

GISELI APARECIDA RITTERBUSCH

**ESTUDO DA PATOGENICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE CO-
INFEÇÃO POR *CIRCOVIRUS* SUÍNO E *TORQUE TENO* VÍRUS
SUÍNO EM MATERIAL PROVENIENTE DE PORCAS COM
PATOLOGIAS REPRODUTIVAS**

**Lages – SC
2009**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GISELI APARECIDA RITTERBUSCH

**ESTUDO DA PATOGENICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE CO-
INFEÇÃO POR *CIRCOVIRUS* SUÍNO E *TORQUE TENO* VÍRUS
SUÍNO EM MATERIAL PROVENIENTE DE PORCAS COM
PATOLOGIAS REPRODUTIVAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade do
Estado de Santa Catarina – UDESC,
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dr^a. Janice Reis Ciacci
Zanella

**LAGES – SC
2009**

GISELI APARECIDA RITTERBUSCH

**ESTUDO DA PATOGENICIDADE E INVESTIGAÇÃO DE CO-
INFECÇÃO POR *CIRCOVIRUS* SUÍNO E *TORQUE TENO* VÍRUS
SUÍNO EM MATERIAL PROVENIENTE DE PORCAS COM
PATOLOGIAS REPRODUTIVAS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de mestre, no curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, em Lages, 6 de novembro de 2009, pela banca examinadora:

Prof. Dr^a. Janice Reis Ciacci Zanella
Embrapa Suínos e Aves (Orientadora)

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
CAV – UDESC (Membro)

Dr. Paulo Augusto Esteves
Embrapa Suínos e Aves (Membro)

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho tenho muito a agradecer.

Inicialmente, à Dra. Janice Reis Ciacci Zanella, minha orientadora, pela excelente oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados, por toda a atenção dedicada, cada e-mail esclarecedor, por todo aprendizado que me proporcionou e espero que possamos trabalhar juntas novamente.

Ao pesquisador Nelson Mores, pela imensa contribuição e disponibilidade durante a execução do projeto de pesquisa.

À Camila, colega de todo trabalho, das inúmeras necropsias até as intermináveis amostras para processar. Depois de dois anos de parceria no trabalho e em casa, ficará uma bela amizade.

Às parceiras no trabalho, Neide, Kelen, Aline, por toda ajuda e apoio, sem os quais não teria chegado ao final desta etapa. Cada uma com sua grande parcela de contribuição faz parte da realização deste trabalho. A vocês, que hoje são amigas de verdade, agradeço de coração.

À Edi, que tantas vezes foi atrás de documentos, declarações e matrículas ao longo do curso, muito obrigada.

A toda equipe do laboratório de sanidade, Armando, Altair, Dejalmo, Valmor, Salete, que proporcionaram a execução do trabalho, desde a coleta de todo material até a obtenção dos resultados finais, sou grata.

Agradeço ao Programa de Mestrado da UDESC/CAV e a Embrapa Suínos e Aves, pela disponibilidade de estrutura para execução do projeto.

Agradeço especialmente ao meu noivo, Julio, pelo carinho, compreensão, amor, paciência, e principalmente pelo apoio incondicional, seja qual fosse minha decisão.

Dedico este trabalho aos meus pais, Alvorino e Maristela, que sempre acreditaram e torceram muito por mim, e a toda família, que de alguma forma faz parte desta conquista.

RESUMO

Muitos agentes infecciosos têm sido associados às falhas reprodutivas na produção de suínos, representando significativas perdas econômicas para os suinocultores. Recentemente o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2), agente etiológico da circovirose suína, foi associado a falhas reprodutivas em suínos em diversas partes do mundo. Para confirmar o potencial patogênico do PCV2 causando falhas reprodutivas em porcas, é necessário o isolamento do vírus e demonstração de antígeno e ácido nucléico viral em fetos. Outro agente viral, o Torque Teno Vírus (TTV), também foi recentemente associado às infecções causadas pelo PCV2. O TTV sozinho ainda não tem se mostrado patogênico em suínos, porém, seu papel em co-infecções com outros patógenos vem sendo investigado. O presente trabalho teve por objetivos diagnosticar o PCV2 em infecções naturais onde existiam falhas reprodutivas, assim como padronizar e aplicar a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para TTV a partir de órgãos. Amostras provenientes de casos clínicos de campo, como fetos abortados, mumificados, natimortos, leitões inviáveis e material de fêmeas descartadas foram coletadas e processadas para diagnóstico da infecção pelo PCV2 através de PCR e imunoistoquímica (IHQ). Foram colhidas amostras de 21 granjas produtoras de suínos, totalizando 169 fetos, que foram necropsiados para coleta de órgãos. Além disso, amostras de órgãos reprodutivos de 83 fêmeas descartadas foram colhidas em 4 abatedouros da região oeste catarinense. No presente estudo foi possível detectar DNA viral por PCR em 29 (17,1%) dos 169 fetos analisados, sendo coração e tecidos linfóides os órgãos onde o vírus foi identificado com maior frequência, 41,4% e 37,8%, respectivamente. A presença do vírus foi confirmada por teste de IHQ dos tecidos, sendo encontrado antígeno viral em 17 fetos positivos para PCV2 por PCR. As amostras de tecido reprodutivo das fêmeas também foram testadas por PCR e o PCV2 foi identificado em 4 porcas (4,8%). Visando a detecção de TTV foram testadas por PCR amostras de órgãos reprodutivos de fêmeas suínas, sendo diagnosticados os dois genótipos de TTV, TTV1 e TTV2 em 25 (30,1%) e 41 (49,3%) fêmeas, respectivamente. As amostras de fetos que resultaram positivas para PCV2 pela técnica de PCR também foram testadas para TTV, observando-se a ocorrência de coinfeção entre estes agentes. Os resultados obtidos evidenciam o provável envolvimento do PCV2 em falhas reprodutivas em fêmeas suínas, bem como mostram que o TTV está presente nas amostras analisadas, confirmando a associação com o PCV2.

Palavras chave: Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2), fetos, falhas reprodutivas, PCR, Torque Teno Vírus (TTV).

ABSTRACT

Many infectious agents have been associated with reproductive failure in swine, representing significantly economic losses for production. Recently, Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), etiologic agent of PCVAD or PCV2 associated diseases, was associated with reproductive failure in swine around the world. To confirm the pathogenic potential of PCV2 inducing reproductive failure in sows, it's necessary the viral isolation and antigen and nucleic acid demonstration in fetuses. Other viral agent, Torque Teno Vírus (TTV), also have been recently associated with infections caused by PCV2. TTV alone has not showed pathogenic signals in swine, but, its role in co-infections with other pathogens has been investigated. The present study aimed the diagnostic of PCV2 in natural infections where there was reproductive failure, as well as to establish and apply the Polimerase Chain Reaction (PCR) technique for TTV from organs. Samples from field cases, as aborted fetuses, mummified, stillborn, fragile piglets and material from abattoir sows were collected and processed to diagnostic infection in order to detect PCV2 by PCR and immunohistochemistry (IHC). Samples were collected from 21 farms; and a total of 169 fetuses were necropsied. Moreover, reproductive samples from 83 abattoir sows were collected in 4 slaughterhouses of Santa Catarina State. In the present study was possible detect viral DNA by PCR in 29 (17,1%) of 169 analyzed fetuses, where heart and lymphoid tissues showed virus DNA more frequently, 41,4% and 37,8%, respectively. Viral presence was confirmed by IHC in tissues, which detected viral antigens in 17 PCV2 positives fetuses by PCR. Samples of reproductive tissues from sows also were tested by PCR and PCV2 was identified in 4 sows (4,8%). PCR technique aimed to detect TTV was established for viral DNA from organs. Samples of reproductive tissues from sows were tested, and were found both genogroups of TTV (TTV1 and TTV2), in 25 (30,1%) and 41 (49,3%) sows, respectively. Fetuses samples that resulted positive to PCV2 by PCR were also tested to TTV, and it was observed the occurrence of co-infection between these agents. The results obtained here suggest the involvement of PCV2 in reproductive failure in sows, besides show that TTV was present in analyzed samples, corroborating the association with PCV2.

Keywords: Porcine Circovirus Type 2, fetuses, PCR, reproductive failure, Torque Teno Virus (TTV).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Procedimentos para colheita de material e desenvolvimento do estudo. 22
- Figura 2 – Exemplos de amostras de fetos recebidos para necropsia. A) Fetos abortados; B) Feto natimorto; C) Feto mumificado; D) Leitões inviáveis. Fonte: Ritterbusch, 2009. 23
- Figura 3 – Necropsia e coleta de órgãos dos fetos. A) Linfonodos inguinais; B) Abertura das cavidades torácica e abdominal; C) Coleta de fragmentos de coração e pulmão; D) Coleta de tecido nervoso: cérebro, cerebelo e medula. Fonte: Ritterbusch, 2009. 24
- Figura 4 – Órgãos reprodutivos de fêmeas suínas. A) Ovário ciclando; B) Mucosa uterina normal; C) Ovário cístico; D) Mucosa uterina com exudato purulento. Fonte: Ritterbusch, 2009. 24
- Figura 5 – Esquema dos 6 pares de *primers Forward* (F) e *Reverse* (R) e as respectivas posições de nucleotídeos utilizados para amplificação do genoma do PCV2. 30
- Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PCV2. (1)Timo – feto 70; (2) Linfonodo inguinal – feto 84; (3) Linfonodo mesentérico – feto 84; (4) Linfonodo submandibular – feto 84; (5) Baço – feto 86; (6) Cerebelo – feto 86; (7) Cérebro – feto 86; (8) Medula – feto 86; (9) Rim – feto 86; (10) Controle negativo 1 (água ultrapura); (11) Controle negativo 2 (água ultrapura); (12) Controle positivo (Fernandes et al., 2003b); (13) Marcador 100 pb (Cenbiot®). 33
- Figura 7 – Resultados dos testes de *nested-PCR* para PCV2 nos diferentes órgãos analisados. 35
- Figura 8 – Lesões histológicas nos tecidos fetais. Aumento 50X. A) Coração – feto 47: presença de infiltrado inflamatório mononuclear; B)Timo – feto 102: células gigantes multinucleadas; C) Timo – feto 88: células gigantes multinucleadas; D) Linfonodo – feto 110: células multinucleadas. 36

Figura 9 – Resultados dos testes de IHQ nos órgãos positivos para PCV2 por <i>nested-PCR</i>	37
Figura 10 – Órgãos de fetos positivos nos testes de IHQ, corados com DAB. A) Fígado: Marcação difusa; B) Fígado: presença de antígeno no citoplasma de hepatócito; C) Coração: presença de antígeno nos cardiomiócitos; D) Coração: necrose do miocárdio; E) Pulmão: marcação difusa no parênquima alveolar; F) Rim: marcação positiva em células dos túbulos renais. Controles dos testes de IHQ. G) Linfonodo de animal positivo: marcação difusa; H) Linfonodo de animal positivo: antígeno no citoplasma das células; I) Linfonodo controle negativo: ausência de marcação.....	38
Figura 11 – Clivagens com enzimas de restrição. A) Amostras A a P) produtos de PCR clivados com <i>Hinf</i> I. Q) Marcador 100 pb (Amersham®). B) Amostras A a P) produtos de PCR clivados com <i>Rsa</i> I. Q) Marcador 100 pb (Amersham®).....	39
Figura 12 – Alinhamento da seqüência amplificada (15608) com outras seqüências depositadas no GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).....	39
Figura 13 – Árvore filogenética apresentando as seqüências do Genbank utilizadas e a seqüência isolada neste estudo (15608)..	40
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR para detecção de TTV1 e TTV2 em órgãos reprodutivos de fêmeas suínas.....	51
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR para detecção de TTV1 e TTV2 em órgãos de fetos suínos positivos para PCV2. ...	60
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Reação <i>nested-PCR</i> para PCV1 a partir de órgãos de fetos suínos positivos para PCV2.	60
Figura 17 – Resultados dos testes de PCR para PCV1, TTV1 e TTV2 em amostras de órgãos de fetos positivos para PCV2.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência e posições de nucleotídeos dos <i>primers</i> da <i>outer</i> -PCR e <i>nested</i> -PCR para PCV2.	25
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação do genoma completo do PCV2..	30
Tabela 3 - Sequências utilizadas no alinhamento e análise filogenética. Nome de acesso ao Genbank, nome da seqüência na análise, país de origem e referência.	32
Tabela 4 - Resultados referentes aos órgãos positivos para PCV2 por <i>nested</i> -PCR.....	34
Tabela 5 - <i>Primers</i> senso e antisenso utilizados nas reações de PCR para TTV1 e TTV2.....	48
Tabela 6 - Resultados dos testes de <i>nested</i> -PCR em 83 amostras de ovário e útero e 71 amostras de líquido folicular ovariano de fêmeas suínas descartadas. Número e percentual de amostras positivas (%).	51
Tabela 7 - <i>Primers forward</i> e <i>reverse</i> utilizados nas reações de PCR para PCV1, TTV1 e TTV2.	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. <i>Circovirus</i> Suíno (PCV).....	14
2.2. <i>Torque Teno Virus</i> (TTV).....	18
3. OBJETIVOS	20

CAPÍTULO I

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>CIRCOVIRUS</i> SUÍNO TIPO 2 EM MATERIAL PROVENIENTE DE PORCAS COM PATOLOGIAS REPRODUTIVAS.....	21
---	----

1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Local de realização do experimento	22
2.2. Metodologia de coleta.....	22
2.3. Necropsia e coleta dos órgãos	23
2.4. Extração de DNA	25
2.5. Aplicação da técnica de PCR	25
2.6. Exame histopatológico.....	26
2.7. Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)	26
2.7.1. Preparação das lâminas e reidratação dos tecidos.....	27
2.7.2. Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase.....	27
2.7.3. Anticorpos primário e secundário.....	27
2.7.4. Revelação e contracoloração.....	28
2.7.5. Leitura e interpretação	28
2.8. Sequenciamento e caracterização molecular de amostras de PCV2 isoladas a partir de tecidos fetais	29
2.8.1. Reação de PCR	29
2.8.2. Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição	29
2.8.3. Amplificação do genoma do PCV2.....	29
2.8.4. Purificação do DNA e reação de sequenciamento.....	31
2.8.5. Análises das seqüências.....	31

3. RESULTADOS	33
3.1. Coleta de amostras	33
3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	33
3.3. Exame histopatológico	35
3.4. Imunohistoquímica (IHQ)	37
3.5. Sequenciamento e caracterização molecular de PCV2	38
4. DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÕES	45
CAPÍTULO II	46
PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DIAGNÓSTICO DE <i>TORQUE TENO</i> VÍRUS TIPO 1 E TIPO 2 (TTV1 E TTV2) A PARTIR DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS E FLUIDO FOLICULAR OVARIANO DE FÊMEAS SUÍNAS	46
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1. Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4. CONCLUSÕES	53
CAPÍTULO III	54
ESTUDO DE CO-INFECÇÃO ENTRE O <i>CIRCOVÍRUS</i> SUÍNO TIPO 1 (PCV1) E GENOGRUPOS 1 E 2 DE <i>TORQUE TENO</i> VÍRUS (TTV) SUÍNO EM FETOS INFECTADOS POR <i>CIRCOVÍRUS</i> SUÍNO TIPO 2 (PCV2)	54
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. Vírus e amostras de órgãos	56
2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	56
2.2.1. Detecção de PCV1	56
2.2.2. Detecção de TTV1 e TTV2	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de suínos representa atualmente uma das mais importantes atividades econômicas em vários países. No Brasil, a produção cresceu significativamente nos últimos anos e entre 2000 e 2008, as exportações de carne suína cresceram 708% em valor e 290% em volume (MDIC/Secex, 2009, comunicação pessoal ¹).

Com a intensificação da produção e a busca por melhores índices produtivos, houve um agravamento nos problemas sanitários dos rebanhos, que tornaram-se cada vez maiores, favorecendo o surgimento de enfermidades que acarretam grandes prejuízos econômicos (Sobestiansky et al., 2002).

As doenças reprodutivas no plantel das granjas de suínos são consideradas mundialmente a principal causa de prejuízo econômico. Existem duas classes principais de causas de doenças reprodutivas em fêmeas suínas. A primeira categoria é representada por agentes infecciosos que causam infecção primária do trato reprodutivo, representando 30-40% dos abortos, mumificados e natimortos. O segundo grupo inclui as toxinas, estresses ambientais e nutricionais e doenças sistêmicas da porca (de causa infecciosa ou não) (Almond et al., 2006). A manifestação clínica destas doenças é variável, dependendo do agente infeccioso e do estágio da gestação, sendo que podem ocorrer desde infecções subclínicas até a interrupção da gestação (Gresham, 2003).

O Circovirus Suíno tipo 2 (PCV2) é um agente de distribuição mundial que tem sido diagnosticado como agente causador de diversas manifestações clínicas, entre elas as falhas reprodutivas, que caracterizam-se pela ocorrência de abortos e elevação nos índices de natimortos e mumificados (Harding, 2004), trazendo grandes prejuízos aos produtores.

¹ Marcelo Mielle, Pesquisador em Economia, Embrapa Suínos e Aves.

