

JULIANA EVANGELISTA BEZERRIL

**AVALIAÇÃO DA CO-INFECCÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 COM
Mycoplasma hyopneumoniae EM AMOSTRAS DE PULMÕES COLETADAS EM
ABATEDOURO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

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

T

B574a
2009

Bezerril, Juliana Evangelista, 1984-

Avaliação da co-infecção do circovírus suíno 2 com
Mycoplasma hyopneumoniae em amostras de pulmões
coletadas em abatedouro / Juliana Evangelista Bezerril.
– Viçosa, MG, 2009.

xii, 44f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vitoria.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 37-44.

1. Suíno - Pulmões - Doenças. 2. Infecções respiratórias.
3. Circovírus suíno. 4. *Mycoplasma hyopneumoniae*.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.


CDD 22.ed. 636.4089624

JULIANA EVANGELISTA BEZERRIL

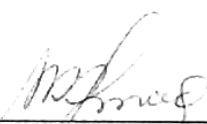
AVALIAÇÃO DA CO-INFECÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 COM
Mycoplasma hyopneumoniae EM AMOSTRAS DE PULMÕES
COLETADAS EM ABATEDOURO

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2009.



Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Co-orientador)




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



Dr. Abelardo Silva Júnior



Prof. Richard da Rocha Filgueiras



Profa. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Orientadora)

Dedico esse trabalho à minha família que é o meu alicerce: Vó Antonieta, Mãe, Pai, Cregi, Simone, Weslei, Rodolfo, Caroline, Jaqueline, Maria Helena e José Luiz.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dra. Marlene Isabel Vargas Vitoria, pela confiança depositada, o incentivo constante, os ensinamentos e as palavras amigas.

Ao professor Dr. Joaquim Hernán Salcedo Patarroyo, pelos grandes ensinamentos e pelo carinho.

À professora Dra. Márcia Rogéria de Almeida, por ter permitido minha entrada no grupo do LIMA e pela co-orientação.

Ao professor Dr. Laércio dos Anjos Beijamim, por ter me orientado inicialmente, por todo o carinho e disposição de ajudar sempre.

Ao professor Dr. Richard da Rocha Filgueiras, que foi quem despertou em mim o amor pela patologia e foi sempre um exemplo de mestre.

Ao professor Dr. Abelardo Silva Júnior, pela colaboração desde a elaboração do projeto até a reta final.

Ao professor Dr. José do Carmo, pelos ensinamentos de histopatologia.

Aos funcionários Cláudio, Adão, Valdir, Márcio e Rosi, por toda a ajuda.

Aos amigos de laboratório Gustavo Rigueiras, Mariana Fausto Lima, Orlando Chiarelle Neto, Pedro Vidigal, Rafael Tchátchá, Carolzinha, Bernardo, Yaro, Ronny, Ramom, Matheus, Fernanda Cardoso, Antônio, Bruno, Francisney e Luana.

À doutoranda de Bioquímica Agrícola/UFV Fernanda Miquelitto, pela realização do PCR em tempo real e demais auxílios.

Aos estagiários Francisco e Diego pela ajuda.

Ao meu grande amigo João Paulo Machado, que desde o dia em que entrei tem me acompanhado firme e forte nos programas acadêmicos e não acadêmicos, por todos os momentos que vivemos em Viçosa e por tudo que aprendemos um com outro. Vou levar saudade João...

Ao meu amigo Vinícius Vinter Wiana, pelos ensinamentos, ajuda e risadas.

À minha querida amiga Paulinha.

A todos os amigos que ligados ou não ao Programa de Veterinária compartilharam comigo esses dois anos fazendo com que fosse tudo mais agradável.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE ANEXOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Síndrome do definhamento multissistêmico pós-desmame (PMWS)	3
2.1.1. <i>Etiologia</i>	3
2.1.2. <i>Epidemiologia</i>	4
2.1.3. <i>Patogenia</i>	4
2.1.4. <i>Sinais clínicos e aspectos patológicos</i>	5
2.1.5. <i>Diagnóstico</i>	7
2.1.6. <i>Controle</i>	7
2.2. Pneumonia Enzoótica Suína	8
2.2.1. <i>Etiologia</i>	8
2.2.2. <i>Epidemiologia</i>	9
2.2.3. <i>Patogênese</i>	10
2.2.4. <i>Sinais clínicos e aspectos patológicos</i>	10
2.2.5. <i>Diagnóstico</i>	11
2.2.6. <i>Controle</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Coleta de amostras	13
3.2. Avaliação macroscópica	13
3.3. Exame histopatológico	14
3.4. PCR em tempo real para detecção de PCV2	15
3.5. Imunoistoquímica para detecção de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Histopatologia	17
4.2. PCR em tempo real para PCV2	22
4.3. Imunoistoquímica para <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	22

5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	27
7. ANEXOS	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Avaliação histopatológica de pulmões coletados (com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas).	17
Figura 2 -Avaliação histopatológica dos pulmões coletados sem lesões macroscópicas.	18
Figura 3 -Avaliação histopatológica dos pulmões coletados com lesões macroscópicas.	19
Figura 4 – Micrografias histopatológicas.	20
Figura 5 - Micrografias histopatológicas.	21
Figura 6 - Avaliação do teste de imunoistoquímica para o total de amostras coletadas (com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas).	22
Figura 7 - Avaliação pelo teste de imunoistoquímica das amostras sem lesões macroscópicas.	23
Figura 8 - Avaliação pelo teste de imunoistoquímica das amostras com lesões macroscópicas.	23
Figura 9 – Micrografias do teste de imunoistoquímica.	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PMWS	Síndrome do Definhamento Multissistêmico Pós-Desmame
PCV2	circovírus suíno 2
LSPS	Levantamento Sistemático da Produção e Abate de Suínos
Abipecs	Associação Brasileira de Indústrias Processadoras e Exportadoras de Carne Suína
PRRSV	Síndrome Respiratória e Reprodutiva Viral Suína
SIV	Vírus da Influenza Suína unidades produtoras de leitão (UPL)
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real Interleucina IL
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
PDNS	síndrome da dermatite e nefropatia
PRDC	complexo da doença respiratória suína
ISH	hibridização in situ
IHC	imunoistoquímica
IIF	ensaios de imunofluorescência
PES	pneumonia enzootica suína
TNF	Fator de Necrose tumoral
IFA	imunofluorescencia
ELISA	Enzima imuno-ensaio (<i>Enzyme Llinked Immunosorbent Assay</i>)
PAP	técnica da peroxidase-anti-peroxidase
LBCHV	Laboratório de Controle de Hematozoários e Vetores
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
Ig	Imunoglobulina
DNA	Ácido desoxiribonucléico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
LIMA	Laboratório de Infectologia Molecular
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária
UFV	Universidade Federal de Viçosa
µL	Microlitro

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Tabela com os achados histopatológicos encontrados nos pulmões analisados de animais com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas	28
ANEXO 2: Tabela dos resultados da avaliação do qPCR.	35
ANEXO 3 : Avaliação pelo teste de imunistoquímica	36

RESUMO

BEZERRIL, Juliana Evangelista. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Avaliação da co-infecção do circovírus suíno 2 com *Mycoplasma hyopneumoniae* em amostras de pulmões coletadas em abatedouro.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Coorientadores: Laércio dos Anjos Benjamim e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

A circovirose suína, causada pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2), e a pneumonia enzoótica suína, causada pelo *Mycoplasma hyopneumoniae*, são doenças infecto-contagiosas de grande importância na suinocultura mundial, ambas causam pneumonias com diferentes formas de apresentação. Têm distribuição cosmopolita e estão entre as principais causas de perdas econômicas. O presente trabalho foi realizado com o objeto de avaliar a coinfeção entre Circovírus suíno 2 e o *Mycoplasma hyopneumoniae*, por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR), técnica de imunistoquímica e exames histopatológicos. Cento e vinte fragmentos de pulmões, sendo 45 com lesões macroscópicas (CLM) e 75 sem lesões macroscópicas (SLM) foram analisados pela histopatologia. Destes, foram selecionadas aleatoriamente 32 amostras (sendo 16 sem lesões macroscópicas e 16 com lesões macroscópicas) para a realização dos testes de imunistoquímica (para a detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae*) e qPCR (para detecção do PCV2). Não foi observada diferença significativa entre os grupos (SLM e CLM) em nenhum dos testes, o que indica que a ausência de lesões macroscópicas não descarta a possibilidade da presença dos agentes nem de lesões microscópicas. A técnica de histopatologia representou uma importante ferramenta para se aproximar ao diagnóstico. Embora as lesões não sejam patognômicas para os agentes avaliados, elas são bastante sugestivas dos quadros viral e bacteriano, e esses achados, aliados a presença de sinais clínicos e detecção do agente (que são mais frequentemente realizados por qPCR e imunistoquímica), confirmam o diagnóstico de cada agente isoladamente ou da coinfeção. Apesar das amostras analisadas pelo qPCR terem apresentado grande número de resultados negativos e baixa carga viral, diversos autores relatam que o pulmão é um dos órgãos com menor carga viral de PCV2, sendo desta forma os órgãos linfóides, principais alvos do PCV2, mais indicados para a quantificação viral. Foi verificada uma correlação

positiva do teste de imunistoquímica com o teste histopatológico de acordo com o teste estatístico de Pearson, o que confirma a presença do agente nas lesões observadas na histopatologia. Estudos futuros utilizando a coleta de linfonodos (órgão alvo do PCV2) e amostras coletadas de diferentes regiões anatômicas pulmonares devem ser realizados para avaliar a co-infecção de uma forma mais acurada.

ABSTRACT

BEZERRIL, Juliana Evangelista. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, february, 2009.
Evaluation of co-infection of porcine circovirus 2 with *Mycoplasma hyopneumoniae* in lung samples collected from slaughterhouse. Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-advisers: Laércio dos Anjos Benjamim and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

The porcine circovirus, caused by the porcine circovirus type 2 (PCV 2), and the porcine enzootic pneumonia, caused by the *Mycoplasma hyopneumoniae*, are infectious contagious diseases of great importance for worldwide swine production, both causes pneumonias with different presentation patterns. They have cosmopolite distribution and are among the major causes in economic losses. This work was made aiming the evaluation of the co-infection between porcine circovirus 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* using real time polymerase chain reaction (qPCR), immunohistochemistry and histopathological analyses. 120 lungs fragments, 45 being from fragments with macroscopic lesions (CLM) and 75 being from fragments without macroscopic lesions (SLM) were analyzed by histopathology procedures. Among these, 32 samples were randomly selected (being 16 without macroscopic lesions and 16 with macroscopic lesions) for the immunohistochemistry analyses (for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection) and qPCR (for PCV 2 detection). No significant difference was observed between the groups (SLM and CLM) on the tests, indicating that the absence of macroscopic lesions doesn't reject the possible presence of agents neither the presence of microscopic lesions. The histopatological technique showed itself as an important tool for diagnosis approach. Although the lesion are not patognomonic for the agents in the analyses, they are quite suggestive about the viral and bacterium scene, and these findings, together with the presence of clinical signs and agent detection (more frequently made by qPCR and immunohistochemistry), confirm the diagnosis of each agent isolated or co-infection. Although the samples analyzed by RT-PCR had shown higher number of negative results and low viral quantity, many authors related that lungs are among the organs with the lowest viral quantities of PCV2, being, for that reason, the liver linfonodes, the main target of the PCV2, more indicated for viral quantification. It was verified a positive correlation between the immunohistochemistry analysis and the histopathology analysis using the Pearson statistical test, which

confirms the presence of the agent in the histopathology observations. Forward studies using linfonodes samples (target of the PCV2) and samples collected from different lung anatomic regions must be realized for evaluation of a co-infection for more accurate results.

1- JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Com o crescimento da suinocultura e sua participação no agronegócio mundial, o aprimoramento das técnicas de manejo, nutrição e reprodução de animais geneticamente melhorados torna-se essencial. Entretanto, falhas nos programas de sanidade podem comprometer o potencial da produção. Baseando-se neste contexto, os agentes infecciosos de suínos têm recebido grande atenção.

