirose, pode indicar ocorrência de SNDP.(MADEC et al., 2000) ou sinais menos específicos da própria SDMS (SEGALÉS et al. 2000). MADEC et al. (2000), todavia, associam lesões de pele e as lesões renais apenas à SNDP, não sendo regularmente observadas nos surtos de SDMS.

Um dos animais não apresentou alterações microscópicas enquanto no outro foi observado no rim infiltrado mononuclear, discreto, multifocal e vasculite. Para SEGALÉS et al. (2000), nem todos os suínos infectados com SNDP apresentam lesões macroscópicas em rins e pele, outros apresentam lesões cutâneas, mas não apresentam lesões renais. Entretanto, todos podem ser considerados casos atípicos de SNDP se tiverem presença de vasculite necrotizante sistêmica (SEGALÉS et al., 2000), o que não foi observado nesse estudo.

É importante salientar que esses resultados podem ter sido influenciados pela metodologia de amostragem, onde foram selecionados, na maioria dos casos, animais com sinais clínicos evidentes da circovirose. Animais recentemente infectados ou em fase terminal da doença podem apresentar lesões microscópicas moderadas ou ausentes e, conseqüentemente, pequenas quantidades de antígeno de PCV2 podem ser detectadas nos tecidos linfóides (SEGALÉS et al., 2004). Contudo, a detecção de circovírus em suínos sintomáticos de criações intensivas e a totalidade de granjas positivas para PCV2 constitui um alerta para que seja mais rigoroso o monitoramento sanitário da circovirose nas diversas granjas que compõem os complexos agroindustriais da carne suína no estado.

7 CONCLUSÕES

Confirmou a presença da circovirose suína no estado de Goiás em criações intensivas.

As sinais clínicos, alterações macroscópicas e microscópicas sugestivas da infecção por PCV2 ocorreu em suínos de granjas intensiva no estado de Goiás.

.A presença do agente PCV2 foi detectada em animais clinicamente suspeitos e com lesões macro e microscópicas sugestivas de circovirose no estado de Goiás.

REFERÊNCIAS

1. ABIPECS. **Relatórios Anual da Abipecs 2009**. [online]. Indústria Produtora e Exportadora de Carne, 1.ed. São Paulo. SP, 2010. 9p. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>. Acesso em: 14 fev. 2011.
2. ALLAN, G. Advances in PCV2 research – Results of the european Project nº 13928: control of porcine circovirus diseases (PCVDS): Towards improved food quality na safety. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13., 2007, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Associação Brasileira dos Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, p.125-138.
3. ALLAN, G. M.; CNEILLY, E. M.; KENNEDY, S.; MEEHAN, B.; MOFFETT, D.; MALONE, F.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S. PCV-2-associated PDNS in Northern Ireland in 1990. **Veterinary Record**, Londres, v.10, p.711-712, 2000.
4. ALLAN, G. M.; ELLIS, J. Porcine circovirus: A review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.12, p.3-14, 2000.
5. 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. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.121, p.1-11, 1999.
6. ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; MCMENAMY, M.; MCNAIR, I.; KRAKOWKA, S. G.; TIMMUSK, S.; WALLS, D.; DONNELLY, M.; MINAHIN, D.; ELLIS, J.; WALLGREN, P.; FOSSUM, C. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and non-affected farms in Ireland and Northern Ireland. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.19, p.668–673, 2007.
7. ALLAN, G. M.; MEEHAN, B.; TODD, D. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. **Veterinary Record**, Londres, v.142, p.467-468, 1998.
8. ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Zentralbl Veterinarmed**, Berlin, v.41, p.17–26, 1994.
9. ARAÚJO, E. G.; SOBESTIANSKY, J.; FERNANDES, L. T. F.; BRITO, L. A. B.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Circovirose suína - situação no Brasil. In: SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO, P. J.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. P. C. **Circovirose suína e circovírus suíno**. Goiânia: Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 2002, p. 51.