Recentemente, um outro agente viral que foi identificado em suínos tem sido associado às infecções causadas pelo PCV2, o Torque Teno Vírus (TTV). Apesar de disseminado em suínos, a importância deste vírus ainda não está esclarecida, mas alguns estudos já indicaram um possível papel do TTV em exacerbar a patogenia causada pelo PCV2 em co-infecções em leitões (Kekarainen et al., 2006).

Neste contexto, o presente estudo objetivou verificar a presença de PCV2 em material proveniente de fêmeas suínas com patologias reprodutivas e fêmeas de descarte em abatedouros, através de metodologias específicas de detecção de DNA e antígeno viral, além de padronizar e utilizar a técnica de PCR para diagnóstico do TTV em amostras de órgãos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Circovirus Suíno (PCV)*

O Circovirus foi primeiramente identificado em 1974, como contaminante da linhagem celular PK-15, derivada de rins de suínos (Tischer et al., 1974). Estudos demonstraram que tratava-se de um vírus composto por genoma DNA circular de fita simples, com as extremidades covalentemente ligadas, o que originou o nome circovirus suíno (*porcine circovirus*, PCV), definido então como membro da família *Circoviridae* (Tischer et al., 1982).

São conhecidos dois tipos de PCV: o PCV1, que é considerado apatogênico para os suínos, e o PCV2, associado à diversas manifestações clínicas em suínos. São vírus pequenos, com cerca de 1760 nucleotídeos, não envelopados, cujo genoma, constituído de DNA, codifica 7 ORF's (*open reading frame* – regiões abertas de leitura), onde a ORF 1 codifica uma proteína essencial na replicação viral, a ORF 2 codifica a proteína formadora do capsídeo, a ORF 3 atua na indução de apoptose, enquanto as demais permanecem com a atividade desconhecida (Liu et al., 2005).

Primeiramente identificado no Canadá (Clark, 1997), o PCV2 está amplamente difundido entre as criações de suínos no mundo todo sendo indicado como agente etiológico da circovirose suína. No Brasil, o PCV2 associado a Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) foi diagnosticado pela primeira vez no ano 2000, no estado de Santa Catarina (Zanella e Mores, 2000). Apesar de ter sido reportada pela primeira vez em 2000, o circovirus suíno foi diagnosticado em materiais de arquivo de 1988, sugerindo que a infecção já estava presente no Brasil desde então (Ciacci-Zanella et al., 2006).

A circovirose suína pode se manifestar de diversas formas, porém a SMDS é a doença mais importante e mais estudada do total das seis causadas pela infecção pelo PCV2 (Allan e Ellis, 2000). As outras manifestações incluem a forma epidêmica da síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS), falhas reprodutivas, pneumonias, enterites e tremores congênitos.

A SMDS caracteriza-se pela elevada mortalidade em suínos nas fases de creche, crescimento - terminação (Allan et al., 1998). Clinicamente, causa emagrecimento progressivo, dispnéia, anemia, aumento do volume dos linfonodos superficiais inguinais, diarreia, icterícia e morte (Clark, 1997; Rosell et al., 1999). As lesões histopatológicas atribuídas à SMDS são observadas em diversos órgãos, mas predominantemente nos órgãos linfóides e pulmão. Essas lesões consistem em depleção linfocitária com presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (30-40% dos casos), que são encontrados nas áreas dos linfonodos dependentes de célula B, podendo ocorrer em células dispersas neste órgão. Essas células são geralmente da linhagem monocítica (macrófagos e células dendríticas). Também se observam lesões com ocorrência e frequência variável como hepatites, nefrites e pneumonia intersticial nos animais infectados. Na SDNS há predominância de lesões de pele e renais (Ellis et al., 1998; Rosell et al., 1999).

O mecanismo de ação do PCV2 para causar a circovirose suína ainda não está esclarecido. Sabe-se que a presença de co-fatores infecciosos, como estirpe viral do PCV2, e não infecciosos, como genética, estresse, nutrição, ambiência, manejo, e também elevada carga viral no hospedeiro, são importantes para a manifestação do quadro clínico, aparecimento e gravidade das lesões. A presença de enfermidades concomitantes como o parvovírus suíno (PPV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), vírus da Doença de Aujeszky (VDA), vírus da hepatite E, vírus da influenza, dentre outros, pode favorecer o desenvolvimento da doença ou exacerbar a manifestação clínica (Allan et al., 2004; Ellis et al., 2004, Fernandes et al., 2006).

Além da SMDS, recentemente o PCV2 tem sido associado a distúrbios reprodutivos em fêmeas suínas, sendo descritos tanto natural como experimentalmente, caracterizados pela ocorrência de abortos, natimortalidade

e mumificação fetal (Bogdan et al., 2001; Pensaert et al., 2004; Maldonado et al., 2005; Pittman, 2008).

O primeiro relato de caso de PCV2 associado à falhas reprodutivas em suínos ocorreu em 1999 (West et al., 1999), no qual o PCV2 foi descrito como agente causador de abortos e aumento na incidência de fetos natimortos e mumificados em uma granja que havia sido povoada com porcas primíparas, sugerindo que o PCV2 estaria associado à ineficiência reprodutiva do rebanho.

Estudos posteriores confirmaram que o PCV2 está diretamente associado à falhas reprodutivas, causando lesões em fetos suínos (Kim, 2004b, Allan, 2006; Pittman, 2008).

Para diagnosticar as falhas reprodutivas devido a infecção pelo PCV2 é importante observar os seguintes critérios diagnósticos: presença de abortos e/ou natimortos e/ou mumificados; presença de lesões no tecido cardíaco dos fetos (miocardite não supurativa); presença de PCV2 em lesões do miocárdio e em outros tecidos fetais como linfonodos (Kim et al., 2004b; Mikami et al., 2005, Allan, 2006). Para isso, métodos para detecção do PCV2 em tecidos, de forma a correlacionar sua presença com as lesões microscópicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a imunohistoquímica (IHQ) estão sendo utilizados.

A técnica de PCR é rápida, sensível e específica, capaz de detectar um único vírus, produzindo fragmentos de DNA específico, mesmo na presença de outros microrganismos sem a necessidade de isolamento individual deste vírus (Rosell et al., 2000; Fernandes et al., 2006). Tal técnica tem sido utilizada para amplificar e sequenciar o genoma do PCV2, isolado de diferentes materiais (órgãos, sangue, sêmen, saliva) a fim de comparar os vírus detectados em casos clínicos (Mankertz et al., 2000). Atua como excelente ferramenta para diagnóstico em populações, permitindo tomar as medidas necessárias para evitar a transmissão do agente e reduzir ou eliminar a apresentação da doença, o que lhe dá uma grande vantagem sobre as demais técnicas.

A IHQ também vem sendo empregada para confirmação da presença do antígeno viral nos tecidos de fetos acometidos pela infecção pelo PCV2. É uma técnica bastante sensível, porém, possui limitação devido a dificuldade de produção de anticorpos monoclonais (McNeilly et al., 1999).

Desta forma, Pittman (2008) e West et al. (1999) identificaram DNA de PCV2 por PCR em amostras de órgãos de fetos abortados e natimortos, colhidos em uma granja de suínos que passava por um surto de distúrbios reprodutivos, onde antígeno de PCV2 foi detectado no tecido cardíaco dos fetos através de IHQ, observando extensa marcação de antígeno no miocárdio.

Mikami et al. (2005), aplicando a técnica de PCR e IHQ demonstraram a infecção pelo PCV2 em fetos que apresentavam lesões de fibrose e degeneração do miocárdio, com infiltrado de macrófagos e linfócitos, além de depleção linfóide no baço, timo, tonsila e linfonodos.

Sanches et al. (2003), inoculando fetos *in útero*, observaram que as células alvo do PCV2 durante o desenvolvimento fetal são os cardiomiócitos, hepatócitos e macrófagos, sugerindo que estas células são importantes para o diagnóstico do PCV2 em fetos.

Estudos de seqüências genômicas classificam o PCV2 em dois subgrupos distintos, denominados PCV2a e PCV2b, de acordo o genoma descrito para diferentes isolados do vírus. Esta terminologia refere-se à similaridade das amostras quando comparadas aos isolados Norte Americanos ("a") e Europeus ("b"), de acordo com padrões de restrição de fragmentos (Horlen et al., 2007). A principal diferença entre os subgrupos está localizada na região da ORF2, onde as seqüências de nucleotídeos apresentam 90% de identidade. Outra diferença está no tamanho do genoma, PCV2a possui 1768 nucleotídeos, enquanto PCV2b tem 1767 (Hesse et al., 2008). Recentemente, Segalés et al. (2008) publicaram um estudo onde sugerem a unificação da nomenclatura para os genótipos de PCV2 existentes, demonstrando através de análise de frequência quais os genótipos identificados por pesquisadores do mundo todo. A partir desta publicação, foi proposto nomear os genótipos de PCV2 como PCV2a, PCV2b e PCV2c, estabelecendo seqüências depositadas no GenBank como protótipos para cada um, sendo as seqüências de acesso número AF055392 para PCV2a, AF055394 para PCV2b e EU148503 para PCV2c. Cabe ressaltar que até o momento, somente três seqüências do isolado de PCV2c foram identificadas em amostras da Dinamarca da década de 1980, enquanto a SMDS ainda não havia sido detectada.

Allan et al. (2006) demonstraram que variações mínimas na ORF2 são capazes de causar variações em nucleotídeos e amino-ácidos podendo levar a

diferenças de patogenicidade entre os genótipos de PCV2. No Brasil já foram identificados os genótipos PCV2a e PCV2b, sugerindo a ampla disseminação do agente (Ciacci-Zanella et al., 2009a).

2.2. Torque Teno Vírus (TTV)

O TTV foi primeiramente descoberto em humanos no ano de 1997, em um paciente japonês que apresentou um quadro de hepatite de etiologia desconhecida. O vírus foi detectado em amostra de soro do paciente, e, após amplificação, clonagem e sequenciamento do genoma viral, verificou-se que não apresentava similaridade com nenhuma seqüência conhecida (Nishizawa et al., 1997). Tratava-se de um vírus novo, pequeno, com cerca de 30-50 nanômetros de diâmetro, não envelopado e com fita simples de DNA circular (Okamoto et al., 1998). Vários genótipos tem sido identificados, porém, até o momento, o TTV não tem sido ligado a nenhuma doença específica (Jelcic et al., 2004).

Foram encontradas algumas similaridades na organização do genoma e na regulação dos sítios de transcrição com o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV), um patógeno da família *Circoviridae* (Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999), contudo, com base em análises filogenéticas, o TTV foi incluso no gênero *Anellovirus* (Okamoto et al., 2002).

O mecanismo de replicação do TTV permanece desconhecido, porém especula-se, baseado em similaridades com outros vírus de DNA circular, que o TTV use o mecanismo de círculo rolante. O vírus utiliza uma fita de DNA intermediário gerada pela célula do hospedeiro durante a fase de síntese do ciclo celular como molde para a geração do DNA viral (Mushahwar et al., 1999).

Em suínos, dois genótipos de TTV (TTV1 e TTV2) tem sido detectados (Niel et al., 2005), porém, poucas informações sobre a epidemiologia da infecção pelo TTV estão disponíveis atualmente.

Segundo Sibila et al. (2009), a infecção pelo TTV ocorre precocemente nos sistemas de produção e pode ser transmitido tanto da porca para os leitões, quanto de leitão para leitão. Ambos TTVs foram detectados em frações

de colostro e amostras de soro de leitões recém nascidos, indicando a rota de transmissão vertical (Martínez-Guinó et al., 2009).

Kekarainen et al. (2006) relatam que o TTV está disseminado na população de suínos da Espanha. Além disso, investigaram a presença de TTV1 e TTV2 em amostras de soro de suínos infectados e não infectados pela SMDS, e determinaram alta prevalência dos dois genogrupos nos animais testados.

Ellis et al. (2008) relataram que a inoculação de TTV1 em leitões gnotobióticos antes da infecção pelo PCV2, facilitou o desenvolvimento da SMDS.

O TTV em suínos ainda não tem se mostrado patogênico, contudo, seu papel em co-infecções com outros patógenos, principalmente com o PCV2 vem sendo investigado e a dinâmica de infecção e excreção do vírus permanece desconhecida.

3. OBJETIVOS

- Selecionar granjas produtoras de suínos que apresentam histórico de falhas reprodutivas, detectadas através da aplicação de um questionário específico;
- Diagnosticar o PCV2 em infecções naturais em rebanhos suínos onde existam falhas reprodutivas;
- Realizar sequenciamento e caracterização molecular de amostras de PCV2 isoladas durante o desenvolvimento do estudo.
- Padronizar a técnica de PCR para diagnosticar TTV1 e TTV2 em amostras de órgãos;
- Testar amostras de órgãos reprodutivos de fêmeas suínas para detecção de TTV1 e TTV2;
- Investigar a ocorrência de co-infecção entre PCVs e TTVs em fetos suínos provenientes de fêmeas com patologias reprodutivas;

CAPÍTULO I

DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *CIRCOVIRUS* SUÍNO TIPO 2 EM MATERIAL PROVENIENTE DE PORCAS COM PATOLOGIAS REPRODUTIVAS E DE PORCAS DESCARTADAS

1. INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes síndromes causadas pelo PCV2, falhas reprodutivas tem sido relatadas e já foram descritas, tanto natural como experimentalmente. Sinais clínicos são descritos como aumento nos casos de abortos, mumificação fetal, natimortos e nascimento de leitões inviáveis (Pittman, 2008).

Recentemente, um estudo retrospectivo realizado com tecidos de fetos suínos colhidos entre 1995 e 1998 não detectou nenhum ácido nucléico ou antígeno de PCV2 por PCR ou IHQ (Bogdan et al., 2001), demonstrando que os distúrbios reprodutivos associados ao PCV2 podem constituir manifestações recentes da doença.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou verificar a presença de PCV2 em material proveniente de fêmeas com patologias reprodutivas, como fetos abortados, natimortos, mumificados, leitões inviáveis, bem como avaliar órgãos reprodutivos de fêmeas suínas descartadas. Além disso, objetivou realizar a caracterização molecular do PCV2 isolado a partir de amostras obtidas durante o estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de realização do experimento

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), localizado na cidade de Concórdia/SC, no Complexo de Sanidade e Genética Animal, laboratórios de Virologia e Histopatologia.

2.2. Metodologia de coleta

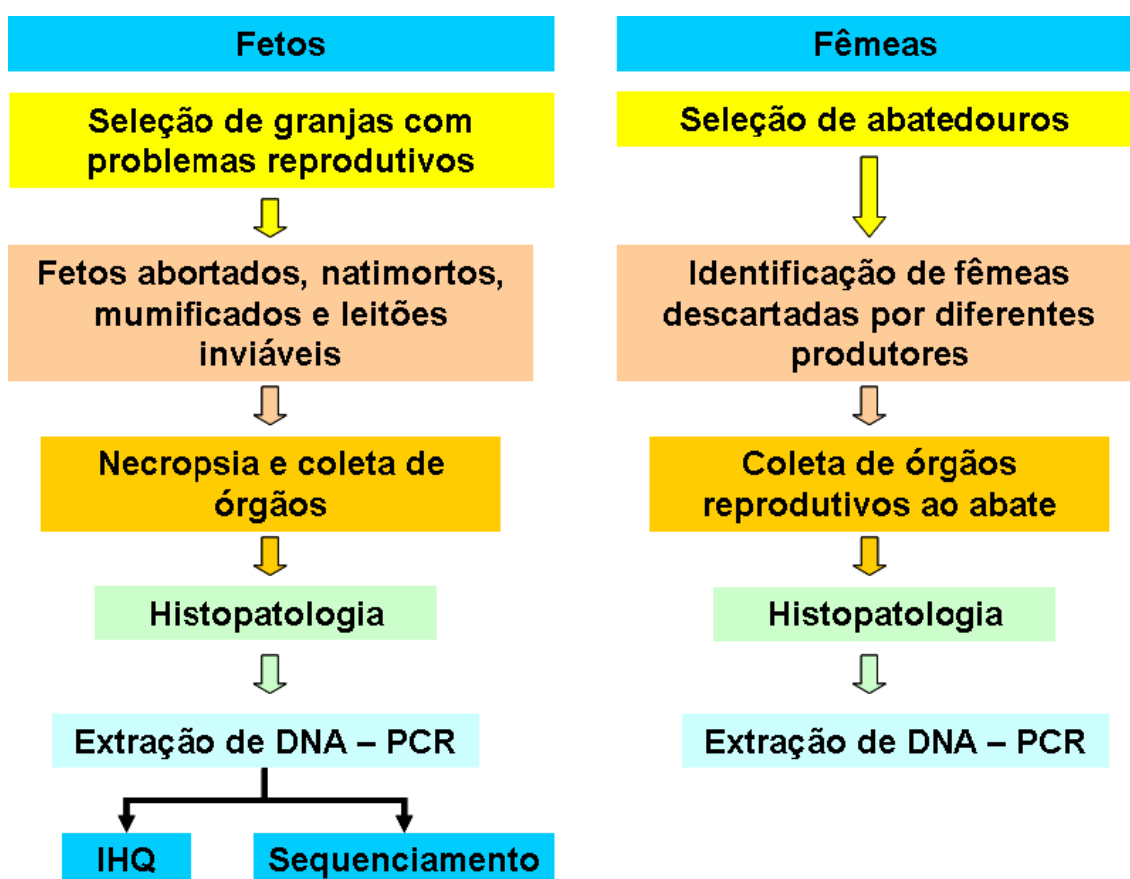


Figura 1 – Procedimentos para coleta de material e desenvolvimento do estudo.