A suinocultura no Brasil constitui atualmente uma atividade organizada, presente em aproximadamente 50% das propriedades rurais existentes no país. O rebanho suíno brasileiro é estimado em 36,5 milhões de cabeças (IBGE, 2005) e é considerado endêmico para a síndrome do definhamento multissistêmico pós-desmame (PMWS) desde 1999, quando a EMBRAPA Suínos e Aves/Concórdia/SC, identificou pela primeira vez o circovírus suíno 2 (PCV2) associado à PMWS (ZANELLA et al., 2001). Porém, Zanella et al. (2003) detectaram a presença do PCV2 em arquivos teciduais de suínos desde 1988, comprovando assim a presença do agente no Brasil bem antes do primeiro isolamento viral associado à PMWS realizado no Canadá.

Segundo o Levantamento Sistemático da Produção e Abate de Suínos (LSPS), desenvolvido pela Associação Brasileira de Indústrias Processadoras e Exportadoras de Carne Suína (Abipecs) em conjunto com a Embrapa Suínos e Aves, o Brasil mantém a tendência de aumento no alojamento de matrizes do rebanho industrial. Este aumento vem sendo verificado desde o final do ano de 2004 e deve se intensificar em 2008 e 2009. Assim, observa-se crescimento na oferta de carne de 4% a 5% ao ano. Com isso, o Brasil ultrapassou a União Européia e o Canadá no cenário da produção mundial de carne suína, passando de 2,99% da produção mundial em 2006 para 3,17% em 2007, com estimativas de atingir 3,34% em 2008 (MIELE e GIROTTO, 2008).

Além das perdas diretas causadas pela morte dos animais, a PMWS determina grandes prejuízos econômicos em função de menor conversão alimentar, maior susceptibilidade do animal a infecções secundárias e associação do vírus com outros patógenos, tais como: Síndrome Respiratória e Reprodutiva Viral Suína (PRRSV), parvovírus suíno, Vírus da Influenza Suína (SIV), *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Haemophilus parasuis*. Por conseguinte, torna-se muito importante o reconhecimento da PMWS em granjas suínolas (FRANÇA et al, 2005).

No Brasil, os prejuízos causados pela circovirose suína são bastante expressivos. Em um estudo realizado na região sul do país, foram encontrados índices de mortalidade variando entre 2 a 10 % e a ocorrência em 2003 foi estimada em 62% das unidades produtoras de leitão (UPL) e 66,7% das terminações estudadas. Estes dados levam a uma estimativa de prejuízo em torno de 33 milhões de reais por ano apenas para a região sul do Brasil (MORÉS, 2005).

A patogenia da infecção pelo PCV2 ainda permanece não esclarecida, sabe-se que a coinfeção desse vírus com outros patógenos, como o *Mycoplasma hyopneumoniae* são capazes de agravar a doença (FERNANDES et al, 2006).

A pneumonia enzoótica é uma doença altamente contagiosa, de distribuição cosmopolita e é considerada uma das principais causas de perda econômica na suinocultura. Tem como principal agente etiológico o *Mycoplasma hyopneumoniae* e é frequentemente exarcebada por agentes secundários (YAMAMOTO, 1994).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a co-infecção do Circovírus suíno 2 e *Mycoplasma hyopneumoniae* por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), imunistoquímica e exames histopatológicos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Síndrome do definhamento multissistêmico pós-desmame (PMWS)

2.1.1. Etiologia

O circovírus suíno foi identificado primeiramente por Tischer et al. (1974), mediante microscopia eletrônica, ao descreverem um vírus morfológicamente semelhante a um *Picornavírus*, que causava infecções persistentes em cultivo de células renais de suínos (PK-15) sem induzir efeito citopático (TISCHER et al., 1986).

Estudos subsequentes demonstraram, pela caracterização de seus ácidos nucléicos, que este vírus possuía um filamento único de DNA circular. Por ser um vírus animal a apresentar genoma circular de DNA, o nome circovírus foi proposto, passando a fazer parte da família *Circoviridae* (TISCHER et al., 1986). Até o momento já foram identificadas duas espécies de PCV: o *Circovírus* suíno 1 (PCV1), contaminante de células PK15 e considerado não patogênico para suínos e o circovírus suíno 2 (PCV2) associado a Síndrome de refugagem multissistêmica pós-desmame dos suínos (PMWS). (TISCHER et al., 1986).

O PCV2 resiste à inativação quando exposto ao ambiente ácido (pH 3), ao clorofórmio, a temperaturas entre 56°C e 70°C (Allan et al. 1994), ao congelamento, à luz ultra-violeta e aos desinfetantes. O vírus permanece estável em fezes e secreções respiratórias (SHIBATA et al. 2003). O PCV2 pode se replicar em algumas linhagens celulares suínas e é dependente de proteínas celulares expressas durante a fase S do ciclo celular (TISCHER et al. 1982).

As sequências genômicas do PCV1 e PCV2 possuem menos de 80% de similaridade; porém, análises do genoma de vários isolados de PCV2 da Europa, América do Norte, sudeste asiático e do Brasil concluíram que estes subgrupos são muito semelhantes, com 96% em média de homologia entre os isolados. Contudo existem variações nas sequências de vários PCV2, pesquisas buscando correlação com os sinais clínicos ou gravidade da doença concluíram que existem “variantes” do vírus. No genoma do PCV2 já foram identificadas diversas ORFs (fases abertas de leitura).

Entretanto, as mais conhecidas e estudadas são a ORF1, a ORF2 e a ORF3. A ORF1 codifica uma proteína Rep, essencial para replicação do DNA viral, enquanto a ORF2 codifica uma proteína estrutural do capsídeo viral, com massa molecular de 30 kDa. A ORF3 codifica uma proteína viral não essencial para replicação, mas com um papel importante na indução de apoptose através da ativação de mecanismos das caspases 8 e 3 que induzem a morte celular (CHEUG., 2003).

2.1.2. Epidemiologia

A infecção pelo PCV2 foi descrita em países da Europa, Ásia, Américas do Sul e do Norte e Oceania por diversos autores (ALLAN; 2000; MAGAR et al., 2000; SATO et al., 2000; ; SARRADELL et al., 2002; SEGALÉS, 2002). O agente foi detectado também em suínos selvagens (*Sus scrofa*) (KNELL et al., 2005).

No Brasil, a PMWS foi diagnosticada em 2000, na Região Sul (ZANELLA e MORES, 2003) e, em 2002, no Estado do Rio de Janeiro (FRANÇA, 2004), presença do DNA viral já foi detectada em São Paulo (CASTRO et al. 2003), Minas Gerais (MONNERAT, 2003) e Espírito Santo (CHIARELLE et. al., 2006). No Mato Grosso do

O PCV2 tem sido detectado em secreções nasais, saliva, fezes e soro de suínos afetados (SHIBATA et al., 2003; YANG et al., 2003; SEGALÉS et al., 2005), o que indica a disseminação horizontal da doença (FERNANDES et al., 2003). A transmissão vertical, associada com falhas reprodutivas tem sido descrita (PENSAERT et al., 2004; MALDONADO et al., 2005). Estes estudos assinalam a possibilidade de que existam outras vias de contágio, como o sêmen (LAROCHELLE et al., 2000; KIM et al., 2001; CIACCI-ZANELLA et al., 2003; ROSE, et al., 2003; CIACCI-ZANELLA et al., 2004).

2.1.3. Patogenia

Embora a maioria dos animais seja positiva para PCV2, eles podem não apresentar as manifestações clínicas (SEGALÉS e DOMINGO, 2002). A infecção subclínica pelo PCV2 é caracterizada pela presença do vírus e ausência das doenças associadas ao PCV2. Alguns autores sugerem a necessidade de coinfeção ou co-fatores

relacionados ao manejo para o desenvolvimento da doença (ALLAN et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2001)

As lesões microscópicas mais comumente observadas em leitões com PMWS incluem redução ou perda dos linfócitos, aumento no número de macrófagos e perda parcial com redistribuição das células apresentadoras de antígenos no tecido linfóide. Estas alterações sugerem efeito imunodepressor do PCV2 nos animais afetados. O principal mecanismo na redução das células B e T dos tecidos linfóides parece ser a morte celular por apoptose sendo, portanto, um mecanismo importante na indução da depleção linfóide (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007).

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

Análises na cinética celular mostraram uma linfopenia consequente da diminuição de linfócitos B CD21⁺ e linfócitos T CD3⁺. Toda a subpopulação de linfócitos Th de memória CD3⁺CD4⁺CD8⁺, Th “naïve” CD3⁺CD4⁺CD8⁻, células T CD3⁺CD4⁻CD8⁺ e células $\gamma\delta$ TCR⁺ CD3⁺CD4⁻CD8⁻ foram susceptíveis á infecção pelo PCV2. As células NK CD3⁻CD4⁻CD8⁺ também estão diminuídas nos animais afetados com PMWS (NIELSEN et al., 2003).

2.1.4. Sinais clínicos e aspectos patológicos

As bases patogênicas relacionadas ao aparecimento da doença ainda são controversas. A relação entre o PCV2 e algumas manifestações de doença têm sido estabelecidas não somente na presença do vírus como agente causal único da doença (SEGALÉS et al., 2004). Alguns autores têm argumentado a necessidade de uma co-infecção para o desenvolvimento da doença (ALLAN et al., 1999; CHO e CHAE, 2000) ou co-fatores não infecciosos (ALLAN et al., 2000; KRAKOWKA et al., 2001; KYRIASKIS et al., 2001).

O PCV2 tem sido associado principalmente à PMWS e outras doenças, como falhas reprodutivas, síndrome da dermatite e nefropatia (PDNS), complexo da doença

respiratória suína (PRDC), tremor congênito e pneumonia proliferativa necrotizante (PNP) (CHAE, 2004).

Muitos sinais clínicos são observados nos leitões de rebanhos infectados, entre eles inclui-se o emagrecimento rápido e progressivo como o sinal mais típico. Observa-se também apatia, anorexia, pelo opaco, dispnéia, conjutivite, palidez e icterícia da pele e mucosas, sinais de pneumonia, diarreia e caquexia. Entranto, a forma subclínica pode ocorrer em muitos rebanhos afetados, onde observa-se apenas desenvolvimento insuficiente e maior ocorrência de outros problemas sanitários, especialmente diarreia e pneumonia (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007).

Os achados macroscópicos consistem em atraso no desenvolvimento corpóreo e linfadenomegalia generalizada (DARWISH et al., 2004; ROSSELL et al., 1999) especialmente dos linfonodos mesentéricos e inguinais. Pulmões não colabados, apresentando impressões das costelas, indicando pneumonia intersticial são as lesões pulmonares mais freqüentes. Áreas de consolidação pneumônica podem ser encontradas, especialmente nas regiões crânio-ventrais dos mesmos, indicando complicação do quadro de pneumonia por infecção bacteriana secundária (ROSSEL et al., 1999). A ulceração da *pars oesophagica* também é relatada como um achado comum em animais afetados pela circovirose (ROSSEL et al., 1999; DARWISH et al., 2004). Presença de conteúdo intestinal fluido na porção final do íleo e cólon espiral também foi descrita por Allan e Ellis (2000). Recentemente, Opriessnig et al (2006) encontraram relação entre o PCV2 com achados de hemorragia cardíaca em suínos com histórico de morte súbita. Pode-se encontrar também aumento de volume dos rins com presença de pontos avermelhados na superfície renal. Além disso, os aumentos de volume do fígado e icterícia também podem ser encontrados (ALLAN e ELLIS, 2000).

As lesões histopatológicas são observadas em diversos órgãos, mas predominantemente nos órgãos linfóides. Essas lesões consistem em depleção linfocitária com presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, 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 freqüência variável como hepatites, nefrites e pneumonia intersticial nos animais infectados (ELLIS et al., 1998; ROSELL et al., 1999).

2.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico definitivo das doenças relacionadas ao PCV2 é baseado na detecção do antígeno ou ácido nucléico viral associado às lesões e sinais clínicos causados pela doença (ALLAN e ELLIS, 2000). Métodos de diagnóstico que são mais rotineiramente utilizados para detectar o PCV2 incluem hibridização *in situ* (ISH), imunistoquímica (IHQ), ensaios de imunofluorescência (IIF) (ELLIS et al., 1998, MOROZOV et al., 1998; 1999; ALLAN et al., 1999), assim como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALLAN et al., 1999; LAROCHELLE et al., 1999). O ácido nucléico do PCV2 é detectado no citoplasma de histiócitos, de células gigantes multinucleadas e outras células da linhagem monocítica fagocítica, como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas de tecidos linfóides (ROSSEL et al., 1999; ALLAN e ELLIS, 2000).