10. BARBOSA, C. N. **Circovírus suíno-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunoistoquímica e estudo sorológicos.** 2005. 96f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
11. BARTHASSON, D. L. **Identificação molecular do circovírus suíno tipo 2 e vírus da hepatite E em suínos de criações extensivas de Goiás.** 2009. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
12. BASTIANELLO, S. Pathology of postweaning multisystemic wasting syndrome in New Zealand pigs. **Surveillance, MAF biosecurity authority reporting New Zealand's animal health status**, Wellington, v.31, n.34, p.3-7, 2004.
13. BRASIL. Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília 21 de jun. 2002. Seção 1, pág. 201.
14. BRUNBORG, I. M.; JONASSEN, C. M.; MOLDAL, T.; BRATBERG, B.; LIUM, B.; KOENEN, F.; SCHONHEIT, J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.19, n.4, p. 368–375, 2007.
15. BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C. M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based realtime PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.122, n.2, p.171-178, 2004.
16. CASTRO, A. M. M. G.; RUIZ, V. L. A.; CASTRO JR, F. G.; BERSANO, J. G.; MORENO, A. M.; CORTEZ, A. Detecção e diferenciação de circovírus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos do estado de São Paulo. In: CONGRESSO RASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, Goiânia, 2003. **Anais...**, Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. p.107-108.
17. CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **The Veterinary Journal**, Genebra, v.169, n.3, p.326-336, 2005.
18. CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. **The Veterinary Journal**, Genebra, v.168, n.1, p.41-49, 2004.
19. CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; SEGALÉS, J.; DOMINGUÉZ, J.; DOMINGO, M. Immunohistochemical characterisation of PCV-2 associate lesions in lymphoid

and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.94, n.1-2, p.63-75, 2003.

20. CHIARELLI-NETO, O.; CASTRO, L. A.; SILVA, F. M. F.; BONFA, G.; SILVA JUNIOR, A.; MORAES, M. P.; ALMEIDA, M. R. Isolation of porcine circovirus type 2 (pcv) in animals from Espírito Santo state. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA e SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ONCOVIROLOGIA, 16. e 3., 2005, Salvador. **Virus Reviews & Research Journal of the Brazilian Society for Virology**, Rio de Janeiro, 2005., v.10. p.99.
21. CHIARELLI-NETO, O.; SILVA JUNIOR, A.; VIDIGAL, P. M. P.; SALGADO, R. L.; SILVA, F. M. F.; RISTOW, L. E.; FIETTO, J. L. R.; ALMEIDA, M. R. Diversidade molecular de diferentes isolados brasileiros do circovírus suíno 2. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13., 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRAVES, 2007.
22. CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D. Identificação de circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1480-1485, 2006.
23. CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N. Circovirose suína. . **Circular Técnica 37**, Concórdia: EMBRAPA/CNPSA, p. 1-12, 2003.
24. CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORÉS, N.; SCHIOCHET, M. F.; TROMBETTA, C. Diagnóstico molecular e caracterização de circovírus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2001, Porto Alegre. **Resumos...** Porto Alegre, 2001. p. 97-98.
25. CORRÊA, A. M. R. **Aspectos clínicos e patológicos da circovirose suína no Rio Grande do Sul**, 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
26. CORTEY, M.; PILERI, E.; SIBILA, M.; PUJOLS, J.; BALASCH, M.; PLANA, J.; SEGALÉS, J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. **The Veterinary Journal**, Genebra, v.27, 2010.
27. DARWICH, L.; SANDRINE, P.; ROVIRA A. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Journal of General Virology**, Londres, v. 84, p.2117-2125, 2003.
28. DEZEN, D.; RIJSEWIJK, F. A.; TEIXEIRA, T. F.; HOLZ, C. L.; CIBULSKI, S. P.; FRANCO, A. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; ROEHE, P. M. Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v.88, n.3, p.436-40, 2010.

29. DROLET, R.; LAROCHELLE, R.; MORIN, M.; DELISLE, B.; MAGAR, R.; Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.40, n.2, p.143–148, 2003.
30. DUPONT, K.; NIELSEN, E. O.; BEKBO, P.; LARSEN, L. E. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.128, n.1, p.56-64, 2008.
31. ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.; HAINES, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.39, n.1, p.44–51, 1998.
32. ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; McNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.11, n.1, p.3-14, 1999.
33. ELLIS, J.; SPINATO, M.; YONG, C.; WEST, K.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; CLARK, E.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G. Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.15, p.364–368, 2003.
34. FERNANDES, L. T.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; TROMBETTA, C.; SCHIOCHET, M. F.; KRAMER, B.; SOBESTIANSKY, J. Estudo da transmissão horizontal de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) entre suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: ABRATES, 2003. p.93.
35. FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; MORÉS, N.; CIACCI-ZANELLA, J. R. Surto de circovirose (síndrome definhante multissistêmica de suínos desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 39-53, 2005.
36. FRY, M.; MCGAVIN, D. Bone marrow, blood cells and lymphatic system. In: MCGAVIN, D.; ZACHARY, J. **Pathologic basis of veterinary diseases**. 1.ed. St Louis Missouri: Mosby Elsevier USA, 2007. p. 743-829.
37. GAVA, D.; ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in tissues by polimerase chain reaction (PCR) and by histopathology (HE) – a comparative study. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 16, 2005, Salvador. **Anais...** 2005, p.99.