Inicialmente, os produtores de suínos foram contatados e convidados a participar do projeto de pesquisa que visava diagnosticar agentes causadores de falhas reprodutivas em matrizes suínas. Em seguida, um questionário (ANEXO 1) previamente elaborado foi aplicado aos produtores, com o objetivo

de identificar os índices reprodutivos da granja naquele período. Com isso, as granjas que apresentavam pelo menos um item com alterações detectadas pelos parâmetros estabelecidos no questionário foram incluídas no projeto. A amostragem foi realizada em 21 granjas produtoras de suínos de SC e PR, no período de julho de 2008 a maio de 2009.

Amostras provenientes de casos clínicos, como fetos abortados, leitões natimortos, mumificados ou inviáveis (Figura 2), eram enviadas ao laboratório sob refrigeração para realização das necropsias, com exceção dos leitões inviáveis, que eram levados vivos e sacrificados pelo método de eletrochoque para posteriormente serem necropsiados.

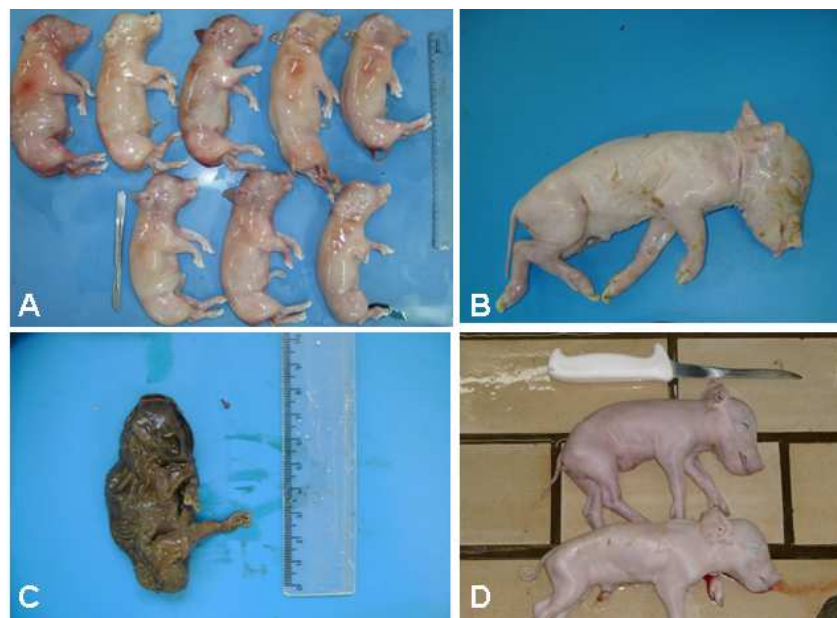


Figura 2 – Exemplos de amostras de fetos recebidos para necropsia. A) Fetos abortados; B) Feto natimorto; C) Feto mumificado; D) Leitões inviáveis. Fonte: Ritterbusch, 2009.

2.3. Necropsia e coleta dos órgãos

Na necropsia dos fetos foram coletados os seguintes órgãos: coração, pulmão, fígado, baço, timo, rim, cérebro, cerebelo, medula e linfonodos mesentéricos, inguinais e submandibulares (Figura 3), sendo que em alguns fetos mumificados ou abortados não foi possível coletar todos os órgãos devido ao avançado estado de decomposição ou tamanho reduzido. Eram colhidos dois fragmentos de cada órgão, um armazenado em solução de formol 10%

tamponado, para diagnóstico histopatológico, e outro sob refrigeração, para realização dos testes virológicos.

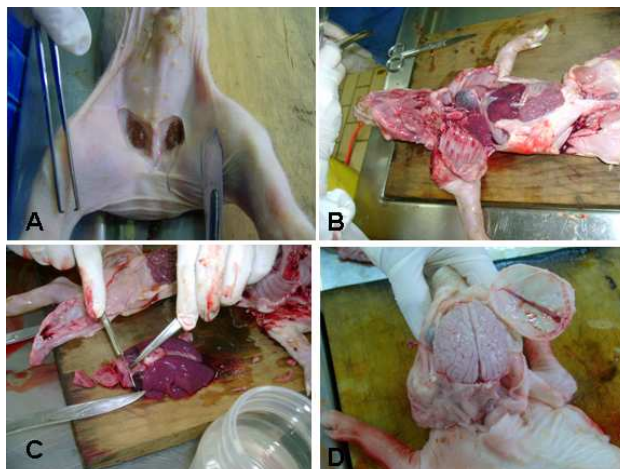


Figura 3 – Necropsia e coleta de órgãos dos fetos. A) Linfonodos inguinais; B) Abertura das cavidades torácica e abdominal; C) Coleta de fragmentos de coração e pulmão; D) Coleta de tecido nervoso: cérebro, cerebelo e medula. Fonte: Ritterbusch, 2009.

Além disso, em quatro abatedouros da região oeste e meio oeste catarinense, foi coletado material proveniente de porcas descartadas por diferentes produtores, sem considerar a causa do descarte. Em cada abatedouro foram colhidas amostras provenientes de cinco granjas diferentes, sendo coletado material de três a cinco porcas por proprietário, totalizando 83 fêmeas amostradas. Destas fêmeas, foram colhidos um fragmento de cada corno uterino e os ovários (Figura 4), armazenados um em formol e outro sob refrigeração. Fluido folicular ovariano também foi colhido, sendo obtido através de aspiração com seringas e agulhas descartáveis.

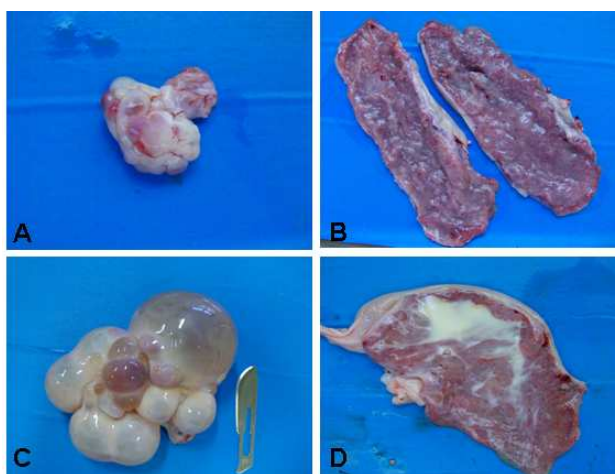


Figura 4 – Órgãos reprodutivos de fêmeas suínas. A) Ovário ciclando; B) Mucosa uterina normal; C) Ovário cístico; D) Mucosa uterina com exudato purulento. Fonte: Ritterbusch, 2009.

2.4. Extração de DNA

Para extração do DNA viral, utilizou-se a técnica descrita por Kim et al. (2001a), com alterações. Os órgãos coletados foram macerados, e assim como o fluido folicular, tratados com tampão de lise (200 mM NaCl, 100 mM Tris Base pH 7,5, 20 mM EDTA 0,5 M pH 8,0 e 1% SDS), digeridos com 20 µg/µL de proteinase K (Invitrogen[®]), incubados em banho-maria a 56°C por 4 horas, seguido por extração com fenol (Invitrogen[®]), clorofórmio (Sigma[®]) e álcool isoamílico (Vetec[®]), nas proporções 25:24:1. Em seguida, o DNA foi precipitado com etanol absoluto e acetato de sódio (3 M pH 5,2), permanecendo por 20 horas a -20°C. Após, as amostras foram centrifugadas a 14000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e lavado com etanol 75%. Finalmente, o DNA precipitado foi ressuspendido em 100 µL de TE (10 mM Tris Base pH 7,5 e 1 mM EDTA 0,5 M pH 8,0) e armazenado a -70°C.

2.5. Aplicação da técnica de PCR

Para amplificação de um segmento do genoma do PCV2, foram utilizadas seqüências de *primers* específicas para a ORF2, uma região bastante conservada entre os isolados do vírus. Os *primers* para as reações *outer-PCR* e *nested-PCR*, que permitiram a amplificação de produtos de 481 e 225 pares de bases (pb), respectivamente, foram descritos por Kim et al., (2001a), como demonstrado abaixo (Tabela 1).

Tabela 1- Sequência e posições de nucleotídeos dos *primers* da *outer-PCR* e *nested-PCR* para PCV2.

<i>Primers</i>	Sequências	Posição
<i>Outer-forward</i>	5'– CGG ATA TTG TAG TCC TGG TCG – 3'	1095-1115
<i>Outer-reverse</i>	5'– ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A – 3'	1570–1549
<i>Nested-forward</i>	5'– GAT TGT ATG GCG GGA GGA GT – 3'	1286-1305
<i>Nested-reverse</i>	5'– ATT GAC GAC TTT GTT CCC CC – 3'	1510-1491

Fonte: Kim et al. (2001a).

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, sendo 2 µL de DNA da amostra a ser testada com concentração entre 10 e 30 nanogramas

(determinada através de comparação com marcador de peso molecular Lambda[®]) e 23 µL de uma mistura com 1 µL de cada *primer outer-forward* e *outer-reverse* (10 pmol), 1,2 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), tampão para PCR, 0,4 mM de DNTPs (Invitrogen[®]) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]). A amplificação das reações foi realizada em termociclador (Mastercycler Eppendorf[®]) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 65°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (Kim et al., 2001). A *nested-PCR* foi executada conforme a reação anterior, porém, substituindo o DNA por 2 µL do produto amplificado na *outer-PCR* e utilizando os *primers nested-forward* e *nested-reverse*.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com 5 µg/mL de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Amersham[®]).

Para controle positivo das reações utilizou-se amostra referência para PCV2, com identidade comprovada através do sequenciamento do genoma viral (Fernandes et al., 2003b). Já para o controle negativo das reações, foi utilizada água ultra pura.

2.6. Exame histopatológico

As amostras de órgãos fixadas em formol 10% tamponado foram processadas em equipamento histotécnico automático, sendo desidratadas, diafinizadas e inclusas em parafina. Cortes histológicos de 3-4 µm foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) (Luna, 1968) para diagnóstico histopatológico em microscópio óptico.

2.7. Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi aplicada seguindo a metodologia descrita por Gava et al. (2008), com adaptações.

Foram testadas amostras de tecidos de fetos que resultaram positivos para PCV2 nos testes por *nested*-PCR. Como controle positivo do teste utilizou-se cortes de linfonodos de animal positivo para PCV2, confirmado por *nested*-PCR. Para controle negativo foram utilizados cortes de linfonodos de animais SPF (Specific Pathogen Free – livre de patógenos específicos), provenientes da Embrapa Suínos e Aves, também testados por *nested*-PCR. Para aplicação da técnica foram seguidos os passos descritos a seguir.

2.7.1. Preparação das lâminas e reidratação dos tecidos

As lâminas de vidro foram submersas em solução de poly-L-lisina (Sigma Aldrich®) 10% em água destilada por 5 minutos, secas em estufa a 60°C para receberem os cortes de tecidos seccionados em 3-4 µm de espessura. Em seguida, foram colocadas em estufa a 60°C por 20 minutos, desparafinadas em três banhos de xilol por 10 minutos cada, reidratadas em solução de álcool decrescente de 100%, 96%, 80% e 70%, por 5 minutos em cada concentração, e lavadas por cinco minutos em solução salina tamponada (PBS solução de lavagem – Anexo 2).

2.7.2. Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase

Para recuperação antigênica foi utilizada tripsina 0,1%, a qual foi aplicada diretamente sobre o tecido, em quantidade suficiente para cobrir cada corte. As lâminas foram mantidas por 10 minutos em estufa a 37°C e posteriormente lavadas em PBS por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da imersão das lâminas por 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio com concentração final 3%, seguido de lavagem das mesmas em PBS por 5 minutos e secagem das bordas dos tecidos.

2.7.3. Anticorpos primário e secundário

O anticorpo primário utilizado foi anticorpo policlonal anti-ORF2 do PCV2 produzido em coelho (preparado pela Iowa State University e cedido pelo professor David Driemeier – UFRGS), com diluição 1:2000 em solução salina tamponada (PBS pH 7,4), aplicado sobre cada corte de tecido, cobrindo-o completamente. As lâminas foram incubadas durante uma hora e meia em estufa a temperatura de 37°C e em seguida lavadas em PBS por 5 minutos.

Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo biotinizado, fornecido pelo kit “LSAB System HRP” (Dako Cytomation®), o qual foi aplicado sobre os tecidos, que foram incubados durante 30 minutos em estufa a 37°C, seguido por lavagem em PBS. Após, as lâminas foram novamente incubadas durante 30 minutos a 37°C com o conjugado Streptavidin – HRP cobrindo cada tecido. Fez-se nova lavagem em PBS e as bordas dos tecidos foram secas com papel absorvente para aplicação do revelador.

2.7.4. Revelação e contracoloração

Como revelador utilizou-se o substrato diaminobenzidina (DAB Kit LSAB – Dako®), conforme instruções do fabricante. O substrato foi aplicado de modo a cobrir toda a extensão dos tecidos e em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 5 minutos. Para paralisar a reação, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos, seguida pela contracoloração em hematoxilina de Harris por 1 minuto e nova lavagem em água destilada por 5 minutos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas por passagem rápida em soluções crescentes de álcool e montadas com lamínulas e Entellan (Merck®).

2.7.5. Leitura e interpretação

A leitura do teste foi realizada em microscópio óptico, observando-se a distribuição do antígeno viral nos tecidos. Para melhor interpretação dos resultados, estabeleceram-se os seguintes parâmetros: reação negativa – ausência de marcação no tecido; reação positiva fraca – marcação em menos de 25% do tecido; reação positiva moderada – marcação entre 25 e 50% do tecido; reação positiva forte – marcação acima de 50% do tecido.

2.8. Sequenciamento e caracterização molecular de amostras de PCV2 isoladas a partir de tecidos fetais

2.8.1. Reação de PCR

Amostras de órgãos de fetos suínos foram processadas para extração de DNA conforme descrito nos itens 2.4 e 2.5, das quais foram selecionadas 15 amostras de tecidos positivos para PCV2 por *nested*-PCR e confirmados por IHQ, processadas para caracterização molecular do PCV2. A partir do DNA extraído, foram realizadas reações de PCR utilizando um par de *primers* descrito por Mankertz et al. (2000), correspondentes às seqüências de nucleotídeos 1416–1439 (*Forward* 5' – AGAAACAAGTGGTGGGATGGTTAC – 3') e 298–277 (*Reverse* 5' - CCATACAATCCCCAACCCTTC – 3'), que amplificam fragmentos de 618 pares de bases.

2.8.2. Digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição

Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Hinf* I (Gibco BRL[®]) e *Rsa* I (Invitrogen[®]), que possuem sítios de clivagem identificados no genoma do PCV2, conforme descrito por Hamel et al. (2000). Foram encontrados diversos padrões de clivagem e as amostras separadas em grupos de acordo com os sítios de clivagem que apresentaram.

2.8.3. Amplificação do genoma do PCV2

As amostras selecionadas foram submetidas à amplificação do genoma completo do PCV2, que foi realizada com 6 pares de *primers* previamente descritos por Mankertz et al. (2000), conforme apresentados na tabela 2. As reações foram executadas em volume final de 25 µL contendo 15 pmol de cada *primer*, 1,6 mM de MgCl₂ (exceto para o primer 4, onde utilizou-se 2,4 mM), 0,8 mM de DNTPs (Invitrogen[®]), tampão para PCR e 2,5 U de Taq Platinum Polimerase (Invitrogen[®]).

As ampliações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Eppendorf®), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 12 minutos, 42 ciclos com desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento dos *primers* a 52°C por 20 segundos para os *primers* 1, 2, 3 e 6, 56°C por 20 segundos para os *primers* 4 e 5, extensão a 72°C por 45 segundos, seguida por extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 2- *Primers* utilizados para amplificação do genoma completo do PCV2.

<i>Primers</i>	Seqüência	Posição dos nucleotídeos	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>Forward1</i>	GAG TCA AGA ACA GGT TTG GGT GTG	233–256	503
<i>Reverse1</i>	ACG TAT CCA AGG AGG CGT TAC C	735–714	
<i>Forward2</i>	TTT CCT TCT CCA ACG GTA GCG	616–636	593
<i>Reverse2</i>	GCT CTC CAA CAA GGT ACT CAC AGC	1208–1185	
<i>Forward3</i>	AGC TCC TCG ATC TCA AGG ACA AC	1145–1167	554
<i>Reverse3</i>	CCG TGG ATT GTT CTG TAG CAT TC	1698–1676	
<i>Forward4</i>	AAT GCT ACA GAA CAA TCC ACG GAG	1677–1700	392
<i>Reverse4</i>	CCA TAC AAT CCC CCA ACC CTT C	298–277	
<i>Forward5</i>	GGT TTG TAG CCT CAG CCA AAG C	172–193	416
<i>Reverse5</i>	GCA CCT TCG GAT ATA CTG TCA AGG	587–564	
<i>Forward6</i>	AGA AAC AAG TGG TGG GAT GGT TAC	1416–1439	333
<i>Reverse6</i>	TGG AAA TTC AGG GCA TGG G	1748–1730	

Fonte: Mankertz et al. (2000).