2.1.6. Controle

Apesar das dificuldades no controle da circovirose suína, algumas medidas como limitação do contato entre suínos, evitando-se misturas de lotes (origem e idade diferentes), remoção dos animais doentes, redução na introdução de animais no rebanho (fornecedor único), implementação do vazio sanitário nas fases de maternidade e creche, uniformização dos lotes, instalação de bebedouros de modelos adequados aos leitões (ZANELLA et al. 2003), segregação de classes, melhor ventilação e redução do número de animais causam melhoria da higiene e redução do estresse dos animais podendo diminuir o grau de infecção dos suínos (FRANÇA et al. 2005).

Atualmente, quatro vacinas comerciais têm sido utilizadas para combater a infecção por PCV2 em leitões e porcas, principalmente nos países da América do Norte e Europa. Todas têm mostrado um efeito protetor relativo, seja através da redução da intensidade das lesões características ou diminuindo o número de animais com a doença. Entretanto, mais testes devem ser realizados para avaliar a efetividade dessas vacinas. No Brasil, vacinas comerciais estão disponíveis no mercado e o método de vacinação autógena foi bastante disseminado nas granjas tecnificadas, sendo proibido pelo Ministério da Agricultura no final de 2007. (EMBRAPA., 2009)

2.2. Pneumonia Enzoótica Suína

2.2.1. Etiologia

O *Mycoplasma hyopneumoniae* é o principal agente etiológico responsável pela pneumonia enzoótica suína (PES). Outros patógenos como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* e *Arcanobacterium pyogenes* também são envolvidos freqüentemente na patogenia da doença (THACKER, 2006). A doença é caracterizada por alta morbidade e baixa mortalidade e apesar de suínos de todas as idades serem susceptíveis a infecção por *M. hyopneumoniae*, a pneumonia enzoótica não é normalmente observada em animais com menos de 6 semanas de idade. A prevalência da PES é particularmente alta em animais de terminação e a gravidade dos sinais clínicos depende da cepa envolvida, pressão de infecção, presença de infecções secundárias e condições ambientais. Quando a infecção por *M. hyopneumoniae* não é complicada por patógenos concomitantes, a doença pode cursar de forma subclínica com sinais clínicos moderados que consistem em tosse não produtiva crônica e redução das taxas de conversão alimentar. Quando patógenos secundários estão envolvidos, os sinais clínicos incluem dispnéia e febre, podendo levar à morte (MAES et al., 1996)

Os micoplasmas são diferenciados fenotipicamente de outras bactérias pelo tamanho pequeno e ausência de parede celular. Pertencem à classe *Mollicutes* (*mollis*, mole; *cutis*, pele, em Latim), composta pelos gêneros *Acholeplasma*, *Anaeroplasmata*, *Asteroplasmata*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Ureaplasma*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae* e gênero *Mycoplasma* (WALKER, 2003).

O *M. hyopneumoniae* é considerado um dos menores microorganismos de vida livre capazes de auto-replicação. É um parasito específico encontrado na mucosa do hospedeiro, multiplica-se por divisão binária e seu tamanho varia de 0,2 a 0,5 µm. Estruturalmente, apenas três componentes podem ser vistos: a membrana plasmática, ribossomos e o material genético (BASEMAM e TULLY, 1997)

O *M. hyopneumoniae* possui um pequeno genoma circular de fita dupla e não possui parede celular, o que faz com que ele seja polimorfo, sensível a várias condições ambientais, tais como pressão osmótica, detergentes e resistentes a antibióticos que

interferem na síntese da parede celular. Em função de seu reduzido genoma, o *M. hyopneumoniae* apresenta uma capacidade limitada de biossíntese dos componentes necessários ao seu metabolismo. (BASEMAM & TULLY, 1997)

O isolamento deste microorganismo é complicado devido a sua natureza fastidiosa e também pela freqüente presença no trato respiratório suíno de *M. hyorhinis*, causador de poliserosites e artrites e *M. flocculare*, espécie não patogênica que apresenta semelhanças ao *M. hyopneumoniae* em relação à morfologia, crescimento e antigenicidade (ROSS, 1999)

Assim como a maioria dos membros da ordem *Mycoplasmatales*, o *M. hyopneumoniae* infecta uma única espécie, porém os mecanismos de especificidade pelo hospedeiro ainda são desconhecidos. Uma notável característica da PES é a cronicidade. Igualmente importante é a habilidade que a bactéria possui de alterar ou desviar a resposta imune e pré-dispor o suíno a infecções secundárias (CIPRIAN et al., 1988; DEBEY e ROSS, 1994; THACKER et al., 1999).

2.2.2. Epidemiologia

No Brasil a pneumonia enzoótica ocorre em praticamente todas as áreas produtoras de suínos (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007).

A infecção pode ocorrer através de aerossóis gerados a partir de tosses e espirros dos animais infectados ou se difundir por contato direto. A infecção pode ainda se difundir horizontalmente de animais infectados para os não infectados (MORRIS et al., 1995) ou verticalmente das reprodutoras para seus leitões. (MAES et al., 1996)

Não há predileção por idade, sendo todos igualmente susceptíveis. O período de incubação varia geralmente de 10 a 16 dias. A pneumonia enzoótica é descrita como uma doença crônica de alta morbidade e baixa mortalidade (ROSS, 1999).

2.2.3. Patogênese

A patogênese da PES é um processo complexo, que envolve a infecção pela bactéria causadora e fatores de manejo. As vias aéreas infectadas evidenciam danos nas células ciliares e epiteliais. Após aderir-se aos cílios da traquéia, brônquios e bronquíolos, a bactéria paralisa e destrói estas estruturas, causando uma redução no principal mecanismo de limpeza pulmonar, predispondo os animais a infecções secundárias (DEBEY e ROSS, 1994). Um outro evento potencialmente importante da doença é a interação do *M. hyopneumoniae* com as células linfóides. A bactéria interage com macrófagos alveolares e linfócitos, estimulando-os a produzir citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) responsáveis pelas lesões pulmonares e pela hiperplasia linfóide perivascular e peribrônquica características da doença, sugerindo o envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das lesões (RODRÍGUEZ et al., 2004). Além disso, micoplasmas são capazes de ativar a mitose de linfócitos B e T, o que também poderia auxiliar na evolução da hiperplasia linfóide (RAZIN et al., 1998). Os linfócitos são vistos na camada adventícia das arteríolas e das vênulas. (ROSS,1999)

2.2.4. Sinais clínicos e aspectos patológicos

Os sinais clínicos mais comumente encontrados em animais agudamente acometidos incluem tosse, dispnéia e emagrecimento. Os casos crônicos apresentam tosse não produtiva acompanhada de crescimento retardado. (ROSS,1999)

Segundo Etheridge (1979) as lesões macroscópicas compatíveis com a infecção por *Mycoplasma hyopneumoniae* são alterações circulatórias (presença de áreas avermelhadas) e áreas hipocrepitantes, podendo apresentar hepatização que varia do púrpura ao cinza. Tais lesões são encontradas com maior frequência nas regiões crânio-ventrais do pulmão.

Microscopicamente, nos estágios iniciais observa-se perda de cílios, esfoliação e discreto acúmulo de neutrófilos ao redor das vias aéreas. Com a evolução da doença, há um aumento do número de linfócitos nos espaços peribronquiais, peribronquiolares e perivasculares (ROSS, 1999). Casos agudos podem mostrar discreta hiperplasia linfóide e um exsudato alveolar predominantemente neutrofílico (TAYLOR, 1996). No estágio

crônico da doença, há hiperplasia linfóide e espessamento dos septos alveolares. Por outro lado, colapso alveolar, enfisema alveolar e nódulos linfóides podem ser observados em lesões em resolução (ROSS, 1999). A hiperplasia linfóide pode estar relacionada aos sinais clínicos, porque a pressão dos agregados de tecido linfóide pode obliterar o lúmen dos bronquíolos e causar colapso dos alvéolos adjacentes (BAKERSVILLE, 1981). Os alvéolos podem conter líquido eosinofílico, edema e grande número de células mononucleares e polimorfonucleares. Embora tais lesões sejam característica de *M. hyopneumoniae*, estas não são específicas, podendo ser encontradas em pneumonias causadas por outros agentes. (ROSS,1999)

2.2.5. Diagnóstico

O isolamento de *M. hyopneumoniae* de pulmões afetados para cultura bacteriológica é considerado o melhor método de diagnóstico, mas o isolamento do patógeno requer meio específico. (SORENSEN et al., 1997). Comparado à detecção de por ensaio de imunofluorescência (IFA), ensaio de imunoadsorvância ligado a enzima (ELISA) e reação em cadeia da polimerase (PCR), o meio de cultura é o método mais sensível, particularmente em estágios finais de PES quando um menor número de micoplasmas estão presentes. Entretanto, a cultura de *M. hyopneumoniae* é laboriosa e consome tempo e frequentemente o meio de cultura pode apresentar o crescimento de *M. hyorhinae* ou *M. flocculare*. (MAES et al., 1996).

Testes sorológicos são frequentemente utilizados para monitoramento do estado de saúde das propriedades. O monitoramento de anticorpos contra *M. hyopneumoniae* são feitos Pelo método de ELISA e, menos frequentemente, por teste de fixação de complemento (SIBILA et al, 2008).

Imunoistoquímica e imunofluorescência detectam especificamente *M. hyopneumoniae* em fragmentos teciduais ou esfregaços, porém estas técnicas são realizadas pós-morte. Embora uma pequena amostra de pulmão seja utilizada quando esses testes são realizados, existe o risco de serem obtidos resultados falso-negativos se as vias aéreas não forem inclusas na amostra (CAI et al., 2007). Além disso, a sensibilidade do teste é comprometida pelo processamento do tecido. A qualidade do anticorpo utilizado, também limita a especificidade da reação, dando ao anticorpo

policlonal maior capacidade de ligar-se com outros patógenos intimamente relacionados ao *Mycoplasma* spp. (CHEIKH SAAD BOUTH et al., 2003).

Diversas técnicas de PCR para detecção de DNA de *M. hyopneumoniae* têm sido descritas em diferentes amostras. Silva et. al., (2009), detectaram recentemente a presença *M. hyopneumoniae* em amostras teciduais e suabes nasais. Comparada a técnica de cultura bacteriológica a PCR é mais rápida e relativamente mais barata. (CALSAMUGLIA et al., 1999). Devido ao fato do DNA de *M. hyopneumoniae* ser amplificado tanto de organismos vivos quanto mortos, a identificação de animais PCR positivos, levanta a questão destes animais estarem ativamente infectados ou não (MAROIS et al., 2007).

2.2.6. Controle

O controle de doenças do trato respiratório incluindo a PES tem sido realizado mais frequentemente com tetraciclinas e macrolídeos. Outros antimicrobianos potencialmente ativos contra *M. hyopneumoniae* incluem lincosamidas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. (VICCA et al., 2005; THACKER et al., 2006)

Antimicrobianos ou combinações entre eles, também tem sido ativos contra infecções secundárias que frequentemente complicam a infecção por *M. hyopneumoniae*. (VICCA et al., 2005; THACKER et al., 2006)

A aplicação de um programa de vacinação bem elaborado, tem sido considerada uma das principais formas para o controle da pneumonia enzoótica. Atualmente existem no mercado brasileiro várias marcas de vacinas contra a PES (SOBESTIANSKY e BARCELLOS, 2007).

O controle eficaz da doença depende de fornecer um ambiente adequado, incluindo qualidade do ar, ventilação adequada, temperatura e densidade populacional apropriada nas baias, da vigilância das principais enfermidades que afetam o rebanho, com medidas sanitárias, diagnóstico precoce e específico, controle de importações de animais, registro e venda de reprodutores, e movimentação dos suínos para as diversas finalidades. O uso de um esquema de produção de todos dentro/todos fora é possivelmente a maneira mais eficaz de controlar a doença em rebanhos infectados (ROSS, 1999)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta de amostras

A coleta do material foi realizada em um frigorífico da região da Zona da Mata Mineira.