38. GENZOW, M., SCHWARTZ, K., GONZALEZ, G., ANDERSON, G., CHITTICK, W., The effect of vaccination against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on the porcine circovirus-2 (PCV-2) load in porcine circovirus associated disease (PCVAD) affected pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 73, n.2, p.87–90, 2009.
39. GILPIN, D. F.; MCCULLOUGH, K.; MEEHAN, B. M.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I.; STEVENSON, L. S.; FOSTER, J. C.; ELLIS, J. A.; KRAKOWKA, S.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.94, n.3-4, p.149–16, 2003.
40. GIROTTO, A. Análise do Mercado Suinícola. **Anuário Suinocultura Industrial**, n.1, p.14-19, 2003.
41. GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LOPEZ-SORIA, S.; NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.128, n.2, p.23–35, 2008.
42. 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**, Genebra, v.87, p. 23–32, 2011.
43. GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v.119, n.4 p.144–151, 2007.
44. HA, Y.; AHN, K. K.; KIM, B.; CHO, K. D.; LEE, B. H.; OH, Y. S.; KIM, S. H.; CHAE, C. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in Milk from experimentally infected sows. **Research in Veterinary Science**, Edimburgo, v.86, n.1, p. 108-110, 2009.
45. HARDGE, T.; GAUMANN, H.; HASBERG, W.; LANGE, S. The economic impact of PMWS in the nursery – review of a successful control program. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASES, 4, 2003, Rome. **Proceedings...** International symposium on emerging and re-emerging pig diseases, 2003. p.223.
46. HARDING, J. C. S. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. In: WESTERN CANADIAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 21, 1996, Quebec. **Proceedings...** Quebec, Western Canadian Association of Swine Practitioners, 1996. p.21.
47. HARDING, J. C. S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.98, n.2, p.131-135, 2004.

48. HARDING, J. C. S.; CLARK, E. G.; STROKAPPE, J. H.; WILLSON, P. I.; ELLIS, J. A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome: epidemiology and clinical presentation. **Swine Health and Production**, v.6, n.2, p.249-254, 1998.
49. HARMS, P. A.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; BOLIN, S. R.; LAGER, K. M.; MOROZOV, I. ; PAUL, P. S. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.38, n.5, p.528-539, 2001.
50. HARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEO, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: An immune riddle. **Archives of Virology**, Viena, v.149, n.5, p.857-874, 2004.
51. HESSE, R.; KERRIGAN, M.; ROWLAND, R. R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. **Virus Research**, Amsterdam v.132, n.1, p.201–207, 2008.
52. JACOBSEN, B.; KRUEGER, L.; SEELIGER, F.; BRUEGMANN, M.; SEGALÉS, J.; BAUMGAERTNER, W. Retrospective study on the occurrence of porcine circovirus 2 infection and associated entities in Northern Germany. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.138, n.2, p.27–33, 2009.
53. JENSEN, T. K.; VIGRE, H.; SVENSMARK, B.; BILLE-HANSEN, V. Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. **Journal of Comparative Pathology**, Londres v.135, n.4, p.176–182, 2006.
54. KAMOGAWA, B. Suinocultura em Goiás. Produtores vêem oportunidades. **Cooperativa Agroindústria dos Produtores Rurais do Sudoeste Goiano**. [online] Goiânia, 26 mai. 2009. Disponível em: <http://www.comigo.com.br/listnot.php>. Acesso em 14 fev. 2011.
55. KARUPPANNAN, A. K.; JONG, M. H.; LEE, S-H et al. Attenuation of porcine circovirus 2 in SPF piglets by abrogation of ORF3 function. **Virology**, Nova York, v.383, n.2, p.338-347, 2009.
56. KIM J.; CHUNG H. K.; JUNG T.; CHO W. S.; CHOI C; CHAE C. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.64, n.1, p.57-62, 2002.
57. KIM, J.; CHAE, C. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.16, n.1, p.45-50, 2004.