Cada par de *primers* utilizado amplificava uma determinada região do PCV2 e ao fim obtinha-se o genoma completo do vírus, como demonstrado na figura 5. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (5 µg/mL), e posteriormente visualizados sob luz UV. Um marcador de peso molecular foi utilizado para comparar o tamanho dos fragmentos amplificados.

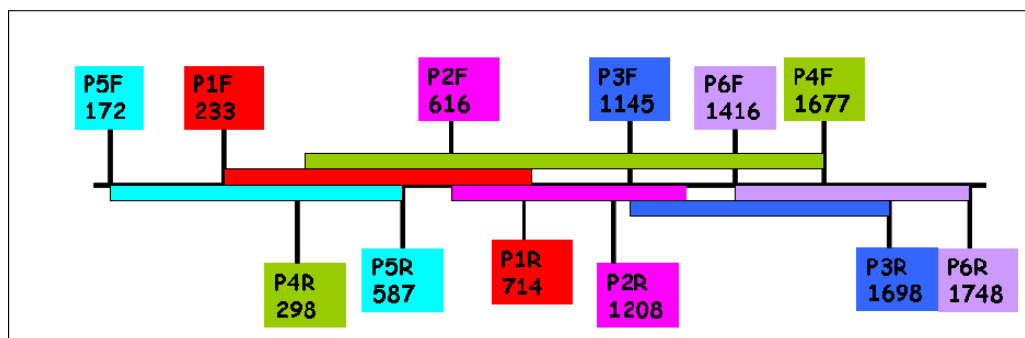


Figura 5 – Esquema dos 6 pares de *primers* *Forward* (F) e *Reverse* (R) e as respectivas posições de nucleotídeos utilizados para amplificação do genoma do PCV2, (representado pela linha preta).

2.8.4. Purificação do DNA e reação de sequenciamento

As amostras que apresentavam amplificações únicas e com tamanho de fragmento esperado para cada *primer* foram selecionadas, sendo somente as amostras E, F e N, as quais foram purificadas direto da reação de PCR, utilizando-se o kit de purificação GFX (GE Healthcare[®]), conforme instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi preparada a partir do DNA purificado juntamente com kit comercial, através da metodologia de Terminação da Cadeia (DYEanamic ET terminators sequencing kit - GE Healthcare[®]), utilizando-se o equipamento tipo ABI3130 (Applied Biosystems[®]), segundo orientações do fabricante. A qualidade das seqüências foi avaliada com o programa Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems[®]) e seqüências consenso foram criadas usando o programa Vector NTI (Invitrogen[®]).

2.8.5. Análises das seqüências

As seqüências obtidas foram alinhadas a outras seqüências depositadas no GenBak utilizando-se o programa ClustalW versão 1.83 (Thompson et al., 1994) que consta no pacote do programa BioEdit versão 7.0.5 (Hall, 1999). As seqüências depositadas no GenBank foram localizadas através do programa BLAST (AltschuL et al., 1990). Posterior análise filogenética foi realizada utilizando-se o programa MEGA 4.0 (baseado nos parâmetros Neighbor-Joining, Kimura 2 e Bootstrap 250 replicações, segundo Kumar et al., 2004), comparando com as seqüências descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Sequências utilizadas no alinhamento e análise filogenética. Nome de acesso ao GenBank, nome da seqüência na análise, país de origem e referência.

Acesso	Nome	País	Referência
DQ861896	am22/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ861897	am4/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ861898	am3/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ861900	am7/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ861901	am2/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ861902	am21/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ364650	BRA1	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ923523	15/5P/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
DQ923524	15/23R/BRA	Brasil	Castro et al. (2007)
EU057184	Z/BRA	Brasil	Ciacci-Zanella et al. (2009)
EU057185	P/BRA	Brasil	Ciacci-Zanella et al. (2009)
EU057186	T/BRA	Brasil	Ciacci-Zanella et al. (2009)
EU057187	U/BRA	Brasil	Ciacci-Zanella et al. (2009)
EU057188	S/BRA	Brasil	Ciacci-Zanella et al. (2009)
EU057189	R/BRA	Brasil	Ciacci-Zanella et al. (2009)
NC005148	2D/OST	Austria	Olvera et al. (2007)
AF109399	2D/CAN	Canadá	Olvera et al. (2007)
AB072303	2E/JAP	Japão	Olvera et al. (2007)
AY325495	2E/SAF	África do Sul	Olvera et al. (2007)
NC006266	PCV1/CHI	China	Olvera et al. (2007)
AF055392	PCV2a	Canadá	Segalés et al. (2008)
AF055394	PCV2b	França	Segalés et al. (2008)

3. RESULTADOS

3.1. Coleta de amostras

Entre os meses de julho de 2008 e maio de 2009, 169 fetos abortados, natimortos, mumificados ou inviáveis foram recebidos no laboratório de Patologia da Embrapa Suínos e Aves para colheita de órgãos e diagnóstico da infecção pelo PCV2 neste material. As amostras eram provenientes de 21 granjas produtoras de suínos, sendo o PCV2 detectado em 11 delas (52,4%). Ao final das colheitas, foram obtidas amostras de 81 leitegadas, totalizando 169 fetos, numerados e identificados de 1 a 169.

3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA de PCV2 nos órgãos foi detectado através da técnica de *nested*-PCR, que amplificou fragmentos de 225 pares de bases, como demonstrado na figura 6.

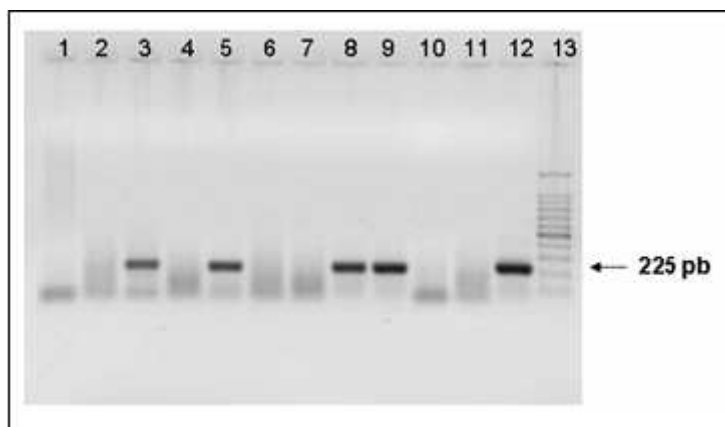


Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PCV2 (1)Timo – feto 70; (2) Linfonodo inguinal – feto 84; (3) Linfonodo mesentérico – feto 84; (4) Linfonodo submandibular – feto 84; (5) Baço – feto 86; (6) Cerebelo – feto 86; (7) Cérebro – feto 86; (8) Medula – feto 86; (9) Rim – feto 86; (10) Controle negativo 1 (água ultrapura); (11) Controle negativo 2 (água ultrapura); (12) Controle positivo (Fernandes et al., 2003b); (13) Marcador 100 pb (Cenbiot®).

Dos 169 fetos amostrados, 29 (17,1%) foram positivos para PCV2 pela técnica de *nested*-PCR a partir dos órgãos, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados referentes aos órgãos positivos para PCV2 por *nested*-PCR.

Órgãos	Coração	Pulmão	Fígado	Rim	Tecido linfóide*	Tecido nervoso**	Total
Fetos							
1	NE	+	+	NE	NE	NE	2/2
2	+	+	+	NE	NE	NE	3/3
3	+	+	+	NE	NE	NE	3/3
4	+	+	+	+	NE	NE	4/4
5	+	+	+	+	+	NE	5/5
7	+	-	-	-	+	NE	2/6
10	+	-	+	-	-	+	3/9
11	-	+	-	-	-	+	2/9
12	-	-	-	-	-	+	1/8
15	-	-	-	-	+	-	1/11
16	+	-	-	-	-	-	1/10
20	+	-	-	-	-	NE	1/5
21	-	-	-	+	-	NE	1/5
23	+	-	-	-	-	NE	1/5
34	+	-	-	-	-	+	2/10
53	-	-	-	-	-	+	1/10
70	-	-	-	-	+	-	1/10
82	-	-	-	-	+	-	1/11
84	-	-	-	-	+	-	1/12
86	-	-	-	+	+	+	3/10
90	-	-	-	-	+	-	1/12
91	-	-	-	-	-	+	1/12
95	-	-	-	-	+	-	1/12
96	-	-	-	-	-	+	1/12
98	-	-	-	-	-	+	1/12
113	-	+	-	-	-	-	1/12
130	+	-	-	-	-	-	1/12
143	-	+	-	+	+	-	3/12
147	+	-	+	-	+	+	4/12

*Tecido linfóide: baço, timo, linfonodos inguinais, mesentéricos e submandibulares.

**Tecido nervoso: cérebro, cerebelo e medula.

NE: tecido não examinado

-: Amostra negativa

+: Amostra positiva

Entre as amostras positivas, observou-se que o coração foi o órgão onde o DNA do PCV2 foi identificado com maior frequência (41,4%), seguido por tecidos linfóides (37,8%), tecido nervoso (34,5%), pulmão (27,6%), fígado (24,1%), e rim (17,2%), conforme demonstrado na figura 7. Cabe salientar que

em alguns dos fetos analisados ácidos nucleicos do PCV2 foram encontrados em mais de um órgão.

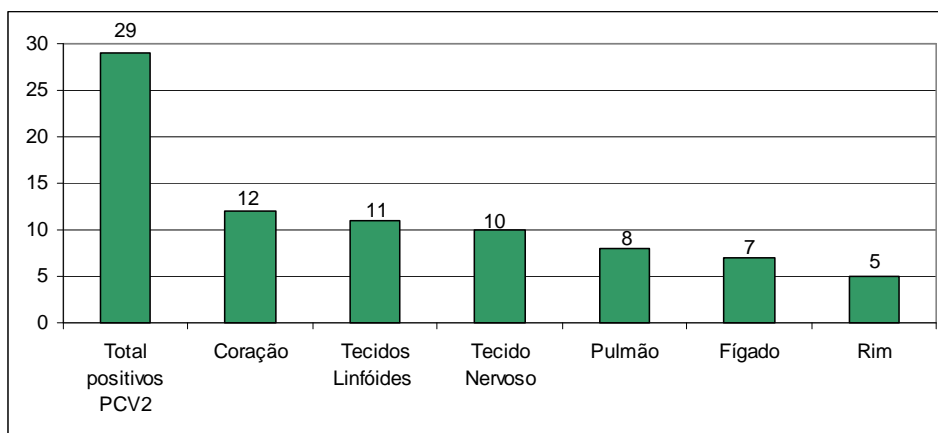


Figura 7 – Resultados dos testes de *nested*-PCR para PCV2 nos diferentes órgãos analisados.

Amostras de órgãos reprodutivos de porcas descartadas também foram colhidas em 4 abatedouros da região oeste e meio oeste de Santa Catarina, sendo processadas para diagnóstico de PCV2. Entre as 83 fêmeas avaliadas, somente 4 (5,1%) foram positivas para PCV2 no útero ou no ovário pela técnica de *nested*-PCR e apenas uma no líquido folicular ovariano.

Os ovários foram avaliados quanto ao período do ciclo estral das fêmeas e classificados como ciclando, em anestro ou ovário cístico, de acordo com a presença de folículos em crescimento, corpos lúteos após a ovulação ou cistos foliculares.

3.3. Exame histopatológico

Lesões microscópicas foram encontradas no coração, órgãos linfóides, pulmão, cérebro, fígado e rim de 26 fetos, correspondendo a 15,4% das amostras avaliadas, sendo 34,6% delas encontradas no coração e tecidos linfóides, onde foram observadas principalmente lesões com infiltrado mononuclear e de eosinófilos (Figura 8).

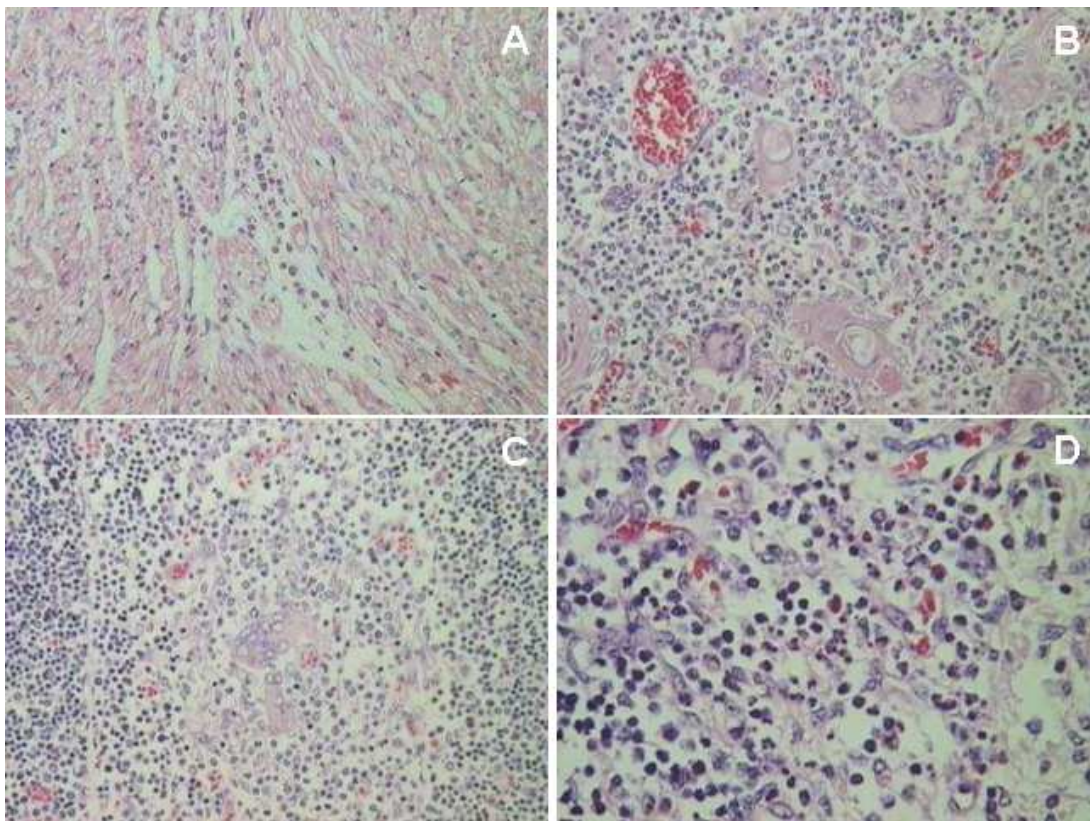


Figura 8 – Lesões histológicas nos tecidos fetais. Aumento 50X. A) Coração – feto 47: presença de infiltrado inflamatório mononuclear; B) Timo – feto 102: células gigantes multinucleadas; C) Timo – feto 88: células gigantes multinucleadas; D) Linfonodo – feto 110: células multinucleadas.

Na avaliação histológica do tecido uterino das fêmeas, foram observadas lesões de endometrite catarral, com discreta infiltração inflamatória mista ou com predomínio de células mononucleares no endométrio e/ou no lúmen das glândulas/órgão; endometrite purulenta apresentando acentuada infiltração e exsudação de neutrófilos no endométrio e/ou no lúmen das glândulas/órgão; e endometrite crônica com infiltração inflamatória mononuclear e fibroplasia ao redor de glândulas endometriais e/ou na lâmina própria/epitélio. Um total de 24 porcas apresentou lesões, contudo, as 4 fêmeas que foram positivas para PCV2 por *nested-PCR* apresentaram o útero normal.

3.4. Imunohistoquímica (IHQ)

Testes de IHQ foram realizados nos órgãos dos 29 fetos que resultaram positivos para PCV2 pela técnica de *nested*-PCR, totalizando 57 cortes de tecidos analisados. O antígeno de PCV2 foi detectado em 17 fetos, ou seja, 58,6% dos tecidos analisados. Os resultados encontrados estão sumarizados na figura 9.

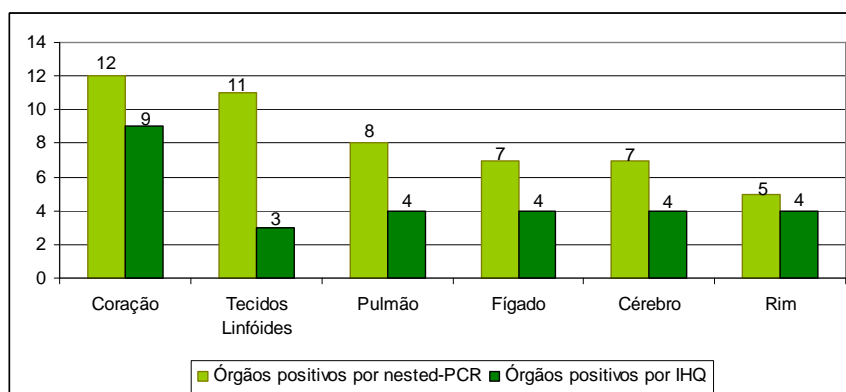


Figura 9 – Resultados dos testes de IHQ nos órgãos positivos para PCV2 por *nested*-PCR.