Como procedimento de abate sanitário, os animais foram mantidos por 24 horas em currais com livre acesso à água limpa. Posteriormente, os animais foram contidos, banhados com água e conduzidos à insensibilização por choque elétrico, seguido de sangria pela secção dos grandes vasos do pescoço.

Foram utilizados 120 suínos em fase de terminação, com idade entre 150 a 180 dias, advindos de oito granjas distintas da região da Zona da Mata Mineira.

Os pulmões foram examinados macroscopicamente e os fragmentos foram coletados da região ventral dos lobos craniais. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas individuais devidamente identificadas e mantidas sob refrigeração.

No Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (LHV/DVT/UFV), as amostras foram seccionadas em dois fragmentos, sendo uma parte fixada em formol a 10 % tamponado e os fragmentos destinados às análises de qPCR foram acondicionadas em embalagens plásticas individuais devidamente identificados e mantidos a -80°C.

Destas, foram selecionadas aleatoriamente 32 amostras (sendo 16 sem lesões macroscópicas e 16 com lesões macroscópicas) para a realização dos testes de imunoistoquímica e qPCR.

3.2. Avaliação macroscópica

As porções crânio-ventrais dos lobos pulmonares foram avaliadas macroscopicamente por inspeção anatomopatológica e classificados em sem lesão aparente ou com lesão aparente.

3.3. Exame histopatológico

As amostras fixadas em formol tamponado a 10% foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Posteriormente foram seccionadas com auxílio de micrótomo com uma espessura de 4 µm e corados em hematoxilina e eosina. As lâminas foram montadas e as alterações histopatológicas foram visualizadas com o auxílio de um microscópio de luz.

Os cortes histológicos examinados foram classificados de acordo com o aspecto microscópico das alterações observadas, seguindo a classificação proposta por Sobestiasnky et al. (1999).

Fase 1 - aguda precoce - infiltração peribronquiolar de linfócitos e presença de infiltrado celular no lúmen de alvéolos e dos bronquíolos,

Fase 2 - aguda tardia - proliferação linfóide, estendendo-se através da lâmina própria dos bronquíolos e ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos e dos bronquíolos,

Fase 3 - sub-aguda – discreta a moderada hiperplasia de folículos linfóides peribronquial e peribronquiolar, ausência de infiltrado celular no lúmen dos alvéolos, brônquios e bronquíolos, e espessamento da parede alveolar,

Fase 4 - crônica – severa hiperplasia dos folículos linfóides peribronquiais e peribronquiolares, provocando estenose dos brônquios e dos bronquíolos, com áreas de atelectasias e ausência de infiltrado no lúmen dos alvéolos. Observar figuras 5 e 6 .

Extração de DNA e PCR em tempo real

As amostras armazenadas a - 80°C foram utilizadas para a extração de DNA total utilizando o kit de extração Wizard® SV Genomic DNA Purification System (PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA do PCV2 foi quantificado no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA/BIOAGRO/UFV) utilizando os oligonucleotídeos e sonda (Tabela 2) previamente descritos por Olvera et al. (2004).

Tabela 2. Oligonucleotídeos e sonda utilizados na PCR em tempo real.

Oligonucleotídeo	Sequência	Localização no genoma
PCV2R	'5-CCAGGAGGGCGTTGTGACT-3'	1535 → 1553
PCV2F	'5- CGCTACCGTTGGAGAAGGAA-3'	1633 → 1614
Sonda	'5TAMRA- AATGGCATCTTCAACACCCGCCTCT-FAM3'	1612 → 1592

3.5. Imunoistoquímica para detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Cortes foram obtidos para realização da imunocoloração pela técnica da peroxidase-anti-peroxidase (PAP), utilizando os procedimentos preconizados por Sternberger (1986). Os exames foram realizados no LBCHV, conforme descrito em seguida:

Aquecimento dos cortes a 56°C por 24 horas e completa desparafinização com passagem por dois xilóis, de 30 e 40 minutos cada; hidratação em soluções alcoólicas decrescentes (100%, 90%, 80%, 70% e tampão PBS pH 7,4 a cada 5 minutos. Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 45 minutos a temperatura ambiente; Lavagem em PBS (pH 7,4). Digestão enzimática dos cortes utilizando-se tripsina mg/ml em PBS pH 7,4 durante 10 minutos a 37°C. Lavagem por duas vezes, durante 5 minutos cada com PBS (pH 7,4). Tratamento dos cortes com soro normal de cabra diluído 1:10 em PBS pH 7,4 e incubação em câmara úmida, durante 45 minutos em temperatura ambiente. Retirada do excesso de soro normal e tratamento das lâminas com anticorpo específico (IgG de coelho anti *Mycoplasma hyopneumoniae*) produzido

pela Embrapa-CNSA- CONCÓRDIA- SC, diluído 1:100 em PBS (pH 7,4). Incubação durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Lavagem por três vezes, durante 5 minutos cada com PBS (pH 7,4). Adição do anticorpo secundário (IgG de cabra anti IgG de coelho), produzido pelo LBCHV diluído 1:10 em PBS (pH 7,4). Incubação em câmara úmida durante 45 minutos a 37°C e posterior lavagem por três vezes, durante 5 minutos com PBS pH 7,4. Tratamento com o complexo Peroxidase-Anti-Peroxidase produzido em coelho (SIGMA®), diluído 1:200 em PBS (pH 7,4) e imediata incubação em câmara úmida durante 45 minutos a 37°C. Lavagem por duas vezes, durante 5 minutos cada com PBS (pH 7,4). Revelação em solução recém-preparada [25 mg de Diaminobenzidina, 200 µL de água oxigenada 30 volumes em 100 ml de PBS(pH 7,4)] durante 3 minutos. Lavagem das lâminas durante 5 minutos com PBS pH 7,4. Contra-coloração com Hematoxilina de Harrys, diluída 1:10 em PBS pH 7,4 por 20 segundos; desidratação em álcoois e montagem.

Com base na intensidade da imunocoloração, os fragmentos foram classificados em: (1) imunomarcção ausente e (2) imunomarcção presente. Observar figura 9.

4. RESULTADOS

4.1. Histopatologia

A Figura 1 apresenta os resultados da avaliação histopatológica do total de pulmões coletados (com lesão macroscópica e sem lesão macroscópica). Observa-se que a maior parte dos pulmões analisados apresentaram lesões de fase dois, 48 amostras; 43 amostras do total de amostras analisadas, apresentaram lesão de fase três; 19 amostras do total de amostras apresentaram lesões de fase 4; 6 amostras não apresentaram lesões significativas e 4 amostras apresentaram lesões de fase 1.

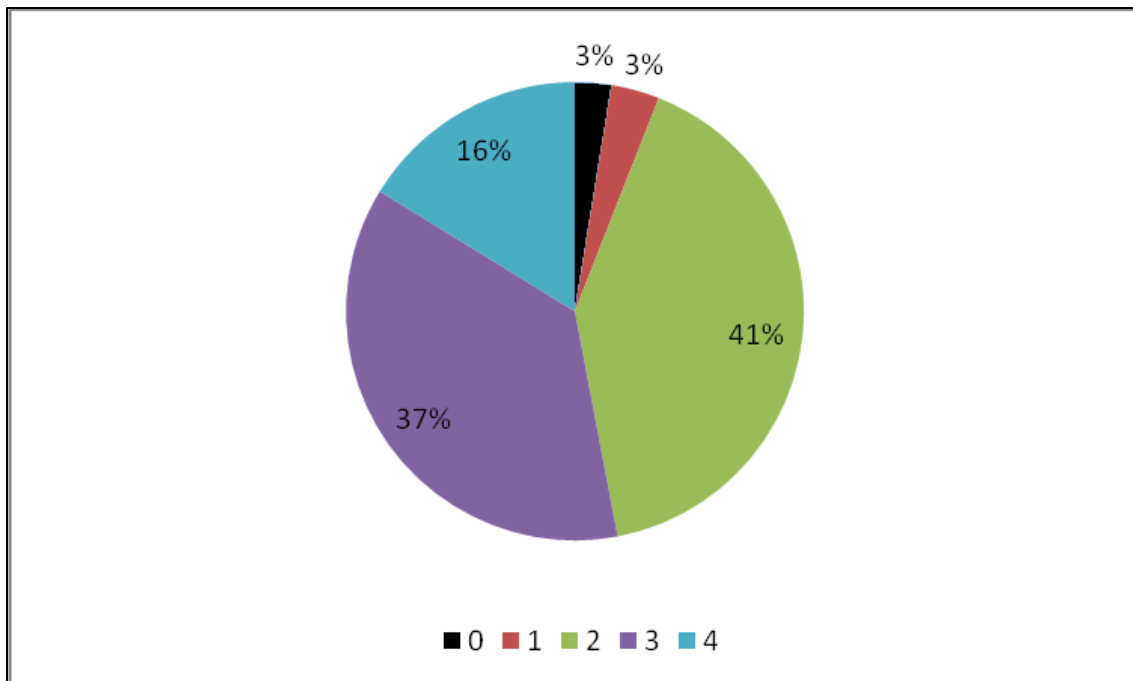


Figura 1 -Avaliação histopatológica de pulmões coletados (com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas) **0**: Sem lesão significativa; **1**: Lesão de fase 1; **2**: Lesão de fase 2; **3**: Lesão de fase 3 e **4**: Lesão de fase 4.

A Figura 2 expõe os resultados da avaliação histopatológica dos pulmões coletados sem lesões macroscópicas. Observa-se que a maior parte dos pulmões analisados 18 amostras apresentaram lesões de fase três; 13 amostras apresentaram lesão de fase dois; dez amostras apresentaram lesões de fase quatro 4 amostras não apresentaram lesões significativas.

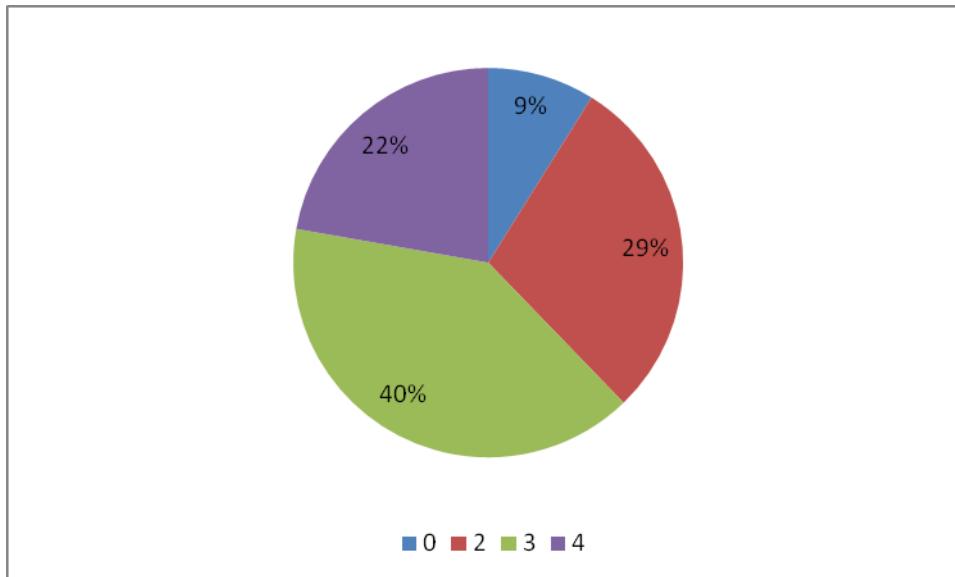


Figura 2 -Avaliação histopatológica dos pulmões coletados sem lesões macroscópicas. **0:** Sem lesão significativa; **2:** Lesão de fase 2; **3:** Lesão de fase 3 e **4:** Lesão de fase 4.

A Figura 3 apresenta os resultados da avaliação histopatológica dos pulmões coletados com lesões macroscópicas. Observa-se que a maior parte dos pulmões analisados apresentaram lesões de fase dois, 35 amostras; 25 amostras apresentaram lesões de fase três; 9 amostra apresentaram lesões de fase 4, quatro amostras apresentaram lesões de fase 1 e duas amostras não apresentaram lesões significativas.