58. KIM, J.; CHAE, C., Optimized protocols for the detection of porcine circovirus2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.92, n.2, p.105–111, 2001.
59. KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.128, n.1, p.52-59, 2003a.
60. KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, Genebra, v.166, v.3, p.251–256, 2003b.
61. KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; CHAE, C., Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.68, n.3, p.218–221, 2004.
62. KIUPEL, M.; STEVENSON, G. W.; KANITZ, C. L.; ANOTHAYANONTHA, L.; LATIMER, K. S.; MITTAL, S. K.; Cellular localization of porcine circovirus in postweaning pigs with chronic wasting disease. **European journal of veterinary pathology**, Cremona, v.5, n.2, p.77–82, 1999.
63. KIXMÖLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. **Vaccine** , Amsterdam, v.26, n.27, p. 3443-3451, 2008.
64. KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; McNEILLY, F.; WALDNER, C.; ALLAN, G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.17, n.3, p.213-222, 2005.
65. KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; McNEILLY, F.; WALDNER, C.; ALLAN, G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.17, n.3, p.213-222, 2005.
66. LIU Q.; WANG L.; WILLSON P.; O'CONNOR B.; KEENLISIDE J.; CHIRINO-TREJO M.; BMELÉNDEZ R.; BABIUK L. Seroprevalence of porcine circovirus type 2 in swine populations in Canada and Costa Rica. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.66, n.4, p.225-231, 2002.
67. LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q. et al. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. **Journal of Virology**, Washington, v.80, n.10, p. 5065–5073, 2006.
68. LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in Porcine Circovirus Type 2-infected cells and its role in virus-induced

apoptosis. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n.13, p. 8262-8274, 2005.

69. LIU, Q.; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L.A. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, n.9, p.3474-3477, 2000.
70. LÓPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J.; NOFRARIAS, M.; CALSAMIGLIA, M.; RAMIREZ, H.; MINGUEZ, A.; SERRANO, I.M.; MARIN, O.; CALLEN, A. Genetic influence on the expression of PCV disease. **Veterinary Record**, Londres, v.155, p.504, 2004
71. LUKERT, P. D.; ALLAN, G. M. Porcine circovirus. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Disease of Swine**. 8 ed. Iowa: Iowa State University Press/Ames, 1999, p.119-124.
72. LUKERT, P.; DE BOER, G. F.; DALE, J. L.; KEESE, P.; MCNULTY, M. S.; RANDLES, J. W.; TISCHER, I. Family Circoviridae. In: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. (ed.) **Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses**. 6ed. New York: International Committee on Taxonomy of Viruses, 1995, 168 p.
73. LUNA, L. G. **Manual of histological staining methods of the armed force institute of pathology**. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968, 258p.
74. MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R.; AMENNA, N.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France. Clinical observations from followup studies on affected farms. **Livestock Production Science**, Amsterdam v.63, n.3, p.223–233, 2000.
75. MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, R. A.; MENNA, N.; MORVAN, H.; TRUONG, C. M.; AHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observation from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 63, n.3, p. 223-233, 2000.
76. MADSON, D.; OPRIESSNIG, T.; PAL, N.; KUSTER, C.; RAMAMOORTHY, S.; MENG, X. L. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked sêmen. **Journal of Theriogenology**, Milão, v.72, n.6, p.747-754, 2009.
77. MAGAR, R.; LAROCHELLE, R.; THIBAUT, S.; LAMONTAGNE, L. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: a sequential study. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.123, n.4, p.258-269, 2000.

78. MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Veterinary Journal**, Londres, v.169, n.3, p.454-456, 2005.
79. MANDRIOLI, L.; SARLI, G.; PANARESE, S.; BALDONI, S.; MARCATO, P. S. Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Amsterdam, v.97, n.1-2, p.25-37, 2004.
80. MARTIN, H.; LE POTIER, M. F.; MARIS, P. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, Genebra v.177, v.3, p.388–393, 2008.
81. MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MECHAN, B. M.; FOSTER, J. C.; CLARKE, E. G.; ELLIS, J. A.; HAINES, D. M.; ADAIR, B. M.; ALLAN, G. M. A comparison of in situ hybridisation and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virological Methods**, Amisterdam, v.80, n.2, p.123–128,1999.
82. MEEHAN, B.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, 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. **Journal of General Virology**, Reading, v.79, p.2171-2179, 1998.
83. NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I.; BOLIN, S. R. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **Journal of General Virology**, Reading, v.81, p.2281–2287, 2000.
84. OPRIESSNIG, T.; FENAUX, M.; YU, S.; EVANS, R. B.; CAVANAUGH, D.; GALLUP, J. M.; PALLARÉS, F. J.; THACKER, E. L.; LAGER, K. M.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfectd with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v.98, n.5, p.209–220, 2004.
85. OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P. G.; YU, S.; THACKER, E. L.; FENAUX, M.; MENG, X. J. Effects of the timing of the administration of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin on the development of lesions associated with porcine circovirus type 2. **Veterinary Record**, Londres, v.158, n.5, p.149–154, 2006.
86. OPRIESSNIG, T.; MENG, X. J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.19, n.6, p.591–615, 2007.
87. OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A. R.; ELSENER, J.; MENG, X. J.; HALBUR,

- P.G. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v.15, n.2, p.397–401, 2008.
88. 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. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.73, n.2, p.81–86, 2009a.
 89. OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A. R.; MADSON, D. M.; PAL, N.; ROTHSCCHILD, M.; KUCHAR, 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 Piétrain pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign v.87, n.1, p.1582–1590, 2009b.
 90. PARK, J. S.; HA, Y.; KWON, B.; CHO, K. D.; LEE, B. H.; CHAE, C. Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.140, n.3-4, p. 208-211, 2009.
 91. PARK, J. S.; KIM, J.; Ha, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; LIM, J. K.; KIM, S. H., CHAE, C. Birth anomalies in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v. 132, n.2-3, p. 139-144, 2005.
 92. PESCADOR, C.; ROZZA, D. B.; ZLOTOWSKI, P.; BOROWISK, S. M.; BARCELLOS, D. E. S. N.; DERIEMEIER, D. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Resumos...** Goiânia: ABRAVES, 2003. p.105-106.
 93. PINTO F. F., LOBATTO Z. I. P., NASCIMENTO E. F., ROCHA M. A.; BARBOSA C. N. Detecção do circovírus suíno 2 (PCV-2) em tecidos coletados de suínos do Estado de Minas Gerais utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Resumos...**, Goiânia: ABRAVES, 2003. p. 103-104.
 94. QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J. M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**, Londres, v.149, n.12, p.357–361, 2001.
 95. RAYE, W.; MUHLING, J.; WARFE, L.; BUDDLE, J. R.; PALMER, C.; WILCOX, G. E. The detection of porcine circovirus in the Australian pig herd. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v.83, n.5, p.300–304, 2005.

96. ROSE, N.; ABHERVÉ-GUÉGUEN, A.; LE DIGUERHER, G.; EVENO, E.; JOLLY, J. P.; BLANCHARD, P.; OGER, A.; JESTIN, A.; MADEC, F. Effect of the Piétrain breed used as terminal boar on post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in the offspring in four PMWS-affected farms. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.95, n.3, p.177-186, 2005.
97. ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.37, n.6, p.687-692, 2000.
98. ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. M.; MCNEILLY, F.; LATIMER, K. S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, Londres, v.120, n.1, p.59-78, 1999.
99. ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J. A.; FOLCH, J. M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; DURAN, C. O.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, Londres, v.146, n.4, p.40-43, 2000.
100. ROVIRA, M.; BALASCH, J.; SEGALÉS, L.; GARCIA, J.; PLANA-DURÁN, C.; ELLERBROK, H.; MANKERTZ, A.; DOMINGO, M. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Porcine circovirus 2. **Journal of Virology**, Washington, v.76, n.7, p.3232-3239, 2002.
101. ROYER, R. L.; NAWAGITGUL, P.; HALBUR, P. G.; PAUL, P. S. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v.9, n.6, p.281-284, 2001.
102. SÁNCHEZ, R. E. JR; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H. J.; PENSART, M. B. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.95, n.1-2, p.15-25, 2003.
103. SARRADELL, J.; PEREZ, A. M.; COMBA, E.; PEREIRA, N.; ANTHONY, L.; ANDRADA, M.; SEGALÉS, J. Hallazgos patológicos en cerdos afectados con El síndrome del desmedro multisistémico postdestete de la República Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v.36, n.3, p.118-124, 2004.
104. SEGALÉS, J. Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v.10, n.6, p.277-281, 2002.
105. SEGALÉS, J. **Diagnóstico de la circovirosis porcina: criterios individuales y de granja**. 2008. Disponível em: http://www.3tres3.com/circovirosis_porcina/ficha.php?id=2049. Acesso em: 21/01/2011.

106. SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; QUINTANA, J.; DOMINGO, M. El síndrome de dermatitis y nefropatía porcina. **Porcine**, Madri, n. 56, p. 83-93, 2000.
107. SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A; SIBILA, M; BADIELLA, L; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.111, v.3-4, p. 223-229, 2005.
108. SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: A review. **Veterinary Quarterly**, Bilthoven, v.24, n.3, p.109-124, 2002.
109. SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.98, v.2, p. 137–149, 2004.
110. SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E.; MATEU-DE-ANTONIO, E. M.; ESPUNÃ, E.; DOMINGO, M. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. **The Veterinary Record**. Londres, v. 142, n.2 p.483-486, 1998.
111. SHIBAHARA, T.; SATO, K.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. Porcine circovirus induces Blymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.62, n.2, p.1125–113, 2000.
112. SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; KITAJIMA, K.; ASAI, T. Shedding of porcine circovirus into colostrum of sows. **Zoonosis and Public Heath**, Nova York, v.53, p. 278-280, 2006.
113. SHIBATA, I.; OKUGA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and faeces from experimentally infected pigs and field cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo v.65, n.3, p.405-408, 2003.
114. SIRINARUMITR, T.; MOROZOV, I.; NAWAGITGUL, P.; SORDEN, S. D.; HARMS, P. A.; PAUL, P. S. Utilization of a rate enhancement hybridisation buffer system for rapid in situ hybridisation for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.12, n.6, p.562–565, 2000.
115. SOBESTIANSKY, J. Transmissão de doenças. In: SOBESTIANSKY, J **Sistema intensivo de criação de suínos: programa de biossegurança**. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 2002. p. 36-40.
116. SOBESTIANSKY, J.; BARBARINO JR., P.; SEYBOTH, L.; MATOS, M. Circovirose suína e circovírus suíno. **Sanidade em Foco**, Goiânia, 52p., 2002.

117. SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health and Production**. Perry, v. 8, n.6, p.133-136, 2000.
118. STEINER, E.; BALMELLI, C.; HERRMANN, B.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. **Virology**, Nova York, v.378, n.2, p.311-322, 2008.
119. TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, Londres v.295, n.1, p.64-66, 1982.
120. TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, Viena, v.91, n.3-4, p.271-276, 1986.
121. TISCHER, I.; RASCH, R. e TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie**, Jena, v. 226, n.2, p.153-167, 1974.
122. TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. **Avian Pathology**, Houghton, v.29, n.3, p373-394, 2000.
123. TOMÁS, A.; FERNANDES, L. T.; VALERO, O.; SEGALÉS, J. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.132, n.3-4, p.260–273, 2008.
124. VICENTE, J.; SEGALÉS, J.; HOFLE, U.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J., DOMINGO, M.; GORTAZAR, C.,. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Research**, Paris, v.35, n.2, p.243–253, 2004.
125. VINCENT, I. E.; CARRASCO, C. P.; HERRMANN, B.; MEEHAN, B.; ALLAN, G. M.; SUMMERFIELD, A.; MCCULLOUGH, K. C. Dendritic cells: a Trojan horse for porcine circovirus type 2. In: Proc. INTERNATIONAL SYMPOSIUM EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASES, 4., 2003, Roma. **Anais...** Rome: University of Pharma, 2006. p.157.
126. 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. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Davis, v.11, n.5, p.530–532, 1999.
127. WIEDERKEHR, D. D.; SYDLER, T.; BUERGI, E.; HAESSIG, M.; ZIMMERMANN, D.; POSPISCHIL, A.; BRUGNERA, E.; SIDLER, X. A new emerging genotype

- subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.136, n.1-2, p.27–35, 2009.
128. ZANELLA, J. R. C. Circoviridae. In: **Virologia Veterinária**, Ed.FLORES, E. Virologia Veterinária.1.ed. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. cap.13, p. 363-374.
129. ZANELLA, J. R. C. Circovirose suína – reflexos e ações. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA E SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA. 7 e 2, 2005, Goiânia. **Anais...** p.13 -14.
130. ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.5, p.522-527, 2003.