Observou-se que as células positivas encontravam-se principalmente nos infiltrados inflamatórios presentes nos tecidos, mais frequentemente no citoplasma de macrófagos. No fígado, as células positivas estavam dispersas no interstício e nos hepatócitos (Figura 10 – A e B). No coração, destacou-se marcação positiva nos cardiomiócitos e necrose do tecido cardíaco (Figura 10 – C e D). Antígeno viral também foi observado no parênquima pulmonar (Figura 10 – E) e nas células dos túbulos renais (Figura 10 – F). Como controle da técnica foram utilizados cortes de linfonodos de animal positivo para PCV2, confirmado por *nested*-PCR (Figura 10 – G e H). No controle negativo não foi observado nenhum sinal de marcação (Figura 10 – I).

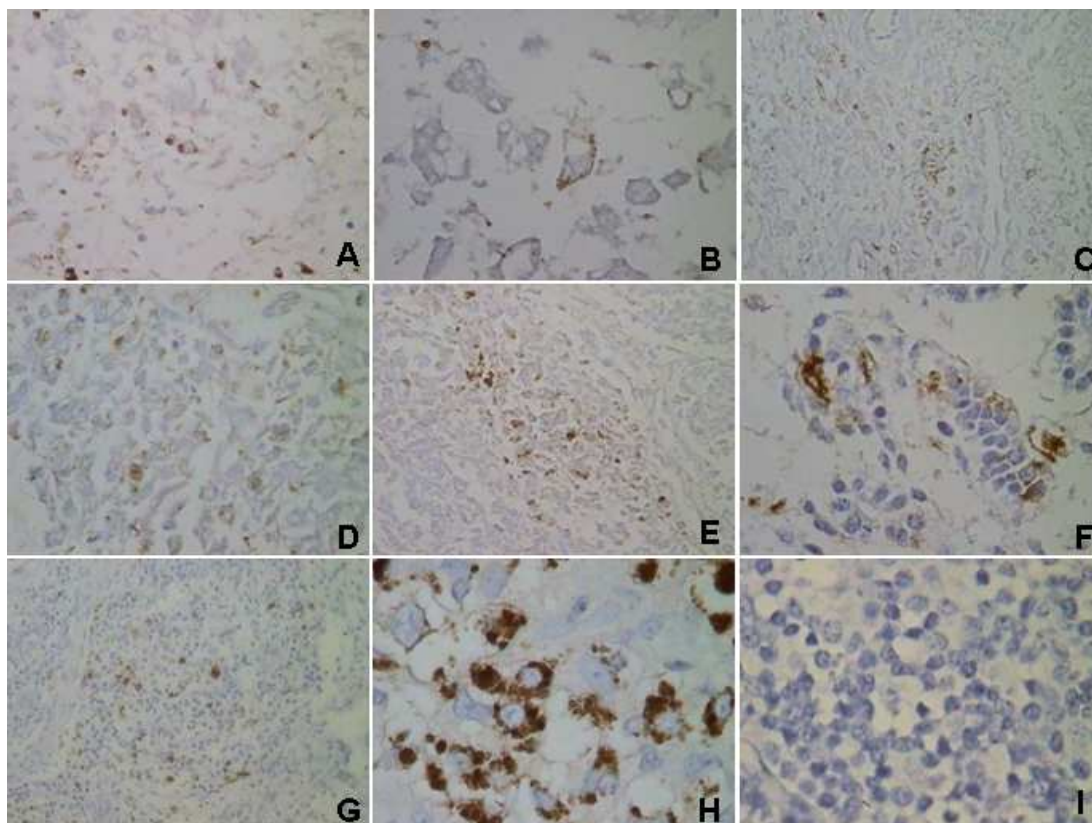


Figura 10 – Órgãos de fetos positivos nos testes de IHQ, corados com DAB. A) Fígado: Marcação difusa; B) Fígado: presença de antígeno no citoplasma de hepatócito; C) Coração: presença de antígeno nos cardiomiócitos; D) Coração: necrose do miocárdio; E) Pulmão: marcação difusa no parênquima alveolar; F) Rim: marcação positiva em células dos túbulos renais. Controles dos testes de IHQ. G) Linfonodo controle positivo: marcação difusa; H) Linfonodo controle positivo: antígeno no citoplasma das células; I) Linfonodo controle negativo: ausência de marcação.

3.5. Sequenciamento e caracterização molecular de PCV2

Para caracterização molecular de amostras de PCV2 isoladas de fetos suínos, inicialmente foram realizadas clivagens de produtos de PCR a partir de DNA extraído de tecidos fetais. As enzimas *Hinf I* e *Rsa I* clivaram os produtos de PCR em fragmentos de diferentes tamanhos, os quais estão apresentados na figura 11.

Foram selecionadas 6 amostras, identificadas como E, F, L, M, N e O, que apresentavam perfis interessantes nas clivagens. Em seguida, reações de PCR foram realizadas com estas amostras utilizando 6 pares de *primers*, a fim de amplificar o genoma completo do PCV2 para posterior sequenciamento e caracterização molecular dos isolados.

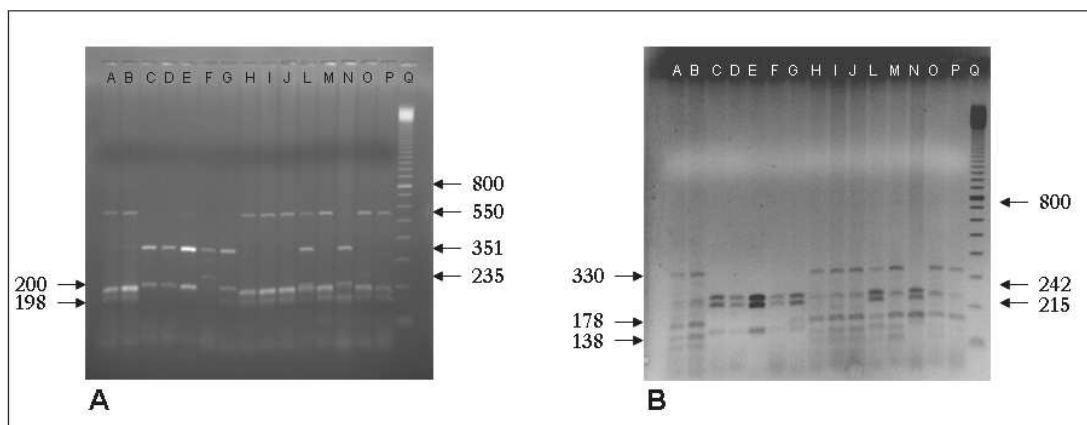


Figura 11 – Clivagens com enzimas de restrição.

A) Amostras A a P) produtos de PCR clivados com *Hinf* I. Q) Marcador 100 pb (Amersham®).

B) Amostras A a P) produtos de PCR clivados com *Rsa* I. Q) Marcador 100 pb (Amersham®).

As amostras que apresentaram ampliações únicas e com fragmento de tamanho esperado para cada *primer* foram purificadas direto da reação de PCR e o material purificado utilizado nas reações de sequenciamento.

Dentre as amostras seqüenciadas, somente a amostra F, (posteriormente nomeada 15608), apresentou seqüências de qualidade para serem analisadas, apresentando 99% de identidade com seqüências do genoma completo de PCV2 disponíveis no GenBank, localizadas através do programa BLAST (Altschul et al., 1990), como demonstrado na figura 12.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF565345.1	Porcine circovirus 2 isolate DK411case, complete genome	904	904	100%	0.0	100%
GQ404802.1	Porcine circovirus 2 isolate DBN-SX03 rep protein and capsid protei	898	898	100%	0.0	99%
GQ359006.1	Porcine circovirus 2 strain GX0848, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
GQ227412.1	Porcine circovirus 2 isolate JSDT0706, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ905466.1	Porcine circovirus 2 isolate 2351-1, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ905465.1	Porcine circovirus 2 isolate CP5461, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ905464.1	Porcine circovirus 2 isolate PF65-1, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ905463.1	Porcine circovirus 2 isolate C7155, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FN398026.1	Porcine circovirus 2, complete genome, isolate Pinar del Rio	898	898	100%	0.0	99%
FJ935780.1	Porcine circovirus 2 isolate Abort-2006-DK, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ870975.1	Porcine circovirus 2 strain SDrc-1b, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ870974.1	Porcine circovirus 2 strain HNYy-6b, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ870969.1	Porcine circovirus 2 strain ShenZhen, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ598044.1	Porcine circovirus 2 strain WuHan, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ667595.1	Porcine circovirus 2 strain PCV2-RP7, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ644924.1	Porcine circovirus 2 isolate DF06, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ644920.1	Porcine circovirus 2 isolate TZ06, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ644919.1	Porcine circovirus 2 isolate SH1, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ644558.1	Porcine circovirus 2 isolate DZ105, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
FJ158606.1	Porcine circovirus 2 isolate TZ60804, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU257516.1	Porcine circovirus 2 strain JH0602, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU257513.1	Porcine circovirus 2 strain ZJU0601, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EF493852.1	Porcine circovirus 2 strain ZZ rep gene, complete cds	898	898	100%	0.0	99%
EU886637.1	Porcine circovirus 2 isolate Aust3959, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU057187.1	Porcine circovirus 2 U0168/03, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU057184.1	Porcine circovirus 2 20161b/03, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU545550.1	Porcine circovirus 2 isolate Vos 6869-70/06, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU545548.1	Porcine circovirus 2 isolate Vos 19015/06, complete genome	898	898	100%	0.0	99%
EU545542.1	Porcine circovirus 2 isolate Vos 3415-17/07, complete genome	898	898	100%	0.0	99%

Figura 12 – Alinhamento da seqüência amplificada (15608) com outras seqüências depositadas no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Com o sequenciamento da amostra 15608 foi possível obter somente parte do genoma do PCV2, que compreende a sequência de nucleotídeos que forma a proteína Replicase (*Rep*), com aproximadamente 900 nucleotídeos. Com base na caracterização molecular, foi possível classificar o PCV2 isolado dentro do genótipo PCV2b, através do alinhamento da sequência obtida com outras previamente descritas (Castro et al., 2007; Ciacci-Zanella et al., 2009b; Olvera et al., 2007) depositadas no GenBank utilizando o *software* MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004), e posterior análise filogenética da amostra 15608, conforme pode ser observado na figura 13.

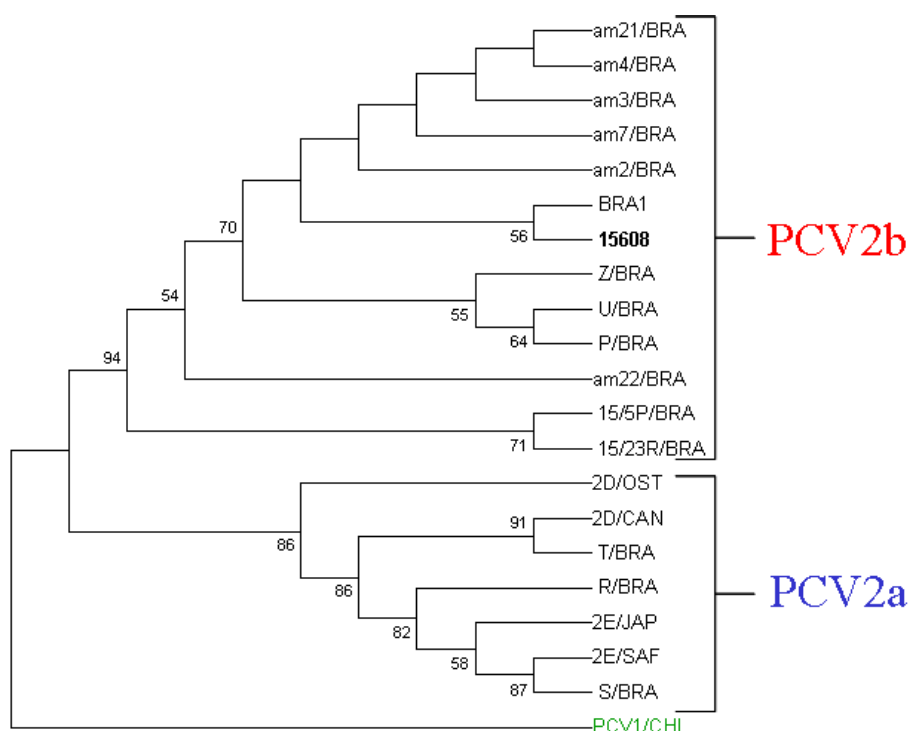


Figura 13 – Árvore filogenética apresentando as seqüências do GenBank utilizadas e a seqüência isolada neste estudo (15608).

4. DISCUSSÃO

Recentemente, fortes evidências de campo e reproduções experimentais de infecções indicam que, além da SMDS, as falhas reprodutivas também são causadas pelo PCV2 (Kim et al., 2004b; Allan, 2006).

Os resultados observados ao analisar amostras de órgãos de fetos suínos pela técnica de PCR reforçam os achados de Pensaert et al. (2004), que observaram que o coração foi o principal tecido fetal afetado após inoculação *in útero* do PCV2 em diferentes estágios de gestação. Ao analisar os dados apresentados na tabela 4, observa-se que o coração foi o órgão onde os ácidos nucleicos de PCV2 foram detectados com maior frequência, seguido pelos tecidos linfóides, indicando que estes seriam os órgãos de eleição para coleta e envio ao laboratório para diagnóstico da infecção por PCV2 em tecidos fetais. Além disso, cabe ressaltar que entre os fetos amostrados observam-se animais de diferentes tamanhos e fases de gestação, sugerindo a relação entre a fase desenvolvimento dos fetos com a detecção do vírus nos tecidos linfóides devido à imunocompetência adquirida a partir de determinada fase da gestação.

Os resultados encontrados em nossa pesquisa diferem dos relatados por Maldonado et al. (2005), que analisaram amostras de tecidos de 239 fetos abortados e natimortos na Espanha, e somente um feto foi positivo para PCV2 pela técnica de PCR. Por outro lado, Altherr et al. (2003) testando amostras de 279 fetos por PCR detectaram ácidos nucleicos de PCV2 em 12 fetos.

Lesões macroscópicas não são frequentemente observadas em fetos suínos, pois quando ocorrem, não são específicas de um determinado patógeno. Dentre os fetos analisados em nosso estudo, alguns achados foram observados, como congestão da pele e tecidos e acúmulo de líquidos nas cavidades pleural e peritoneal.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho foram encontrados por West et al. (1999), que observaram lesões cardíacas em fetos suínos abortados infectados pelo PCV2, caracterizadas por necrose e degeneração dos cardiomiócitos associada a intenso infiltrado inflamatório de macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Por outro lado, Park et al. (2005), ao

analisar amostras de órgãos de 65 fetos natimortos não encontraram lesões no tecido cardíaco, somente nos pulmões. Contudo, em nosso estudo, antígeno ou ácidos nucléicos de PCV2 foram encontrados em tecidos com ausência ou baixo grau de lesões histológicas significativas, sendo que somente em dois fetos as lesões foram encontradas em órgãos positivos por *nested*-PCR.

Testes de IHQ foram realizados a fim de confirmar a presença do antígeno de PCV2 nos tecidos fetais onde o vírus foi detectado pela técnica de *nested*-PCR, sendo observado antígeno viral em 17 dos 29 fetos, havendo variação na quantidade e distribuição do antígeno viral nos tecidos. Estes resultados indicam que a PCR foi mais sensível para detecção de PCV2 nos tecidos fetais, provando ser uma técnica útil no diagnóstico, pela facilidade na preparação dos *primers*, quando comparada com a IHQ, que necessita da elaboração de anticorpos monoclonais (Kim e Chae, 2004a). Os resultados obtidos no presente trabalho são semelhantes aos descritos por Brunborg et al. (2007), que detectaram ácidos nucléicos de PCV2 através de PCR tempo real e IHQ em amostras de tecidos de fetos abortados e natimortos provenientes de um rebanho recentemente formado.

Tecidos reprodutivos de fêmeas suínas também foram testados por *nested*-PCR, onde observou-se que o PCV2 foi encontrado em poucas amostras e as fêmeas positivas encontravam-se ciclando, indicando que a presença do vírus não interferiu no ciclo estral dessas porcas. Além disso, entre as fêmeas positivas não foram observadas lesões características de endometrite, sugerindo que a presença de PCV2 nessas porcas não estava relacionada com lesões uterinas. Os dados encontrados mostram que a grande maioria das fêmeas analisadas estava ciclando, ou seja, possivelmente a causa que motivou o descarte destas matrizes não tenha sido reprodutiva.