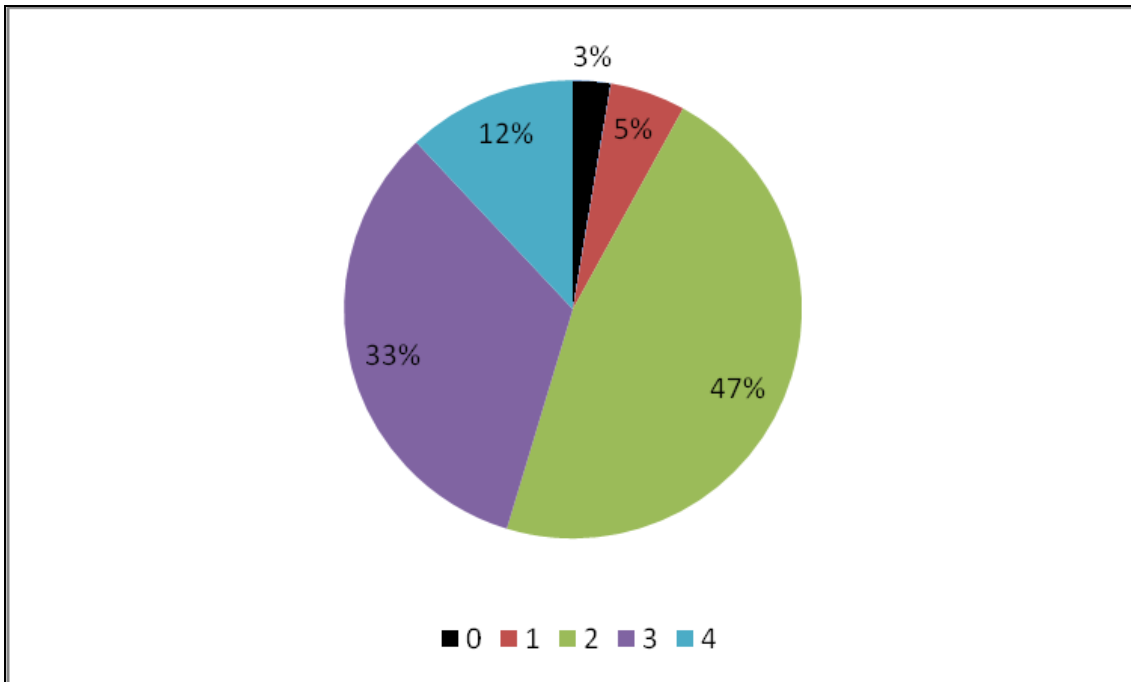


Figura 3 -Avaliação histopatológica dos pulmões coletados com lesões macroscópicas. **0:** Sem lesão significativa; **1:** Lesão de fase 1; **2:** Lesão de fase 2; **3:** Lesão de fase 3 e **4:** Lesão de fase 4.

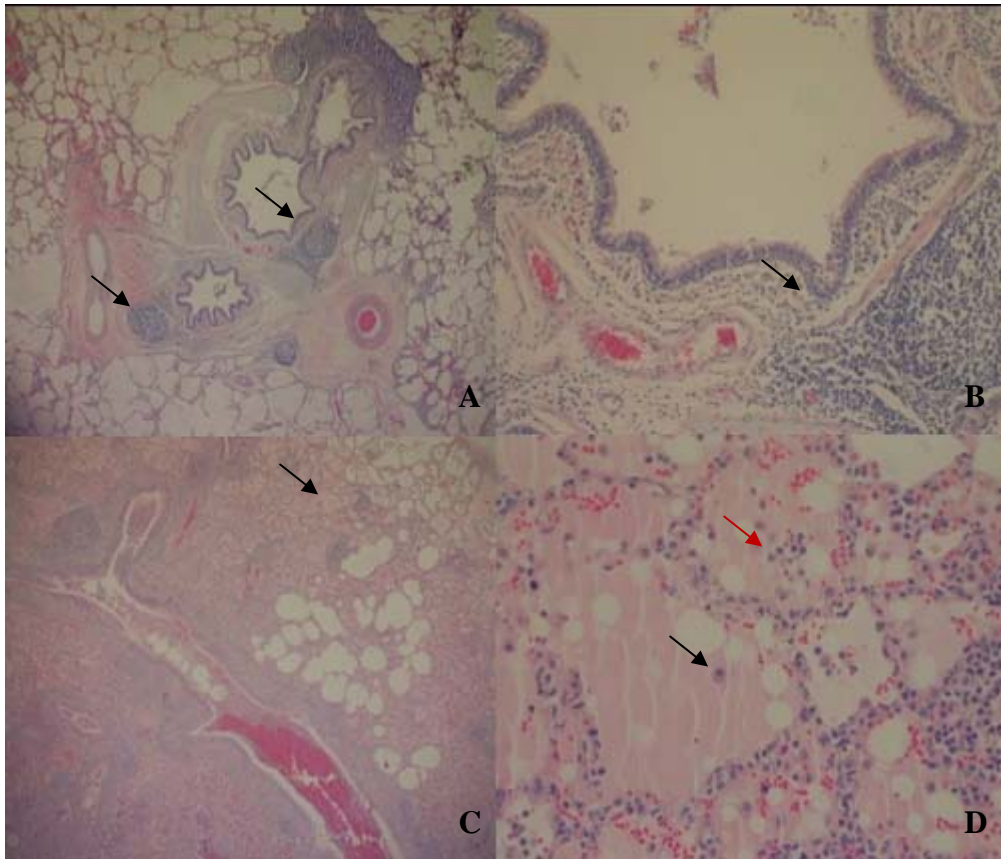


Figura 4 - A: Infiltrado linfocitário peribronquiolar com formação de centros germinativos (coloração por hematoxilina e eosina aumento de 4 vezes). **B:** Infiltrado linfocitário invadindo a lâmina própria do bronquíolo. (coloração por hematoxilina e eosina aumento de 20 vezes). **C:** Broncopneumonia caracterizada por infiltrado inflamatório intra-alveolar (coloração por Hematoxilina e eosina aumento de 4 vezes). **D:** Edema inflamatório no interior dos alvéolos com presença de infiltrado macrófágico (seta preta) neutrofílico (seta vermelha) (coloração por hematoxilina e eosina aumento de 40 vezes).

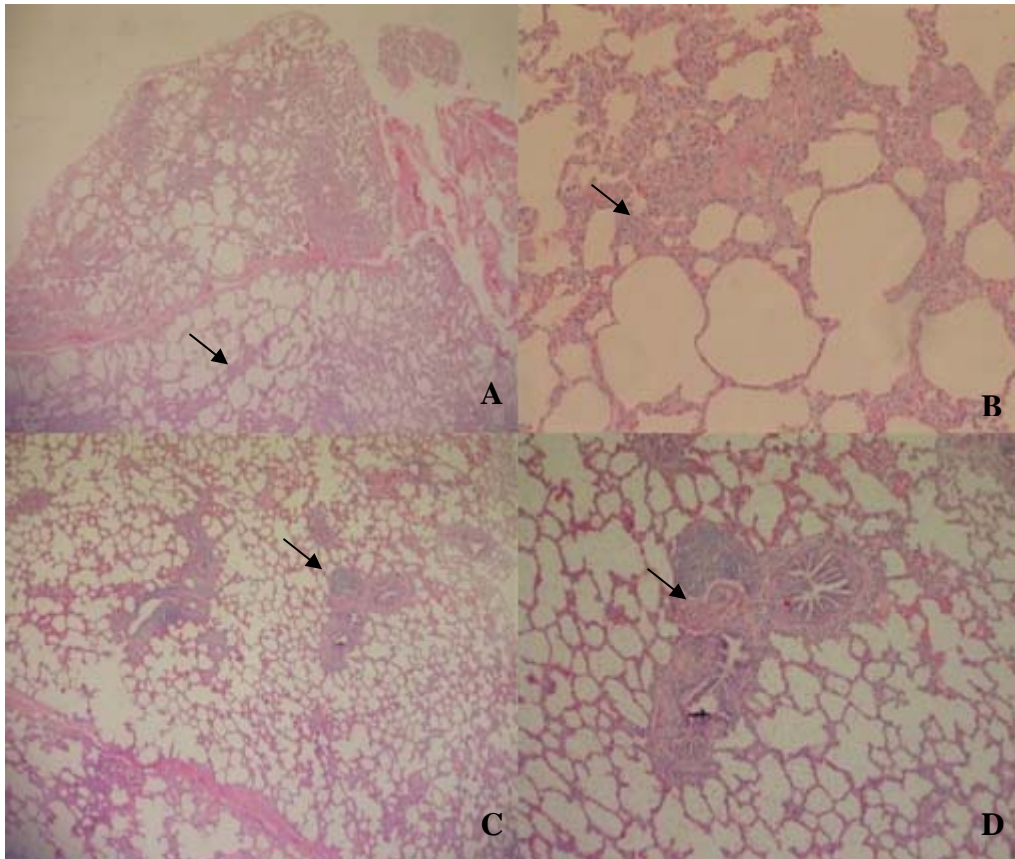


Figura 5 - A: Pneumonia intersticial, caracterizada por espessamento dos septos. (coloração por hematoxilina e eosina aumento de 4 vezes). **B:** Espessamento dos septos por infiltrado linfo-macrofágico (coloração por hematoxilina e eosina aumento de 20 vezes). **C:** Infiltrado linfocitário peribronquiolar (coloração por Hematoxilina e eosina aumento de 4 vezes). **D:** Infiltrado linfocitário causando estenose se bronquíolos (coloração por hematoxilina e eosina aumento de 20 vezes).

4.2. PCR em tempo real para PCV2

Nos resultados da avaliação pelo teste qPCR do total de pulmões coletados (com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas). Observa-se que do total de amostras avaliadas, tanto com lesões macroscópicas (CLM) quanto sem lesões macroscópicas (SLM), foram encontradas 14 amostras (43%) de negatividade no teste de qPCR. Apesar de ser observado que as amostras CLM apresentaram carga viral maior que as amostras SLM, essa diferença não foi considerada significativa de acordo com o teste de Turkey.

4.3. Imunoistoquímica para *Mycoplasma hyopneumoniae*

O total de amostras coletadas (CLM e SLM) foi avaliado pela técnica de imunoistoquímica (Figura 6). Observa-se que 15 amostras (47%) do total de amostras coletadas apresentaram imunomarcção, enquanto 17 amostras (53%) das mesmas não apresentaram imunomarcção.

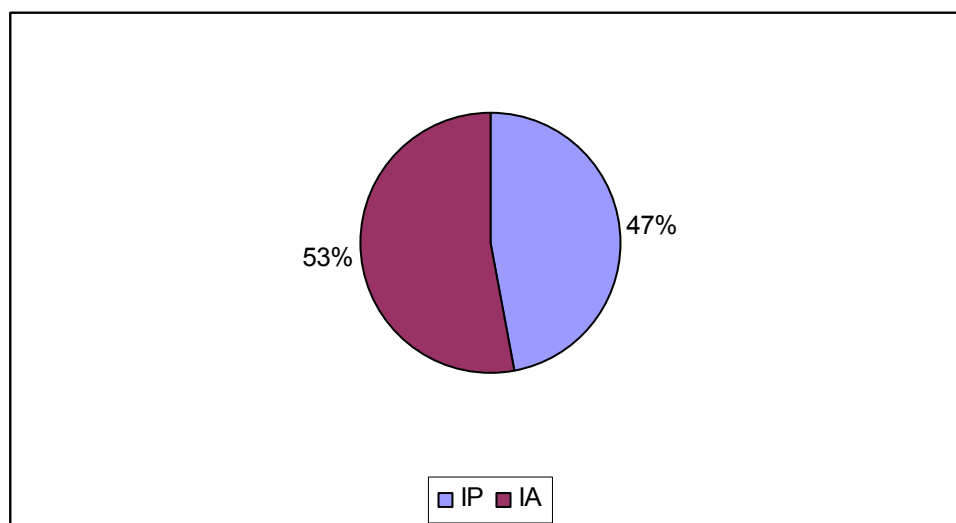


Figura 6- Avaliação pelo teste de imunoistoquímica do total de amostras coletadas (com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas). **IP:** Imunomarcção presente **IA:** Imunomarcção ausente

Das amostras sem lesões macroscópicas, nove apresentaram imunomarcção, representando 38%, das mesmas (Figura 7).