O sequenciamento e análise filogenética de amostra de PCV2 isolada durante o desenvolvimento do presente trabalho permitiram classificar a mesma dentro do genotipo PCV2b, de acordo com características específicas (Horlen et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Castro et al. (2007), os quais também demonstraram o isolamento de amostras do genotipo PCV2b, embora tenham utilizado material proveniente de suínos que apresentavam problemas respiratórios.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam os achados de Ciacci-Zanella et al. (2009a), que classificaram amostras de PCV2 também isoladas em Santa Catarina, mostrando que ambos genótipos de PCV2 (PCV2a e PCV2b) foram encontrados no Brasil, onde duas seqüências, denominadas “Z” e “U”, eram agrupadas na análise filogenética por possuírem características diferentes das demais. Todavia, ao introduzir a seqüência 15608, obtida em nosso estudo, na análise juntamente com as seqüências disponibilizadas pelo referido trabalho, ocorre um rearranjo entre estas seqüências (Figura 13), inserindo-as no genótipo PCV2b. Ao investigar a origem das amostras citadas, observou-se que a amostra “Z” refere-se a material extraído de feto suíno abortado, com suspeita de circovirose. A amostra “U” também é originada de órgãos de suínos com características clínicas e histopatológicas de um quadro de circovirose. Com base nesses dados pode-se obter maiores esclarecimentos sobre a patogenia e epidemiologia destes isolados. No entanto, em nosso estudo, somente parte do genoma do PCV2 foi seqüenciada, correspondente à seqüência de nucleotídeos que forma a proteína Replicase (*Rep*), uma proteína essencial para a replicação do vírus. Estudos continuam sendo realizados para o sequenciamento e caracterização molecular de todo genoma do PCV2 isolado desta e de outras amostras obtidas durante o presente trabalho.

O envolvimento do PCV2 nos casos de falhas reprodutivas em suínos tem causado interesse. Trabalhos realizados no Canadá (West et al., 1999, O'Connor et al., 2001) e Estados Unidos (Janke et al., 2000) mostram a associação do PCV2 com problemas reprodutivos em suínos, relatando abortos e mumificação fetal, com quantidade variável de antígeno de PCV2 nos tecidos e em lesões cardíacas.

Park et al., (2005), realizaram estudo no qual demonstraram que o PCV2 induziu falhas reprodutivas em porcas inoculadas experimentalmente, reforçando os relatos de outros autores (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001) e sugerindo a capacidade do PCV2 em atravessar a barreira placentária para infectar os fetos em diferentes estágios de gestação.

Abortos têm sido esporadicamente associados a infecção pelo PCV2, em especial em granjas recentemente formadas, onde leitões não imunes são introduzidas no plantel (West et al., 1999). Pescador et al. (2007) realizaram

levantamento de casos de abortos no estado do Rio Grande do Sul, onde observaram PCV2 em 5,9% das amostras testadas.

Alguns autores recomendam que para confirmar o diagnóstico da infecção por PCV2 em falhas reprodutivas é importante seguir três critérios: i. Presença de abortos e/ou natimortos e/ou mumificados, ii. Presença de lesões no tecido cardíaco dos fetos (miocardite não supurativa), iii. Presença de PCV2 em lesões do miocárdio e em outros tecidos fetais como linfonodos (Kim et al., 2004b; Mikami et al., 2005, Allan, 2006).

Segundo Mikami et al. (2005), lesões de miocardite são comumente encontradas em fetos abortados ou natimortos devido à infecção pelo PCV2 associado a falha reprodutiva, bem como depleção linfóide no baço, timo e linfonodos, com infiltração de células multinucleadas e na IHQ observa-se a presença de antígeno nos cardiomiócitos e infiltração de macrófagos. Os pesquisadores também encontraram miocardite não supurativa em leitões de 8 dias de idade, confirmada por IHQ, porém, as lesões de fibrose sugeriram que a infecção tenha sido intra-uterina. Contudo, estudos posteriores serão necessários para determinar quais fatores podem estar envolvidos na expressão da doença associada à infecção pelo PCV2.

5. CONCLUSÕES

- A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível concluir que o PCV2 está presente em material proveniente de porcas com patologias reprodutivas;
- Os resultados evidenciam que a infecção pelo PCV2 está associada com distúrbios reprodutivos em fêmeas;
- Baseado nos resultados de *nested*-PCR e IHQ pode-se concluir que o coração e os tecidos linfóides são os órgãos de eleição para diagnóstico de PCV2 em tecidos fetais;
- Com base no sequenciamento e caracterização molecular de amostra isolada de tecidos fetais pode-se concluir que o genotipo PCV2b estava presente nas amostras avaliadas.

CAPÍTULO II

PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DIAGNÓSTICO DE *TORQUE TENO* VÍRUS TIPO 1 E TIPO 2 (TTV1 E TTV2) A PARTIR DE ÓRGÃOS REPRODUTIVOS E FLUIDO FOLICULAR OVARIANO DE FÊMEAS SUÍNAS

1. INTRODUÇÃO

Torque Teno Vírus (TTV) é um vírus pequeno, sem envelope, com fita simples de DNA circular, classificado no gênero *Anellovirus*. Primeiramente isolado em humanos, mais recentemente o TTV tem sido isolado em animais domésticos (Okamoto et al., 2002), tendo sido identificados dois genogrupos distintos, TTV1 e TTV2, que afetam os suínos (Niel et al., 2005).

O TTV em suínos ainda não tem se mostrado patogênico, porém, seu papel em co-infecções com outros patógenos permanece desconhecido. Estudos através da técnica de PCR consideram que o TTV está disseminado na população de suínos da Espanha (Kekarainen et al., 2006), França (Bigarré et al., 2005) e Itália (Marteli et al., 2006), tendo prevalência variável.

Apesar de disseminado em suínos, a importância deste vírus ainda não está esclarecida. Alguns estudos já indicaram um possível papel do TTV em exacerbar a patogenia causada pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em leitões (Kekarainen et al., 2006), porém, não se sabe qual a sua importância em animais adultos em fase reprodutiva.

Relatos de grupos de pesquisa do mundo mostram a prevalência de TTV suíno em amostras de soro (Sibila et al., 2009), porém, poucos dados foram encontrados referindo-se à detecção do vírus em tecidos.

Estudos recentes mostram os primeiros indícios de transmissão *in útero* ou transplacentária de TTV suíno (Martinez-Guinó et al., 2009), o que levanta a questão da importância deste agente nos tecidos reprodutivos das fêmeas,

possibilitando a contaminação intra-uterina e favorecendo a disseminação do vírus do plantel.

O presente estudo objetivou estabelecer padrões para execução da técnica de PCR para detecção de ácidos nucléicos dos dois genogrupos de TTV (TTV1 e TTV2) em tecidos, bem como aplicar tal técnica para testar amostras de órgãos reprodutivos e líquido folicular ovariano de fêmeas suínas, avaliando a distribuição dos vírus nos tecidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A padronização da técnica de PCR para detecção de DNA de TTV1 e TTV2 em órgãos foi realizada seguindo o protocolo descrito por Kekarainen et al. (2006), adaptado para detecção em órgãos. Amostras de clones de TTV1 e TTV2 (cedidos pelo pesquisador Christian Niel, do departamento de virologia do laboratório Fiocruz, Rio de Janeiro) foram utilizadas como controle positivo das reações, os quais tiveram a identidade comprovada através de sequenciamento do genoma. As sequências de *primers* utilizadas para TTV1 e TTV2 amplificam uma região não codificante dentro do genoma viral, e encontram-se descritas na tabela 5.

Tabela 5 - *Primers* senso e antisenso utilizados nas reações de PCR para TTV1 e TTV2.

Agente viral	Seqüência 5' - 3'
	<i>Senso</i>
TTV1 – <i>outer</i>	TACACTTCCGGGTTTCAGGAGGCT
TTV1 – <i>nested</i>	CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC
TTV2 – <i>outer</i>	AGTTACACATAACCACCAAACC
TTV2 – <i>nested</i>	CCAAACCACAGGAAACTGTGC
	<i>Anti-senso</i>
TTV1 – <i>outer</i>	ACTCAGCCATTCGGAACCTCAC
TTV1 – <i>nested</i>	TACTTATATTCGCTTTCGTGGGAAC
TTV2 – <i>outer</i>	ATTACCGCCTGCCCGATAGGC
TTV2 – <i>nested</i>	CTTGACTCCGCTCTCAGGAG

Fonte: Kekarainen et al. (2006).

A reação de PCR foi realizada em volume total de 25 µL, sendo testadas diferentes concentrações dos reagentes que compõe a reação, tais como, diferentes concentrações de *primers* (10 e 100 pmol), diferentes concentrações de desoxirribonucleotídeos (DNTPs) (2,4 mM; 2 mM e 0,4 mM) e diferentes concentrações de DNA (entre 10 e 30 nanogramas). As reações continham

ainda 2 mM de MgCl₂, tampão para PCR e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Como controle negativo das reações foi utilizada água ultra pura.

As amplificações foram realizadas em aparelho termociclador (Mastercycler Eppendorf®), utilizando 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, gradiente variando a temperatura de anelamento entre 53,8°C e 60°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos por extensão final a 72°C por 10 minutos.

A reação foi padronizada para um volume de 25 µL contendo 0,5 µL de cada *primer* com concentração 10 pmol; 0,4 mM de DNTP; 2 mM de MgCl₂, tampão 10x para PCR e 1U de Taq DNA polimerase. Para amplificação do DNA foi utilizado programa que compreende desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento dos *primers* a 54°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos por extensão final por 10 minutos a 72°C. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (5 µg/mL), e posteriormente visualizados sob luz ultra violeta. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de base.

Estas condições, quando determinadas como sendo ideais, foram aplicadas com amostras de órgãos reprodutivos e fluido folicular ovariano de fêmeas suínas, colhidas e processadas como descrito nos itens 2.3 e 2.4 para detecção de TTV1 e TTV2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O TTV é um agente que apresenta grande variabilidade genética e infecta várias espécies animais, porém, até o momento não foi definitivamente relacionado a uma enfermidade específica. Contudo, grupos de pesquisa trabalham para elucidar as formas de patogenia e principalmente de transmissão deste agente entre os suínos, uma vez que estes tem sido utilizados como modelo na tentativa de esclarecer o papel do vírus em humanos (Weiblen, 2009). Por estes motivos, o desenvolvimento de técnicas moleculares para diagnóstico deste patógeno torna-se fundamental.

Os primeiros resultados obtidos na padronização da técnica de PCR foram considerados satisfatórios, porém alterações foram feitas para otimizar o teste. Excesso de primer foi observado e a quantidade reduzida para 0,5 µL com concentração 10 pmol, em reação contendo 0,4 mM de dNTP e as mesmas concentrações de MgCl₂ e tampão para PCR.

A técnica de PCR para detecção dos dois genogrupos de TTV suíno em amostras de órgãos foi padronizada utilizando *primers* que amplificam fragmentos de 260 e 230 pares de bases para TTV1 e TTV2, respectivamente (Figura 14).

Foram analisadas 83 amostras de órgãos reprodutivos e 71 amostras de líquido folicular ovariano, colhidos ao abate de fêmeas descartadas. O material foi analisado através da técnica de *nested-PCR* e verificou-se a presença de TTV1 em 25 (30,1%) e TTV2 em 41 (49,3%) fêmeas, sendo observada co-infecção entre os agentes em 13,2% das porcas. Foram observados casos de fêmeas em que os vírus foram detectados em mais de uma amostra simultaneamente. Os resultados estão demonstrados na tabela 6.

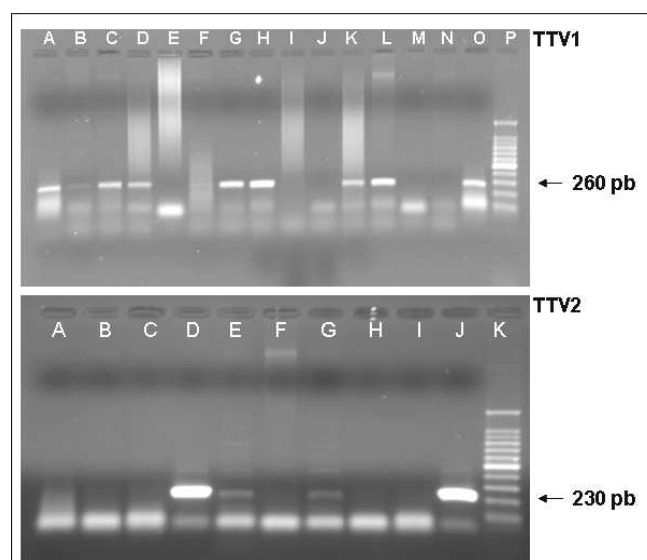


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR para detecção de TTV1 e TTV2 em órgãos reprodutivos de fêmeas suínas.

TTV1) Produto de nested-PCR. Amostras de A a L) Útero e ovário das porcas 76, 77, 78, 79, 80 e 81; M) Controle negativo (água ultra pura); N) Controle negativo (água ultra pura); O) Controle positivo TTV1; P) Marcador de peso molecular 100 bp (Cenbiot®).

TTV2) Produto de nested-PCR. A) útero porca 50; B) ovário porca 50; C) útero porca 59; D) ovário porca 59; E) útero porca 60; F) ovário porca 60; G) ovário porca 77; H) útero porca 77; I) Controle negativo (água ultra pura); J) Controle positivo TTV2; K) Marcador de peso molecular 100 bp (Cenbiot®).

Tabela 6 - Resultados dos testes de *nested*-PCR em 83 amostras de ovário e útero e 71 amostras de líquido folicular ovariano de fêmeas suínas descartadas. Número e percentual de amostras positivas (%).

Amostras	TTV1	TTV2	TTV1 e TTV2
Fluido folicular (n=71)	13(18,3)	27(38,0)	5(7,0)
Ovário (n=83)	12(14,4)	19(22,8)	6(7,2)
Útero (n=83)	7(8,4)	14(16,8)	1(1,2)

Os resultados deste trabalho indicam a presença de TTV suíno em órgãos reprodutivos de porcas de rebanhos comerciais, sendo observada maior ocorrência de TTV2 nas amostras testadas.

Brassard et al. (2008) reportaram que o TTV suíno tem sido diagnosticado em amostras de soro, plasma e fezes, e os resultados indicam que a transmissão fecal-oral seja o principal meio de disseminação do vírus. Além disso, recentemente Kekarainen et al. (2007) relataram alta prevalência dos genótipos de TTV em amostras de sêmen, sugerindo que a transmissão vertical via sêmen pode contribuir para a disseminação do vírus. Isso levanta a hipótese de que o TTV pode ser mais importante do que já se considerou, uma vez que foi detectado em ambos sistemas reprodutivos, feminino e masculino.

Martín-Guinó et al. (2009) realizaram testes no soro de fetos e frações de colostro, provenientes de fêmeas suínas negativas e positivas para TTV1 e TTV2. Concluíram que porcas negativas sempre originavam leitões negativos. Contudo, porcas positivas tiveram tanto leitões negativos quanto positivos. Além disso, os fetos positivos eram sempre infectados com o mesmo genogrupo da mãe, gerando fortes indícios da transmissão transplacentária do vírus.

Até o presente momento, as rotas de transmissão do TTV suíno permanecem desconhecidas (Sibila et al., 2009), justificando a busca por métodos alternativos de diagnóstico para estudo da patogenicidade do agente.

Com a padronização da técnica de PCR para detecção do TTV suíno em órgãos, estudos de prevalência do vírus em tecidos podem auxiliar no esclarecimento sobre a patogenia do vírus, através do conhecimento do tropismo viral e futuramente quantificação viral e reprodução de doença em suínos.

4. CONCLUSÕES

- A técnica de PCR para detecção de TTV1 e TTV2 em amostras de órgãos foi padronizada, podendo ser aplicada como ferramenta para investigar a dispersão dos vírus em diversos tecidos;
- Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que ambos genogrupos de TTV suíno estavam presentes em amostras de órgãos reprodutivos de fêmeas suínas descartadas;
- Com base nos resultados de PCR pode-se concluir que o TTV2 ocorreu com maior frequência entre as fêmeas avaliadas, sugerindo a relevância deste agente entre animais em idade reprodutiva.

CAPÍTULO III

ESTUDO DE CO-INFECÇÃO ENTRE O *CIRCOVÍRUS* SUÍNO TIPO 1 (PCV1) E GENOGRUPOS 1 E 2 DE *TORQUE TENO VÍRUS* (TTV) SUÍNO EM FETOS INFECTADOS POR *CIRCOVIRUS* SUÍNO TIPO 2 (PCV2)

1. INTRODUÇÃO

Circovirus Suíno tipo 1 e tipo 2 (PCV1 e PCV2, respectivamente), são membros da família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*. São vírus pequenos (14 a 26 nm de diâmetro), não envelopados, com genoma DNA circular de fita simples (1,7 – 2,3 kb) (Todd, 2004). PCV2 e PCV1 possuem aproximadamente 70% de homologia de nucleotídeos entre eles. Enquanto PCV1 é um contaminante comum de células de cultivo de rim (PK-15) e não é considerado patogênico para animais, o PCV2 tem sido associado com diferentes síndromes clínicas, denominadas conjuntamente de circovirose suína.

Primeiramente identificado no Canadá em 1996 (Allan e Ellis, 2000), o PCV2 foi descrito no Brasil no ano 2000 e atualmente está amplamente difundido entre as criações de suínos no mundo todo (Zanella e Morés, 2000), causando grande impacto econômico na produção de suínos, principalmente pela ocorrência da Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) (Allan e Ellis, 2000).

Dentre as diferentes síndromes causadas pelo PCV2, falhas reprodutivas foram descritas, tanto em infecções naturais onde o PCV2 foi identificado em granjas que haviam sido recentemente povoadas com leitões (Pittman, 2008), como experimentalmente, através da inoculação do PCV2 em fêmeas gestantes, com posterior observação de lesões nos fetos (Sánchez et al., 2001).

Apesar de não causar doenças em suínos, estudos reportam que o PCV1 possa apresentar alguma associação com tremores congênitos tipo All (Dewei, 2006). Além disso, Allan et al. (1995) relataram ter isolado o PCV1 em fetos recém nascidos na Irlanda do Norte, sugerindo a possibilidade de transmissão transplacentária do vírus.

Recentemente, um outro agente viral, o *Torque Teno Vírus* (TTV), tem sido descrito em associação com infecções causadas pelo PCV2. Trata-se de um vírus pequeno, não envelopado, pertencente ao gênero *Anellovirus*, com fita simples de DNA circular. Primeiramente isolado em humanos, o TTV já foi identificado em animais domésticos, incluindo suínos, aves, bovinos, ovinos, caninos e felinos (Okamoto et al., 2002), sendo que em suínos já foram identificados dois genogrupos, TTV1 e TTV2 (Niel et al., 2005).

Alguns estudos já indicaram um possível papel do TTV em exacerbar a patogenia causada pelo PCV2 em leitões (Kekarainen et al., 2006), nos quais o TTV foi detectado em animais afetados e não afetados pela SMDS. Estudo semelhante recentemente demonstrou a co-infecção entre TTV e PCV2 em amostras de suínos no Brasil (Ciacci-Zanella et al., 2009b). Contudo, a importância deste vírus ainda não está esclarecida.

O principal objetivo deste estudo é avaliar a ocorrência dos genogrupos 1 e 2 de TTV suíno em fetos infectados pelo PCV2, bem como investigar a presença de PCV1 nestes fetos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vírus e amostras de órgãos

Amostras de órgãos de fetos suínos processadas e testadas como descrito nos itens 2.4 e 2.5 que resultaram positivas pela técnica de *nested*-PCR para PCV2, foram submetidas a testes para detecção de PCV1, TTV1 e TTV2. Foram analisadas amostras de coração, pulmão, fígado, rim, tecidos linfóides e tecido nervoso de 29 fetos abortados, natimortos ou mumificados, provenientes de fêmeas suínas que apresentavam distúrbios reprodutivos.

2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* específicos para cada um dos genogrupos de TTV, conforme descrito por Kekarainen et al. (2006) e para PCV1, segundo Kim et al. (2001b), demonstrados na tabela 7. Para controle positivo das reações de PCV1 foi utilizado DNA extraído de sobrenadante de cultivo celular persistentemente infectado. Nas reações para detecção de TTV1 e TTV2, como controle positivo foram utilizados clones (cedidos pelo pesquisador Christian Niel, Fiocruz, Rio de Janeiro). Como controle negativo das reações utilizou-se água ultrapura.

2.2.1. Detecção de PCV1

Para detecção de PCV1, utilizou-se *primers* que amplificam uma região específica da ORF 1. Reações de *outer*-PCR foram realizadas utilizando *primers* com concentração 10 pmol, 1,2 mM de MgCl₂, tampão para PCR, 0,4 mM de DNTPs (Invitrogen®) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). A partir do produto amplificado, procedeu-se reações de *nested*-PCR, utilizando o mesmo *primer forward* da reação *outer*, além do *primer reverse*, produzindo fragmentos de 317 pares de bases. A amplificação do DNA foi executada em

termociclador (Mastercycler Eppendorf®), com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 68°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto.

Tabela 7 - *Primers forward e reverse* utilizados nas reações de PCR para PCV1, TTV1 e TTV2.

Agente viral	Seqüência 5' - 3'
	<i>Forward</i>
PCV1 – <i>outer</i>	TTGCTGAGCCTAGCGACACC
PCV1 – <i>nested</i>	TTGCTGAGCCTAGCGACACC
TTV1 – <i>outer</i>	TACTTCCGGGTTTCAGGAGGCT
TTV1 – <i>nested</i>	CAATTTGGCTCGCTTCGCTCGC
TTV2 – <i>outer</i>	AGTTACACATAACCACCAAACC
TTV2 – <i>nested</i>	CCAAACCACAGGAAACTGTGC
	<i>Reverse</i>
PCV1 – <i>outer</i>	TCCAATGCTTCAAATCGGCC
PCV1 – <i>nested</i>	TGTTCTCCAGCAGTCTTCCA
TTV1 – <i>outer</i>	ACTCAGCCATTCGGAACCTCAC
TTV1 – <i>nested</i>	TACTTATATTCGCTTTCGTGGGAAC
TTV2 – <i>outer</i>	ATTACCGCCTGCCCGATAGGC
TTV2 – <i>nested</i>	CTTGACTCCGCTCTCAGGAG

Fonte: Kim et al. (2001b) e Kekarainen et al. (2006).

2.2.2. Detecção de TTV1 e TTV2

Visando a detecção de TTV1 e TTV2, a PCR foi executada conforme anteriormente descrito no capítulo II deste trabalho. As reações foram preparadas para um volume de 25 µL, com concentração 10 pmol de cada *primer*, tampão para PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs (Invitrogen®) e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Nas reações para detecção de TTV2 foi realizado gradiente de concentração de MgCl₂, variando entre 0,5 mM, 1 mM e 2 mM. A partir do produto da *outer*, realizou-se a *nested*-PCR, que amplifica fragmentos de 260 e 230 pares de bases para TTV1 e TTV2, respectivamente.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Eppendorf®) com as mesmas condições para ambos TTVs, com 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 54°C por 20

segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, seguidos por extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (5 µg/mL) e observados em transiluminador com luz ultravioleta. Um marcador de peso molecular foi incluso no gel para verificação do tamanho dos fragmentos amplificados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi detectar em amostras positivas para PCV2 em fetos suínos a presença de outros vírus DNA circular que possam estar co-infectando esses animais e possivelmente elevando a severidade das lesões.

O PCV2 foi detectado através da técnica de PCR em amostras de órgãos em 29 de 169 fetos suínos analisados durante o período de agosto de 2008 e maio de 2009. Posteriormente, estas amostras foram testadas para detecção de outros 3 agentes virais: PCV1, TTV1 e TTV2.

Nas reações de PCR para detecção de TTV2 foram observadas ampliações inespecíficas, com tamanho de fragmento acima do esperado para os *primers* utilizados, como pode ser observado na figura 15. Algumas medidas foram tomadas na tentativa de minimizar o problema. Inicialmente aumentou-se a temperatura de anelamento dos *primers* e variou-se a concentração de MgCl₂, porém, os resultados não foram eficientes. Outra estratégia foi a utilização de uma enzima mais específica, a Taq Platinum Antibody (Invitrogen®), que otimiza as reações, pois inicia sua atividade enzimática somente após atingir uma temperatura ótima durante o processo de amplificação. Outra alternativa foi o tratamento de algumas amostras com RNase, a fim de digerir o RNA da célula e facilitar a amplificação do DNA viral. Contudo, os resultados obtidos não foram satisfatórios, sugerindo que quando são utilizadas amostras de tecidos fetais, outros produtos são amplificados pelos *primers* em uso.

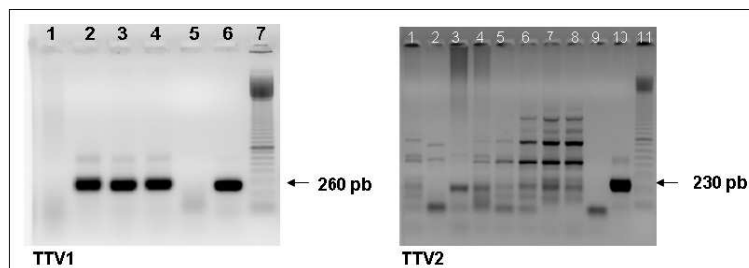


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR para detecção de TTV1 e TTV2 em órgãos de fetos suínos positivos para PCV2.

TTV1: (1) Baço, rim e timo – feto 143; (2) Coração, pulmão e fígado – feto 147; (3) Cérebro, cerebelo e medula – feto 147; (4) Baço, rim e timo – feto 147; (5) Controle negativo (água ultra pura); (6) Controle positivo TTV1; (7) Marcador 100 pares de bases (Amersham®).

TTV2: (1) Cérebro, cerebelo e medula – feto 86; (2) Baço e rim – feto 86; (3) Baço, rim, timo e linfonodo inguinal – feto 70; (4) Linfonodo inguinal e linfonodo mesentérico – feto 82; (5) Cérebro, cerebelo e medula – feto 53; (6) Linfonodo inguinal, mesentérico e submandibular – feto 90; (7) Cérebro, cerebelo e medula – feto 91; (8) Linfonodo inguinal, mesentérico e submandibular – feto 95; (9) Controle negativo (água ultra pura); (10) Controle positivo TTV2; (11) Marcador 100 pares de bases (Amersham®).

As reações de PCR para detecção de PCV1, que amplificaram produtos de 317 pares de bases (Figura 16), demonstraram seqüências do vírus em 8 fetos (27,6%). Por outro lado, TTV1 foi detectado em 7 (24,1%) e TTV2 em 24 fetos (82,8%).

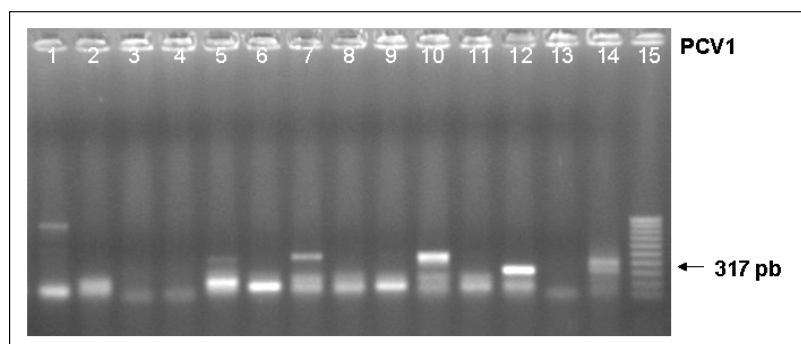


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Reação nested-PCR para PCV1 a partir de órgãos de fetos suínos positivos para PCV2.

(1) Cérebro, cerebelo e medula – feto 86; (2) Baço e rim – feto 86; (3) Baço, rim, timo e linfonodo inguinal – feto 70; (4) Linfonodo inguinal e linfonodo mesentérico – feto 82; (5) Cérebro, cerebelo e medula – feto 53; (6) Linfonodo inguinal, mesentérico e submandibular – feto 90; (7) Cérebro, cerebelo e medula – feto 91; (8) Linfonodo inguinal, mesentérico e submandibular – feto 95; (9) Cérebro, cerebelo e medula – feto 96; (10) Cérebro, cerebelo e medula – feto 98; (11) Coração, pulmão e fígado – feto 130; (12) Coração, pulmão e fígado – feto 113; (13) Controle negativo (água ultra pura); (14) Controle positivo TTV2; (15) Marcador 100 pares de bases (Cenbiot®).

Os resultados obtidos no estudo de co-infecção mostraram maior ocorrência de TTV2 entre as amostras analisadas, indicando a importância deste agente associado a infecções causadas por PCV2 (Figura 17).

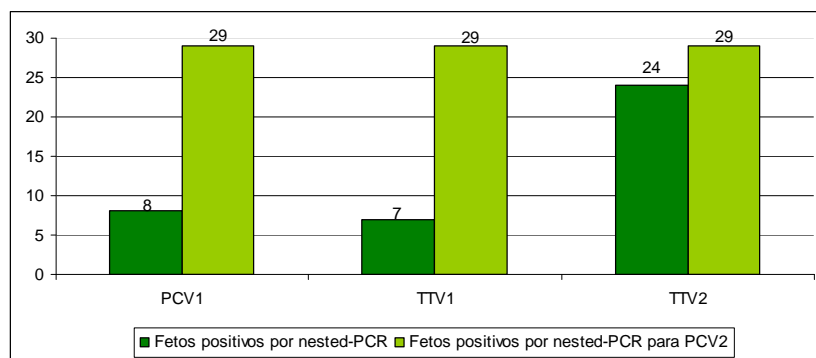


Figura 17 – Resultados dos testes de PCR para PCV1, TTV1 e TTV2 em amostras de órgãos de fetos positivos para PCV2.

O PCV1 foi o primeiro circovirus suíno identificado e apresenta alta prevalência nos rebanhos. Contudo, sua importância ainda não foi totalmente esclarecida.

Hines e Lukert, (1994) realizaram estudo em que indicavam o PCV1 associado a tremores congênitos em leitões, com transmissão vertical experimental. Porém, este isolado não foi genomicamente ou antigenicamente caracterizado e poucas informações sobre a inoculação experimental foram disponibilizadas. Em nosso trabalho, não foram selecionadas amostras de granjas que apresentassem problemas de tremores congênitos, portanto não dispomos deste dado.

Segundo Allan et al. (1995), o PCV1 teria sido isolado em 3 de 160 fetos natimortos, indicando que a transmissão vertical do vírus pode ocorrer, porém requer mais estudos para maiores esclarecimentos.

O PCV2, assim como o TTV, é um vírus ubíquo de suínos, indicando que a infecção pelo PCV2 é necessária, mas não suficiente para desencadear o desenvolvimento de sinais clínicos. Estudos mostram que, além do PCV2 outros fatores como manejo, genética e presença de outros agentes virais são necessários para a expressão de doença em muitos casos. Em um estudo realizado na Espanha buscou-se identificar a presença de TTV em amostras de suínos afetados e não afetados pelo PCV2, a fim de elucidar se o TTV pode ser considerado como um suposto desencadeador de quadros clínicos de SMDS (Kekarainen et al., 2006). Os pesquisadores reportaram a detecção dos genótipos de TTV em animais afetados pelo PCV2, evidenciando a ocorrência da infecção pelo TTV em animais acometidos pela SMDS, sendo

encontrados resultados semelhantes ao nosso estudo, com maior ocorrência de TTV2 nas amostras testadas.

Os resultados do presente trabalho mostram que é alta a presença de TTV em amostras de fetos suínos infectados pelo PCV2, complementando os achados de Ciacci-Zanella et al. (2009b), que demonstraram a presença dos genogrupos de TTV em amostras de órgãos de machos suínos infectados pelo PCV2, sugerindo a relação entre os agentes.

Além disso, Ellis et al. (2008) demonstraram que a inoculação de TTV1 em leitões gnotobióticos antes da infecção pelo PCV2 facilitou o desenvolvimento da SMDS, mostrando mais um indício do sinergismo entre os vírus.

Ao testar amostras de tecidos fetais para detecção de TTV2, observou-se a ocorrência de amplificações inespecíficas, que dificultaram a obtenção dos resultados. Por isso, novos estudos estão sendo realizados e outras opções sendo testadas para otimização do teste, inclusive o sequenciamento dos fragmentos amplificados, para posterior caracterização molecular do material, bem como a investigação da possibilidade de tratar-se de um novo genogrupo de TTV suíno que poderia estar sendo amplificado pelos *primers* em uso, uma vez que em humanos já foram identificados pelo menos 5 genogrupos de TTV (Peng et al., 2002).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se a realização de novas investigações para elucidar questões referentes à epidemiologia e patogenia do TTV quando relacionado com infecções pelo PCV2. Por outro lado, a demonstração de PCV1 nas amostras testadas evidencia que a ocorrência deste vírus pode ter maior importância nas co-infecções. Com isso, surge a necessidade de novas técnicas de diagnóstico, como a PCR em tempo real multiplex, que permitiria avaliar e quantificar a presença destes três agentes virais de DNA circular que afetam os suínos.

4. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos no presente estudo mostraram a ocorrência de co-infecções entre ambos genogrupos de TTV em fetos suínos infectados pelo PCV2, sugerindo a possível relação entre os agentes;
- Os dados encontrados demonstraram a ocorrência de co-infecção entre PCV1 e PCV2 em fetos suínos provenientes de fêmeas que apresentavam falhas reprodutivas, indicando a importância do diagnóstico destes patógenos;
- Foi observada alta presença de TTV2 em fetos suínos infectados pelo PCV2, reforçando os indícios do envolvimento deste agente nos casos de infecção por PCV2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; CASSIDY, J.P.; REILLY, G.A.C.; ADAIR, B.; ELLIS, W.A.; MCNULTY, M.S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. **Vet Microbiol.** v., 44, p. 49–64, 1995.

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

ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Vet Diagn Invest.** v. 12, p. 3–14, 2000.

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

ALLAN, G.M. PMWS/PCVD: Diagnosis, disease, and control: What do we know? In: International Pig Veterinary Society Congress, 19, 2006, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen, Dinamarca: IPVS, 2006. p.1-9.

ALMOND, G.W., FLOWERS, W.L., BATISTA, L. D'ALLAIRE, S. Diseases of the reproductive system. In: **Diseases of Swine.** STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.,J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J.. 9.ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2006. Cap.6, p.113-147.