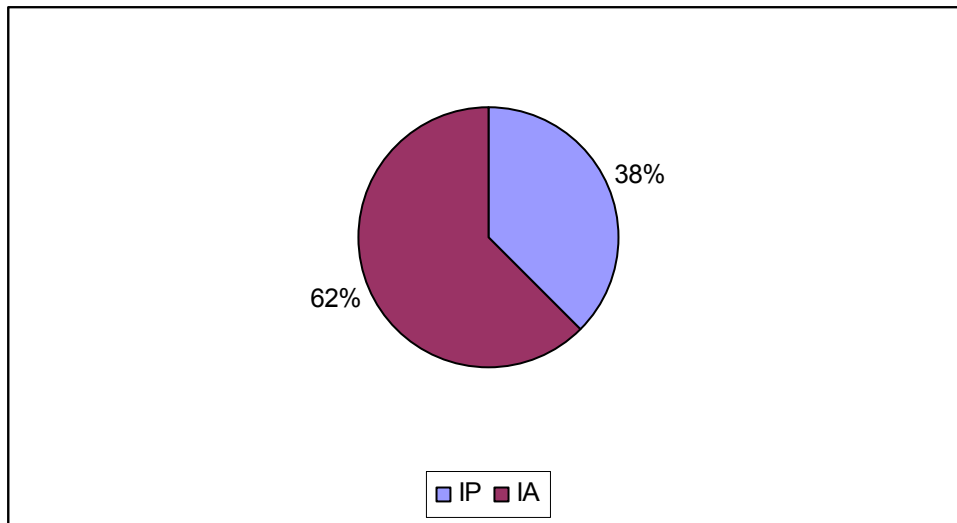


Figura 7- Avaliação pelo teste de imunoistoquímica das amostras sem lesões macroscópicas. **IP:** Imunomarcção presente **IA:** Imunomarcção ausente

Das amostras com lesões macroscópicas o percentual de amostras que apresentaram imunomarcção foi de 56% (Figura 8).

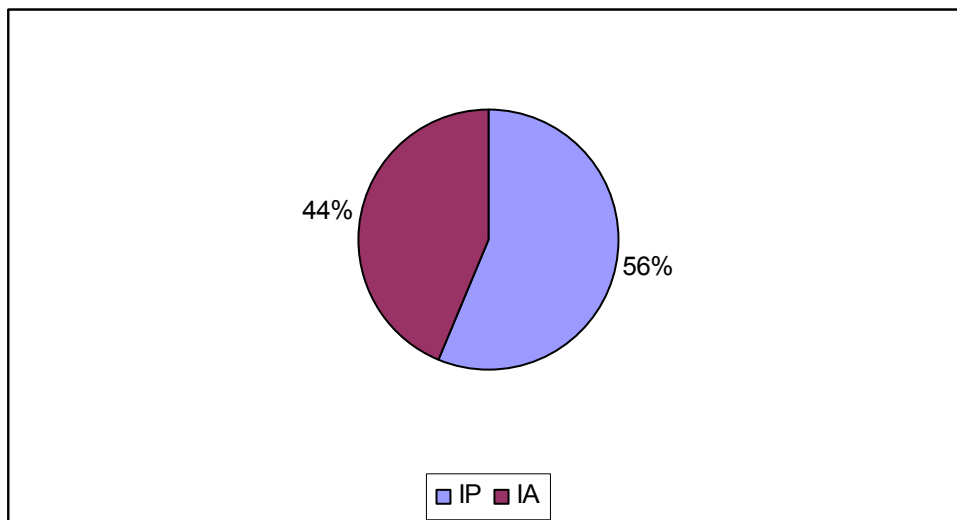


Figura 8 - Avaliação pelo teste de imunoistoquímica das amostras com lesões macroscópicas. **IP:** Imunomarcção presente **IA:** Imunomarcção ausente

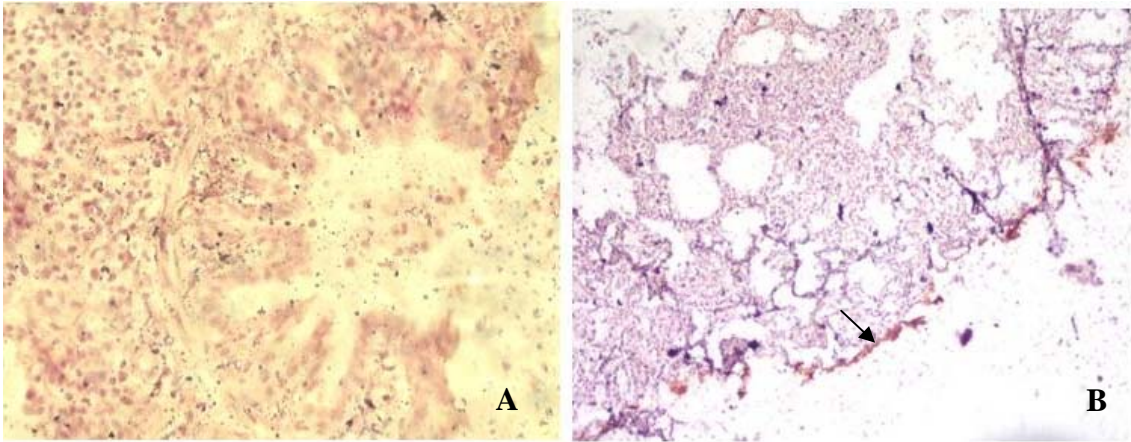


Figura 9 - A: Corte de pulmão sem marcação imunohistoquímica. Aumento de 40X **B:** Corte de pulmão com marcação imunohistoquímica estruturas pleomórficas marrons localizadas na superfície de células epiteliais. Aumento de 10 X.

5. DISCUSSÃO

Os achados histopatológicos, na maioria das amostras sem lesões macroscópicas examinadas (69%), são sugestivos de coinfeção por PCV2 e *M. hyopneumoniae*, o que indica que ambos os agentes podem estar presentes nas lesões; uma vez que a maioria das lesões microscópicas avaliadas nos pulmões sem lesões macroscópicas se enquadram nas fases 2 e 3, que como descritas anteriormente por Sobestiansky et al (1999) apresentam pneumonia intersticial moderada (achado compatível com infecção por PCV2) e hiperplasia linfóide e infiltrado celular nos alvéolos e bronquíolos (achados compatíveis com infecção por *M. hyopneumoniae*). Vinte e dois por cento das amostras apresentam lesão de fase quatro e nove por cento não apresentaram lesões significativas. Estes resultados são similares aos encontrados por Armstrong (1994), onde verificou que a ausência de lesões macroscópicas, não descarta a infecção por *M. hyopneumoniae*.

Os achados histopatológicos de todas as amostras com lesões macroscópicas examinadas são sugestivos de coinfeção por PCV2 e *M. hyopneumoniae*, denotando a presença dos dois patógenos nos tecidos. Uma vez que a maioria das lesões microscópicas avaliadas nos pulmões com lesões macroscópicas, noventa e dois por cento, se enquadraram nas fases 2, 3 e 4. Como descrito anteriormente por Sobestiansky et al (1999), as lesões de fase 2 apresentam broncopneumonia e hiperplasia linfóide (achado compatível com ambos os agentes), as lesões de fase 3 e 4 apresentam pneumonia intersticial (achado compatível com infecção por PCV2) e hiperplasia linfóide (achado compatível com infecção por *M. hyopneumoniae*). Estes dados mostram que a existência de lesões macroscópicas ocorrem simultaneamente com as lesões microscópicas para *M. hyopneumoniae* e PCV2. De acordo com o teste estatístico de Turkey, não há diferença significativa entre os dois grupos (SLM e CLM).

Não foi verificada diferença significativa entre grupos (SLM e CLM), todavia, foi verificada uma correlação positiva do teste de imunoistoquímica com o teste histopatológico de acordo com o teste estatístico de Pearson, o que confirma a presença do agente nas lesões observadas na histopatologia. Na maioria das amostras avaliadas, as marcações imunoistoquímicas observadas foram tênues, não permitindo, dessa forma, a possibilidade de estabelecer uma classificação, em graus, para estas marcações.

Esses achados concordam com Cai et al. (2007), segundo estes autores, embora uma pequena amostra de pulmão seja utilizada quando esses testes são realizados, existe o risco de serem obtidos resultados falso-negativos se as vias aéreas não forem incluídas na amostra. Além disso, a sensibilidade do teste é comprometida pelo processamento do tecido. A qualidade do anticorpo utilizado, também limita a especificidade da reação, dando ao anticorpo policlonal maior capacidade de ligar-se com outros patógenos intimamente relacionados ao *Mycoplasma* spp. (CHEIKH SAAD BOUTH et al., 2003). Taylor et al. (2008) expõem que anticorpos policlonais contêm anticorpos para uma variedade de antígenos e isso os torna potencialmente capazes de causar reações inespecíficas e até mesmo, serem menos específicos.

Quanto aos aspectos imunoistoquímicos, verificou-se que os organismos corados pela técnica de imunoperoxidase foram identificados como estruturas pleomórficas marrons localizadas na superfície de células epiteliais de brônquios e bronquíolos, no lúmen destas estruturas e no interior de macrófagos. Esta manifestação morfológica guarda estreita similaridade com as obtidas por Brugmam (1977).

No presente trabalho, utilizou-se soro policlonal de coelho anti *M. hyopneumoniae*, sendo observada uma eventual presença de marcações inespecíficas que podem levar, em alguns casos, a uma maior dificuldade de interpretação. Dados similares a estes foram observados por Ribeiro (2002) e Rodríguez et al. (1996) que, também utilizando anticorpo policlonal, observaram moderadas marcações inespecíficas.

Foi verificada uma correlação negativa no teste estatístico de Pearson entre qPCR e a histopatologia. Os resultados encontrados estão de acordo com Brunborg et al. (2004) que encontrou uma maior carga viral em linfonodos, quando comparados a outros tipos de órgãos, assim como Silva (2008), que ao analisar linfonodos, rim, intestino, baço, fígado, pulmão e coração, encontrou que as menores cargas virais são encontradas nos três últimos órgãos. Este fato pode ser explicado pela fisiopatologia do vírus, que tem órgãos linfóides como principal alvo, uma vez que se utiliza as células do sistema fagocítico mononuclear (CHANG et al., 2006). Apesar de ter sido observado que as amostras CLM apresentaram carga viral maior que as amostras SLM, essa diferença foi considerada não significativa pelo teste estatístico de Turkey, o que pode se dever ao fato do DNA ser amplificado tanto de organismos vivos quanto mortos, a identificação de animais PCR positivos, levanta a questão destes animais estarem ativamente infectados ou não.

6. CONCLUSÃO

Não foi observada diferença significativa entre os grupos (SLM e CLM), o que indica que a ausência de lesões macroscópicas não descarta a possibilidade da presença dos agentes nem de lesões microscópicas.

A técnica de histopatologia representou neste estudo uma importante ferramenta para se aproximar ao diagnóstico, embora as lesões não sejam patognomônicas para os agentes avaliados, elas são bastante sugestivas dos quadros viral e bacteriano, e esse achados aliados a presença de sinais clínicos e detecção dos agentes confirmam o diagnóstico de cada agente isoladamente ou da coinfeção.

Apesar das amostras analisadas pelo qPCR terem apresentado grande número de resultados negativos e baixa carga viral, diversos autores relatam que o pulmão é um dos órgãos com menor carga viral de PCV2, sendo desta forma os órgãos linfóides, principais alvos do PCV2, mais indicados para a quantificação viral.

Foi verificada uma correlação positiva do teste de imunohistoquímica com o teste histopatológico de acordo com o teste estatístico de Pearson, o que confirma a presença do agente nas lesões observadas na histopatologia.

7. ANEXOS

ANEXO 1: Achados histopatológicos encontrados nos pulmões analisados de animais com lesões macroscópicas e sem lesões macroscópicas. Para utilização do método de classificação padronizado por Sobestiasnky et al. (1999) e adaptado para o presente estudo.

Amostras		Classificação histopatológica	Observações	
G1	A1	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A2	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A3	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A4	SLM	3	- Moderada pneumonia intersticial - Moderada hiperplasia linfóide -Moderada fibroplasia
	A5	SLM	3	Moderada pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A6	SLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A7	CLM	3	-Discreta pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A8	CLM	3	-Discreta pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A9	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A10	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A11	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A12	CLM	2	-Severa Pneumonia intersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria -Infiltrado alveolar neutrofílico
	A13	CLM	3	-Severa Pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide
G2	A1	SLM	3	-Discreta pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A2	SLM	3	-Moderada pneumonia intersticial com áreas de enfisema -Discreta hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A3	SLM	4	-Severa hiperplasia linfóide
	A4	SLM	2	-Discreta hiperplasia linfóide
	A5	SLM	4	-Discreta pneumonia intersticial -Severa hiperplasia linfóide
	A6	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Proliferação de macrófagos alveolares
	A7	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial com áreas de atelectasia -Moderada hiperplasia linfóide
	A8	CLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofílico macrófágico e intensa proliferação de macrófagos alveolares -Moderada fibroplasia

	A9	CLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A10	CLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e intensa proliferação de macrófagos alveolares
	A11	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
G3	A1	SLM	3	-Moderada pneumonia intersticial com áreas de atelectasia -Discreta hiperplasia linfóide
	A2	SLM	SLS	-
	A3	SLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A4	SLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Moderada fibroplasia
	A5	SLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e intensa proliferação de macrófagos alveolares -Discreta hiperplasia linfóide
	A6	SLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A7	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide
	A8	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial com áreas de atelectasia -Discreta hiperplasia linfóide *Lesões histopatológicas mais compatíveis com infecção por circovírus
	A9	CLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial com áreas de consolidação -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar predominantemente neutrofilico macrofágico, intensa proliferação de macrófagos alveolares e presença de eosinófilos e mastócitos. -Discreta fibroplasia
	A10	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Infiltrado alveolar predominantemente neutrofilico macrofágico, intensa proliferação de macrófagos alveolares e presença de eosinófilos.
	A11	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e intensa proliferação de macrófagos alveolares
	A12	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e intensa proliferação de macrófagos alveolares
	A13	CLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e intensa proliferação de macrófagos alveolares

	A14	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Proliferação de macrófagos alveolares
	A15	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e proliferação de macrófagos alveolares.
	A17	CLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares
G4	A1	SLM	3	-Discreta pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A2	SLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e proliferação de macrófagos alveolares -Moderada fibroplasia -Áreas de necrose
	A3	SLM	3	-Discreta pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A4	SLM	2	-Moderada Broncopneumonia -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofilico macrofágico e proliferação de macrófagos alveolares
	A5	SLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial com áreas de consolidação -Moderada hiperplasia -Proliferação de macrófagos alveolares -Proliferação de pneumócitos do tipo II
	A6	SLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A7	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A8	CLM	3	-Severa pneumonia intersticial com áreas de atelectasia -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A9	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A10	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A11	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofilico
	A12	CLM	4	-Discreta pneumonia intersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A13	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial com áreas de atelectasia -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Proliferação de macrófagos alveolares
	A14	CLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares

	A15	CLM		2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Proliferação de macrófagos alveolares -Discreta fibroplasia
	A16	CLM		3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Discreta fibroplasia
G5	A1	SLM	SLS		-
	A2	SLM	SLS		-
	A3	SLM		3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A4	CLM		3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A5	CLM		3	-Moderada Pneumonia Intersticial
	A6	CLM	SLS		-
	A7	CLM		4	-Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A8	CLM		2	-Severa Pneumonia broncointersticial com áreas de consolidação -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar polimorfonuclear e proliferação de macrófagos alveolares
	A9	CLM		3	-Moderada pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide
	A10	CLM		2	-Moderada Pneumonia broncointersticial com áreas de atelectasia -Infiltrado alveolar polimorfonuclear e proliferação de macrófagos alveolares
	A11	CLM		4	-Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A12	CLM		2	-Severa broncopneumonia -Severa hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar polimorfonuclear e proliferação de macrófagos alveolares
	A13	CLM		4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A14	CLM		2	-Severa broncopneumonia com áreas de atelectasia -Infiltrado alveolar polimorfonuclear e proliferação de macrófagos alveolares
G6	A1	SLM		4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A2	SLM		4	-Discreta Pneumonia intersticial com áreas de enfisema -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A3	SLM		2	-Moderada Pneumonia broncointersticial com áreas de atelectasia -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Proliferação de macrófagos alveolares -Áreas de necrose
	A4	SLM		2	-Discreta broncopneumonia -Discreta hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares

A5	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
A6	SLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares -Discreta fibroplasia
A7	CLM	2	-Discreta broncopneumonia -Infiltrado alveolar polimorfonuclear e proliferação de macrófagos alveolares
A8	CLM	3	-Severa Pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide
A9	CLM	2	-Moderada broncopneumonia -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar macrófagico neutrofílico e proliferação de macrófagos alveolares
A10	CLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofílico macrófagico e intensa proliferação de macrófagos alveolares -Exudação nas vias aéreas
A11	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar macrófagico neutrofílico e proliferação de macrófagos alveolares -Áreas de necrose
A12	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar macrófagico neutrofílico e proliferação de macrófagos alveolares
A13	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofílico
G7	SLM		-Moderada pneumonia intersticial
A1		3	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Severa fibroplasia causando estenose de bronquíolos
A2	SLM	2	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado intrabronquiolar neutrofílico.
A3	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
A4	SLM	3	-Moderada pneumonia intersticial *Lesões histopatológicas compatíveis com infecção por circovírus
A5	SLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
A6	SLM	3	-Moderada pneumonia intersticial *Lesões histopatológicas compatíveis com infecção por circovírus
A7	SLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
A8	SLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos

	A9	SLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A10	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A11	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A12	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide
	A13	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A14	CLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A15	CLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A16	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide
	A17	CLM	1	-Discreta hiperplasia linfóide
	A18	CLM	4	-Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A19	CLM	3	-Moderada pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A20	CLM	1	-Discreta hiperplasia linfóide
	A21	CLM	1	-Discreta hiperplasia linfóide
G8	A1	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A2	SLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A3	SLS	-	-
	A4	SLS	4	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Infiltrado alveolar macrófago neutrofílico
	A5	SLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar neutrofílico
	A6	SLM	SLS	-
	A7	SLM	2	-Discreta broncopneumonia -Discreta hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar macrófago neutrofílico
	A8	CLM	2	-Severa Pneumonia broncointersticial com áreas de consolidação -Severa hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos -Infiltrado alveolar neutrofílico macrófago e intensa proliferação de macrófagos alveolares -Exudação purulenta nas vias aéreas
	A9	CLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide -Infiltrado alveolar macrófago neutrofílico
	A10	CLM	4	-Moderada hiperplasia linfóide invadindo a lâmina própria dos bronquíolos
	A11	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Discreta hiperplasia linfóide
	A12	CLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares
	A13	CLM	SLS	-
	A14	CLM	1	-Discreta hiperplasia linfóide

A15	CLM	2	-Discreta Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares
A16	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Moderada hiperplasia linfóide
A18	CLM	2	-Discreta Broncopneumonia -Discreta hiperplasia linfóide
A19	CLM	2	-Discreta Broncopneumonia -Discreta hiperplasia linfóide -Proliferação de macrófagos alveolares
A20	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide
A21	CLM	2	-Moderada Pneumonia broncointersticial -Discreta hiperplasia linfóide
A22	CLM	3	-Discreta Pneumonia intersticial -Moderada hiperplasia linfóide

G: granja; **A:** amostra; **SLM:** sem lesões macroscópicas; **CLM:** com lesões macroscópicas; **SLS:** sem lesões significativas; **1:** Lesões de estágio 1; **2:** Lesões de estágio 2; **3:** Lesões de estágio 3; **4:** Lesões de estágio 4.

ANEXO 2: Tabela dos Resultados da avaliação do PCRrt.

Amostras			carga viral (log)	Desvio padrão entre triplicatas
G1	A1	SLM	1,452525139	0,020958215
	A2	SLM	1,31709969	0,016735241
	A3	CLM	1,363125801	0,086129941
	A4	CLM	1,095670819	0,02932418
G2	A1	SLM	0,583489239	0,01424319
	A2	SLM	0,613254488	negativo
	A3	CLM	1,058278561	0,041579019
	A2	CLM	negativo	negativo
G3	A1	SLM	0,473239183	0,02538038
	A2	SLM	negativo	negativo
	A3	CLM	0,604611456	0,036027264
	A4	CLM	negativo	negativo
G4	A1	SLM	negativo	negativo
	A2	SLM	negativo	negativo
	A3	CLM	negativo	negativo
	A2	CLM	negativo	negativo
G5	A1	SLM	1,039247513	0,025535541
	A2	SLM	0,665663183	0,030675516
	A3	CLM	0,795145273	0,029075269
	A4	CLM	1,065620065	0,017858742
G6	A1	SLM	0,718542397	0,029827876
	A2	SLM	0,543965816	0,02654765
	A3	CLM	negativo	negativo
	A4	CLM	1,024458766	0,059492279
G7	A1	SLM	negativo	negativo
	A2	SLM	negativo	negativo
	A3	CLM	negativo	negativo
	A4	CLM	negativo	negativo
G8	A1	SLM	negativo	negativo
	A2	SLM	negativo	negativo
	A3	CLM	0,40378803	negativo
	A4	CLM	negativo	negativo

G: granja; A: amostra; SLM: sem lesões macroscópicas; CLM: com lesões macroscópicas.

ANEXO 3 : Tabela com os resultados da avaliação pelo teste de imunoistoquímica

Amostras			Imunomarcação
G1	A1	SLM	Ausente
	A2	SLM	Ausente
	A3	CLM	Presente
	A4	CLM	Presente
G2	A1	SLM	Ausente
	A2	SLM	Ausente
	A3	CLM	Ausente
	A4	CLM	Presente
G3	A1	SLM	Ausente
	A2	SLM	Presente
	A3	CLM	Presente
	A4	CLM	Presente
G4	A1	SLM	Ausente
	A2	SLM	Ausente
	A3	CLM	Presente
	A4	CLM	Presente
G5	A1	SLM	Presente
	A2	SLM	Ausente
	A3	CLM	Ausente
	A4	CLM	Ausente
G6	A1	SLM	Ausente
	A2	SLM	Ausente
	A3	CLM	Ausente
	A4	CLM	Ausente
G7	A1	SLM	Presente
	A2	SLM	Ausente
	A3	CLM	Presente
	A4	CLM	Presente
G8	A1	SLM	Presente
	A2	SLM	Presente
	A3	CLM	Ausente
	A4	CLM	Ausente

G: granja; **A**: amostra; **SLM**: sem lesões macroscópicas; **CLM**: com lesões macroscópicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G.M.; ELLIS J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 12, p.3-14, 2000.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; et al. Experimental Reproduction of Severe Wasting Disease by Co-infection of Pigs with Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.121, p.1-11, 1999.

ARMSTRONG, C. H. Porcine Mycoplasmas. **Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis** (1994). *In*: RIBEIRO F. C., Diagnóstico de pneumonia enzootica pela técnica de imunoperoxidase em suínos naturalmente infectados. **Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais, Brasil, 2002.

BASEMAM, J. B. & TULLY, J. G. Mycoplasmas sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. **Emerging Infec. Dis.**, 3, 1-15, 1997.

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

CAI, H.Y., VAN DREUMEL, T., MCEWEN, B., HORNBY, G., BELL-ROGERS, P., MCRAILD, P., JOSEPHSON, G., MAXIE, G., Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 19, 91–95, 2007.

CALSAMIGLIA, M., PIJOAN, C., TRIGO, A., Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. **Journal of Swine Health and Production** 7, 263–268.,1999.

CASTRO, A. M. M. G.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; RUIZ, V. L. A.; LEOMIL, H.; RICHITZENHAIN, L. J. Partial sequencing of open reading frame-1 (ORF-1) of brazilian porcine circovirus type 1 (PCV-1). **Virus Reviews & Research**. v. 13, p. 80-81, 2003.

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

CHANG, H. W.; JENG, C. R.; LIN, T. L.; LIU, J. J.; CHIOU, M. T.; TSAI, Y. C.; CHIA, M. Y.; JAN, T. R.; PANG, V. F. Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by *in vitro* inoculation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 110, p. 207-219, 2006.

CHEIKH SAAD BOUH, K., SHARECK, F., DEA, S., Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 10, 459–468, 2003.

CHEUNG, A. R. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and dna replication of porcine circovirus type 2. **Virology**, v. 313, n.2, p. 452-459, 2003.