ALTHERR, B.; ZIMMERMANN, P.; ETSCHMANN, B.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Detection of porcine circovirus type 2 (pcv2) and porcine parvovirus (ppv) in aborted fetuses. In: International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, 4. 2003, Rome.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. e LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool." **J. Mol. Biol.** v. 215, p. 403-410, 1990.

BIGARRÉ, L.; BEVEN, V.; DE BOISSESON, C.; GRASLAND, B.; ROSE, N.; BIAGINI, P. Pig anelloviruses are highly prevalent in swine herds in France. **J Gen Virol.** v. 86, p. 631–5, 2005.

BOGDAN J, WEST K, CLARK E, KONOBY C, HAINES D, ALLEN G, McNEILLY F, MEEHAN B, KRAKOWKA S, ELLIS JA. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998, **Canadian Veterinary Journal.** v. 42, p. 548-550, 2001.

BRASSARD, J., GAGNE, M.J., LAMOUREUX, L., INGLIS, G.D., LEBLANC, D., HOUDE, A. Molecular detection of bovine and porcine Torque teno virus in plasma and faeces. **Vet. Microbiol.** v. 126, p. 271–276, 2008.

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. **J Vet Diagn Invest.** v. 19, p. 368–375, 2007.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine Circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). **Arch. Virol.** v. 152 (8), p. 1435–1445, 2007.

CIACCI – ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R.; GAVA, D. Identificação do circovirus suíno tipo 2 (PCV2) por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural.** v. 36, n. 5, p. 1480-1485, 2006.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; PINTO, L.S.; VIANCELLI, A.; FERNANDES, L.T.; HAYASHI, M.; DELLAGOSTIN, O.A.; ESTEVES, P.A. Detection of porcine Circovirus type 2 (PCV2) variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian pig population. **Research in Veterinary Science.** v. 87, p. 157–160, 2009a.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; SIMON, N.L.; RITTERBUSCH, G.; SA ROCHA, C.; ZANELLA, E.L.; DINIZ-MENDES, L.; NIEL, C. Torque teno virus tissue distribution in boars naturally infected with porcine circovirus 2. In: American Society for Virology, **28. Annual Meeting**, 2009, Vancouver. ASV meeting, 2009b.

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

DEWEY, C.E. Diseases of the Nervous and Locomotor Systems. . In: **Diseases of swine.** STRAW, B.E., 9th ed., Ames, IA, USA: Blackwell Publishing, 2006, p. 87–111.

ELLIS, J., ALLAN, G., KRAKOWKA, S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine Torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning wasting syndrome in gnotobiotic pigs. **Am. J. Vet. Res.** v. 69, p. 1608–1614, 2008.

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

ELLIS, J.; HASSARD, L.; CLARK, E.; HARDING, J.; ALLAN, G.; WILLSON, P.; STROKAPPE, J.; MARTIN, K.; McNEILLY, F.; MEEHAN, B.; TODD, D.;

HAINES, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Canadian Veterinary Journal**. v.39, n.1, p.44-51, 1998.

FERNANDES, L.T.; ZANELLA, J.R.C.; TROMBETTA, C.; SOBESTIANSKY, J. Sequence analysis of four Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV2) associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). In: XIV ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 2003, Florianópolis. **Virus Reviews & Research**. v. 8, p. 81, 2003b.

FERNANDES, L. T.; CIACCI-ZANELLA J. R.; SOBESTIANSKY, J.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 isolado no Brasil e parvovírus suíno em suínos SPF. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, p. 1-8, 2006.

GAVA, D.; ZANELLA, E.L.; MORES, N.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, p. 70-76, 2008.

GRESHAM, A. Infectious reproductive disease in pigs. **In Practice**. p. 466-473, 2003.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMEL, A.; LIN, L.L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; NAYAR, G.P.S. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 44-52, 2000.

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

HESSE, R.; KERRIGAN, M.; ROWLAND, R.R.R. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. **Virus Research** v. 132, p. 201–207, 2008.

HINES, R.K.; LUKERT, P.D. Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. **Proc Am Assoc Swine Pract**. p. 344–345, 1994.

HORLEN, K.P.; SCHNEIDER, P.; ANDERSON, J.; NIETFELD, J.C. **Journal of Swine Health and Production**. v. 15, p. 270-277, 2007.

JANKE, B. Case report: porcine circovirus as a cause of reproductive problems. In: **Proceedings** of the Iowa Veterinary Medicine Association, p. 101, 2000.

JELCIC, I., HOTZ-WAGENBLATT, A., HUNZIKER, A., ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E.-M. Isolation of multiple TT virus genogroups from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. **J Virol**. v. 78, p. 7498–7507, 2004.

KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of swine Torque teno virus in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **Journal of General Virology**. v. 87, p. 833–837, 2006.

KEKARAINEN, T.; LOPEZ-SORIA, S.; SEGALÉS, J. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. **Theriogenology**. v. 68, p. 966–71, 2007.

KIM, J.; CHAE, C. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 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**. v. 92, p. 105–111, 2001a.

KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. Differentiation of PCV1 and PCV2 in boar semen using a multiplex nested-PCR. **Journal of Virological Methods**. v. 98, p. 25-31, 2001b.

KIM, J., CHAE, C. 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 co-infected pigs. **Journal of Veterinary diagnostic investigation**. v. 16, p. 45-50, 2004a.

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

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Brief. Bioinform.** v. 5, p. 150-163, 2004.

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**. v.79, n.13, p.8262-8274, 2005.

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

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTÍNEZ-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. **The Veterinary Journal**. v. 169, p. 454–456, 2005.

MANKERTZ, A., DOMINGO, M., FOLCH, J.M., LECANN, P., JESTIN, A., SEGALÉS, J., CHMIELEWICZ, B., PLANA-DURÁN, J., SOIKE, D. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. **Virus Res.** v. 66, p. 65–77, 2000.

MARTELLI, F.; CAPRIOLI, A.; DI BARTOLO, I.; CIBIN, V.; PEZZOTTI, G.; RUGGERI, F.M. Detection of swine Torque teno virus in Italian pig herds. **J Vet Med Series B**. v. 53, p. 234–8, 2006.

MARTINÉZ-GUINÓ, L., KEKARAINEN, T., SEGALÉS, J. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. **Theriogenology**. v. 71, p. 1390–1395, 2009.

McNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B.M.; FOSTER, J.C.; CLARK, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; ADAIR, B.M.; ALLAN, G.M. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virological Methods**. v.80, n.2, p.123-128, 1999.

MIKAMI, O.; NAKAJIMA, H.; KAWASHIMA, K.; YOSHII, M.; NAKAJIMA, Y. Nonsuppurative myocarditis caused by Porcine Circovirus type 2 in a weak-born piglet. **Journal of Vet med Science**. v. 67(7), p. 735-738, 2005.

MIYATA, H.; TSUNODA, H.; KAZI, A.; YAMADA, A.; KHAN, M.A.; MURAKAMI, J.; KAMAHORA, T.; SHIRAKI, K.; HINO, S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. **J.Virol.** v. 73(5), p. 3582-3586, 1999.

MUSHAHWAR, I.K.; ERKER, J.C.; MUERHOFF, A.S.; LEARY, T.P.; SIMONS, J.N.; BIRKENMEYER, L.G.; CHALMERS, M.L.; PILOT-MATIAS, T.J.; DESAI, S.M. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** v. 16(6), p. 3177-3182, 1999.

NIEL, C.; DINIZ-MENDES, L.; DEVALLE, S. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. **Journal of General Virology**. v. 86, p. 1343–1347, 2005.

NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H.; KONISHI, K.; YOSHIZAWA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. **Biochemical And Biophysical Research Communications**. v. 241, p. 92–97, 1997.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E.G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A.; Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Can Vet J**. v. 42, p. 551-553, 2001.

OKAMOTO, H.; NISHIZAWA, T.; KATO, N.; UKITA, M.; IKEDA, H.; IIZUKA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with post-transfusion hepatitis of unknown etiology. **Hepatol.Res**. v. 10(1), p. 1-16, 1998.

OKAMOTO, H., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, T., TAWARA, A., FUKAI, K., MURAMATSU, U., NAITO, Y.; YOSHIKAWA, A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. **Journal of General Virology**. v. 83, p. 1291–1297, 2002.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. **Virology** v. 357, p. 175–185, 2007.

PARK, J.S.; KIM, J.; HA, Y.; JUNG, K.; CHOI, C.; LIM, J.K.; KIM, S.H.; CHAE, C. Birth Abnormalities in Pregnant Sows Infected Intranasally with Porcine Circovirus 2. **J. Comp. Path.** v. 132, p. 139–144, 2005.

PENG, Y. H.; NISHIZAWA, T.; TAKAHASHI, M.; ISHIKAWA, T.; YOSHIKAWA, A.; OKAMOTO, H. Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants. **Arch Virol**, v. 147, p. 21–41, 2002.

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

PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M.; CASTRO, L.A.; ANTONIASSI, N.A.B.; RAVAZZOLO, A.P.; SONNE, L.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 27(10), p. 425-429, 2007.

PITTMAN, J.S. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. **Journal of Swine Health Production**. v. 16(3), p. 144–148, 2008.

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

ROSELL, C.; QUINTANA, J.; RODRÍGUEZARRIOJA, G.M.; BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Diagnóstico laboratorial de la infección por PCV1 y PCV2. In: Porci: **Tratado de Ganado Porcino**, Madrid: Grupo Luzán 5, 2000, n.56, p.65-78.

SANCHEZ, R.E.JR.; NAUWYNCK, H.J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.M.; PENSAERT, M.B. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. **Veterinary Microbiology**. v. 83, p. 169–176, 2001.

SANCHEZ, R.E.JR.; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H.J.; PENSAERT, M.B. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**. v. 95, p. 15–25, 2003.

SEGALÉS, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFER-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO, P.; ALLAN, G. PCV-2 genotype definition and nomenclature. **Vet. Rec.** v. 162, p. 867-868, 2008.

SIBILA, M.; MARTÍNEZ-GUINÓ, L.; HUERTA, E.; MORA, M.; GRAU-ROMA, L.; KEKARAINEN, T.; SEGALÉS, J. Torque teno virus (TTV) infection in sows and suckling piglets. **Veterinary Microbiology**. v. 137, p. 354–358, 2009.

SOBESTIANSKY, J. **Circovirose suína e circovirus suíno**. Goiânia: Gráfica Art 3, 2002. p. 34-43.

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

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

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. CLUSTAL W. **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 4673-4680, 1994.

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

WEIBLEN, R. Viroses emergentes em suínos: como surgem e possível importância? **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, p. 91-96, 2009.

WEST KH, BYSTROM JM, WOJNAROWICZ C, SHANTZ N, JACOBSON M, ALLAN GM, HAINES DM, CLARK EG, KRKOWKA S, MCNEILLY F, KONOBY C, MARTIN K, ELLIS JA. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 11, p. 530–532, 1999.

ZANELLA, J.R.C., MORES, N. Síndrome multisistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. **In: Congresso Mercosur de Producción Porcina**, Buenos Aires, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1: Questionário aplicado para selecionar granjas para o projeto Diagnóstico de Doenças Reprodutivas



Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SEG - Sistema Embrapa de Gestão

Índices reprodutivos da granja nos últimos 6 meses considerando objetivo e momento de interferência			
Problemas na gestação	Objetivo	Nível de interferência	Situação da granja
Retorno ao cio (Total)- %	10	15	
Retorno regular - %	6	8	
Retorno irregular - %	3	5	
Negativo (teste prenhez) %	3	5	
Aborto %	2	4	
Falsa gestação - %	1	3	
Natimorto - %	7	10	
Mumificado - %	3	5	

Responsável pelas informações: _____

ANEXO 2: SOLUÇÕES UTILIZADAS NA IMUNOHISTOQUÍMICA

• PBS (SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA)

Solução estoque: Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

- Fosfato de sódio dibásico (NaHPO₄) 7H₂O: 11,4 g
 - Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 2H₂O: 3,3 g ou (NaH₂PO₄) H₂O: 2,54 g ou 2,92 g
- Manter a solução estoque refrigerada.

Solução trabalho: Tampão fosfato salino 0,01 M pH 7,2-7,4

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

Solução de lavagem com PBS twen

- Solução trabalho: 1000 ml
- Tween: 500 µL

• Tripsina

- 10 mg de tripsina
- 10 mL de TBS

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

• Peróxido de Hidrogênio(H₂O₂) 3%

- 3 mL H₂O₂
- 97 mL de água destilada

• Diluente Soro

- 100 mL PBS (solução trabalho)
- 0,1 g BSA (albumina bovina)
- 0,5 g azida sódica

• DAB

- 1 mL de buffer (provisto pelo Kit Dako)
- 1 gota de solução DAB

• HEMATOXILINA DE HARRIS

- 1 g de hematoxilina
- 10 mL de álcool 100%

Dissolver 20 g de sulfato de alumínio e potássio em 200 mL de água destilada em um erlenmeyer com ajuda de calor. Adicionar à solução de hematoxilina. Levar a mistura à fervura rápida, e em seguida, adicionar 0,5 g de óxido de mercúrio. Esfriar em banho-maria 56°C por 5 minutos e em seguida, colocar em água corrente para o resfriamento da solução. Armazenar em frasco âmbar.

ANEXO 3: SOLUÇÕES UTILIZADAS NA EXTRAÇÃO DE DNA:

- Tampão de lise:
Misturar em um frasco de 500 mL:
 - 4 mL de NaCl 5 M
 - 10 mL de Tris 1 M pH 7,5
 - 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0
 - 5 mL de SDS 20%
 - 77 mL de água ultra pura estérilEstocar a temperatura ambiente.
- Tris 1M pH 7,5
 - 48,44 g de Tris Base
 - 350 mL de água ultra pura
 - misturar com barra magnética até entrar em solução.
 - ajustar pH para 7,5 com HCl concentrado (de 28 a 30 mL)
 - completar volume até 400 mL com água ultra pura
 - autoclavar 30 minutos a 121°CEstocar a temperatura ambiente.
- EDTA 0,5 M pH 8,0
 - 77,44 g de EDTA 2H₂O
 - 300 mL de água ultra pura
 - medir o pH observando que o EDTA não entra em solução até que atinja pH 8,0, por isso, começar a misturar com barra magnética adicionando NaOH 10 N até chegar a pH 8,0
 - completar a solução para 400 mL
 - autoclavar a 121°C por 15 minutosArmazenar a temperatura ambiente.
- SDS 20%
 - 40 g de SDS
 - 150 mL de água ultra pura
 - aquecer em banho-maria 56°C alguns minutos
 - misturar com barra magnética até entrar em solução
 - filtrar em membrana de 0,45 µmArmazenar a temperatura ambiente.
- NaCl 5 M
 - 116,90 g de NaCl
 - 380 mL de água ultra pura
 - agitar com barra magnética até entrar em solução
 - completar com água ultra pura até 400 mL
 - autoclavarArmazenar a temperatura ambiente.
- Etanol 75%
 - 75 mL de etanol
 - 25 mL de água ultra pura estéril
 - misturar e aliquotar em frascos de 50 mL

Conservar a -20°C .

- Proteinase K: deve ser ressuspensa em tampão próprio, de acordo com a marca, de modo a apresentar concentração final de $20\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Concentração final	Estoque	Volume
Invitrogen		
10 mM tris pH 7,5	Tris pH 7,5 1 M	1 mL
20 mM cloreto de cálcio	CaCl ₂ 1 M	2 mL
50% glicerol	Glicerol	50 mL
	Água ultra pura estéril	47 mL

- Fenol equilibrado
 - descongelar 500 g de fenol a 65°C (500 g = 500 mL)
 - adicionar 0,5 g de 8-hidroxyquinoline e misturar
 - colocar 500 mL de Tris 1 M pH 8,0
 - acrescentar 500 mL da solução de fenol
 - misturar delicadamente
 - deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases
 - coletar o fenol em um becker
 - descartar a fase aquosa
 - colocar o fenol num funil de decantação
 - adicionar 500 mL de Tris Base 0,1 M
 - misturar delicadamente
 - deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases
 - coletar o fenol em um becker
 - medir o pH da fase aquosa, que deve ser maior que 7,5
 - distribuir o fenol em frascos de 50 mL
 Armazenar a -20°C .
- Tris Base 1 M pH 8,0
 - 121,14 g de Tris Base
 - 850 mL de água ultra pura
 - misturar até entrar em solução
 - ajustar o pH 8,0 com HCl concentrado
 - completar a solução para 1000 mL
 - autoclavar a 121°C por 15 minutos
 Armazenar a temperatura ambiente.
- Acetato de Sódio 3 M pH 5,2
 - 163,24 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 98,40g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ anidro
 - 350 mL de água ultra pura
 - misturar com barra magnética até entrar em solução
 - ajustar pH com ácido acético glacial (50 mL)
 - completar solução para 400 mL com água ultra pura
 - autoclavar
 Armazenar a temperatura ambiente.
- Tampão TE
 - 10 mM Tris Base pH 7,5
 - 1 mM EDTA 0,5 M pH 8,0

- Tampão de eletroforese em gel de agarose
 - 108 g de Tris Base
 - 55 g de Ácido bórico
 - 100 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 1000 mL de água destilada