CHIARELLI NETO, O. ; CASTRO, L. A. ; SILVA, F. M. F. ; BONFA, G. ; SILVA JUNIOR, A. ; MORAES, M. P. ; ALMEIDA, M. R. . Identificação do circovirus suíno tipo 2 em animais no centro norte do estado do Espírito Santo. in: **XV SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, V MOSTRA CIENTÍFICA DA PÓS - GRADUAÇÃO E III SIMPÓSIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA** –Viçosa, 2006.

CHOI, C.; CHAE, C. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by insitu hybridization. **Journal of Comparative Pathology**, v.123, p.302-305, 2000.

CIACCI-ZANELLA, J.R. e MORES, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n.5, p.522-527, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; BASSI, S.S.; ASCOLI, K.; SIMON, N.L.; DAHMER, A.; ZANELLA, E.L. Detecção de DNA de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em órgãos de macho suíno. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 2, 2004, Foz do Iguaçu. **Anais**. p.456-457, 2004

CIPRIAN, A. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.52, p.434-438, 1988

CLARCK E., and Harding, J.C. The pathology of post-Weaning Multissystemic Wasting Syndrome. Proc 15 th **intern. Pig. Vet. Soc. Congr.** 1998.

DARWICH, L; SEGALÉS; J. MATEU, E., Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. **Archives of virology** 149: 857-874, 2004.

DARWICH, L., SEGALÉS, J., DOMINGO, M., MATEU, E., CHANGES in CD4(p), CD8(p), CD4(p) CD8(p), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 9, 236–242, 2002.

DEBEY, M.C., ROSS, R.F. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. **Infection and Immunity**, v.62, p.5312-5318, 1994.

ELLIS, J.A. HASSARD L. et al Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Can Vet.** V. 39, P. 44-51, 1998.:

ETHERIDGE J. R., COTTEW, G. S., LLOYD, L. C. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from Lesions in Experimentally Infected Pigs. **Aust. Vet. J.**, v. 55, v:8, p. 356-359, 1979.

FERNANDES, L.T.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; TROMBETTA, C.; SCHIOCHET, M.F.; KRAMER, B.; SOBESTIANSKY, J. Estudo da transmissão horizontal de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) entre suínos. In: **Anais... CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS**. Goiânia., p.93, 2003

FERNANDES L.T. , CIACCI-ZANELLA J.R., SOBESTIANSKY J., SCHIOCHET M.F., C. TROMBETTA. Experimental coinfection of SPF pigs with porcine circovirus type 2 isolated in Brazil and porcine parvovirus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.1-8, 2006

FRANÇA T. N., RIBEIRO C. T., CUNHA B. M., PEIXOTO P. V. 2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Universidade Estácio de Sá. p. 59-72, 2005.

INAMOTO, T., TAKAHASHI, H., YAMAMOTO, K., NAKAI, Y., OGIMOTO, K., Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. **J. Vet. Med. Sci.** v. 56, p. 393–394, 1994.

KIM J; CHUNG HK; JUNG T; CHO WS; CHOI C; CHAE C Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **Journal of Veterinary Medical Science.** v. 64, p. 57–62, 2002.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record.** v. 155, n. 16, p. 489-492, 2001.

KNELL, S.; WILLEMS, H.; HERTRAMPF, B.; REINER, G. Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n.3/4, p.169-177, 2005.

KRAKOWKA S; ELLIS JA; MCNEILLY F; RINGLER S; RINGS DM; ALLAN G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV2). **Vet. Pathol.** v. 38, p. 31-42, 2001.

KYRIAKIS SC; SAOULIDIS K; LEKKAS S; MILIOTIS C; PAPOUTSIS PA; KENNEDY S., The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology.** v. 126, p. 38–46, 2001.

LAROCHELLE, R.; ANTAYA, M.; MORIN, M.; MAGAR, R. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v.80, p.69-75, 1999.

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MÜLLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology.** v.38, n.12, p.4629-4632, 2000.

LAROCHELLE R, MAGAR R AND D'ALLAIRE S Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions. **Virus Research** v.90, p.101–112, 2002.

MAES, M.; VERDONCK, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Enzootic Pneumonia in Pigs, **Veterinary Quarterly**, v. 18, p. 104-109, 1996

MAGAR, R.; MULLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to PCV type 1 and type 2. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.64, n.3, p.184-186, 2000.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Veterinary Journal**. v.169, n.3, p.454-456, 2005.

MAROIS, C., LE CARROU, J., KOBISCH, M., GAUTIER-BOUCHARDON, A.V., Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. **Veterinary Microbiology** 120, 96–104, 2007.

MCNEILLY F; ALLAN GM; FOSTER JC; ADAIR BM; MCNULTY MS. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 49: 295-306, 1996.

MIELE, M.; GIROTTO, A. F.; 2008 A suinocultura brasileira em 2007 e cenário para 2008. Retirado do site da Associação Brasileira de Suínos e Aves (Abraves), www.cnpsa.embrapa.br, no dia 23/02/2009.

MONNERAT FS. Desenvolvimento de técnicas biomoleculares para diagnóstico de circovírus suíno. **Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-MG, 74p, 2003

MORÉS, N. Impacto econômico da circovirose na produção de suínos. *V Seminário de Internacional de aves e suínos – Avesui*. Florianópolis. 2005. **Anais do V seminário internacional de aves e suínos**. Concórdia. Embrapa Suínos e Aves. : p 9-13, 2005.

MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S. D.; HALBUR, P. G.; MORGAN, M. K.; YOON, K. J.; PAUL, P. S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiological**. v. 36, p. 2535-2541, 1998.

MORRIS, C.R., GARDNER, I.A., HIETALA, S.K., CARPENTER, T.E., ANDERSON, R.J., PARKER, K.M.,. Seroepidemiology study of natural transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in a swine herd. **Preventive Veterinary Medicine** 21, 323–337, 1995.

NIELSEN J; VINCENT IE; BOTNER A; LADEKJER-MIKKELSEN A; ALLAN GM; SUMMERFIELD A; MCCULLOUGH KC. Association of lymphopenia with porcine

circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology and Immunopathology** 92: 97–111, 2003..

OPRIESSNIG. T; JANKE. B. H; HALBUR. PG.. Cardiovascular lesions en pigs naturally e experimentally infected with Porcine Circovirus type II. **Journal of comparative pathology**. XX: 1-6. 2005

PARK JS, KIM J, HA Y, JUNG K, CHOI C, LIM JK, KIM SH AND CHAE C (2005). Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal of Comparative Pathology** v.132,p.139–144

PALLARES, F.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T.; et al. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) co infections in US held cases of post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.515-519, 2002.

PASS DA, PERRY RA: The pathology of psittacine beak and feather disease. **Aust Vet J** 61:69-74, 1984

PENSAERT MB; SANCHEZ RE; LADEKJER-MIKKELSEN AS; ALLAN GM; NAUWYNCK HJ. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology** 98:175-183, 2004.

RAZIN, S. et al. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.1094-1156, 1998.

RIBEIRO F. C., Diagnóstico de pneumonia enzootica pela técnica de imunoperoxidase em suínos naturalmente infectados. **Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais, Brasil, 2002.

RODRÍGUEZ, F. et al. Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lung Lesions of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p.306-312, 2004.

RODRÍGUEZ, F. et al. Pathological and Immunohistochemical Studies of Natural and Experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. **J. Comp. Pathol.** v. 115 p. 151-162, 1996.

ROSE, N.; LAROOUR, G.; LE DIGUERHER, G.; EVENO, E.; JOLLY, J.P.; BLANCHARD, P.; OGER, A.; LE DIMNA, M.; JESTIN, A.; MADEC, F. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v.61, n.3, p.209-225, 2003.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN et al.. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal Comparative Pathology**, v.120, p.59-78, 1999.

ROSELL, C.; SEGALES, J.; RAMOS-VARA, et al. Identification of porcine circovirus tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, v.146, p.40-43, 2000.

ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E. et al. **Diseases of swine**. 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University. p.495-510, 1999.

SARLI, G., MANDRIOLI, L., LAURENTI, M., SIDOLI, L., CERATI, C., ROLLA, G., MARCATO, P.S. Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 83, 53–67, 2001.

SARRADELL, J.; PEREZ, A.M.; ANDRADA, M. et al. PMWS in Argentina. **Veterinary Record**, v.150, p.323, 2002.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v.24, n.3, p.109-124, 2002.
syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, v.111, p. 223-229, 2005.

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M. BADIELLA, L.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**. v.111, n.3-4, p.223-229, 2005.

SEGALÉS J; DOMINGO M; ROSELL C. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Vet. Microbiol.** 98 :137–149, 2004.

SEGALÉS, J., ALONSO, F., ROSELL, C., PASTOR, J., CHIANINI, F., CAMPOS, E., LOPEZ-FUERTES, L., QUINTANA, J., RODRIGUEZ-ARRIOJA, G., CALSAMIGLIA, M., PUJOLS, J., DOMINGUEZ, J., DOMINGO, M., Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 81, 37– 44, 2001.

SHIBATA, I.; OKUGA, Y.; YAZAWA, S.; ONO, M.; SASAKI, T.; ITAGAKI, M.; NAKAJIMA, N.; OKABE, Y.; HIDEJIMA, I. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, and faeces from experimentally infected pigs and field cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.65, n.3, p.405-408, 2003.

SHIBAHARA, T., SATO, K., ISHIKAWA, Y., KADOTA, K., Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. **J. Vet. Med. Sci.** 62, 1125–1131, 2000.

SIBILA, M.; PIETERS, M.; MOLITOR, T.; MAES, D.; HAESEBROUCK, F.; SEGALÉS, J. Current perspectives on the diagnostics and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, **The Veterinary Journal**, 2008.

SILVA, F. M. F. ; CASTRO, L. A. ; SILVA JUNIOR, A. ; MORAES, M. P. ; MOREIRA, M. A. S. ; ALMEIDA, M. R. . Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)**, v. 61, p. 149-155, 2009.

SILVA, F.M.P., Relação entre carga viral, grau de lesão e genótipo viral em animais naturalmente infectados pelo PCV2. **Dissertação de mestrado em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa**, 2008.

SIPOS W; DUVIGNEAU JC; WILLHEIM M; SCHILCHER F; HARTL RT; HOFBAUER G; EXEL B; PIETSCHMANN P; SCHMOLL F. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 99: 63-71, 2004

SOBESTIANSKY, J.; BARCELOS, D.; **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cãnone editoial, 2007.

SOBESTIANSKY, J. et al. Pneumonia enzoótica. **Clínica e patologia suína**. 2.ed. Goiânia, Goiás: Art 3 Impressos Especiais,. p.359,1999.

SORENSEN, V.; AHRENS, P.; BARFOD, K.; FEENSTRA. A. A., FELD, N. C.; FRISS, N. F.; BILLE-HANSEN, V., JENSEN, N. E.; PEDERSEN, M. W. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays, **veterinary Microbiology**, v 54, p. 23-34, 1997.

SORDENS S.D. Update on porcine circovirus and postweaning wasting syndrome (PMWS) Swine Health and Prod. 8 133-136, 2000.

THACKER, E. L. Mycoplasmal Disease In: STRAW, B. E.; ZIMMERMANN, J. J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. (Eds), **Diseases of swine**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, p. 701-717, 2006.

THACKER, E.L. et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. **Journal Clinical of Microbiology**, v.37, p.620-627, 1999.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMAN, W. et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v.295, p.64-66, 1982.

TISCHER I; MIELDS W; WOLFF D; VAGT M & GREIM W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archive Virology**, v.96, p.39-57, 1986.

VICCA, J. Virulence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs. **PhD thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University**, ISBN 90-5864-086-8, 219 pp. 2005

VICCA, J., STAKENBORG, T., MAES, D., BUTAYE, P., PEETERS, J., DE KRUIF, A., HAESEBROUCK, F., In vitro susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** 48, 4470–4472, 2004.

WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.155-162, , 2003.

WOODS LW, LATIMER KS, BARR BC, NIAGRO FD, CAMPAGNOLI RP, NORDHAUSEN RW, CASTRO AE: Circoviruslike infection in a pigeon. *J Vet Diagn Invest* 5:609- 612, 1993

ZANELLA, C. J.R.; MORÉS, N.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C. Diagnóstico molecular e caracterização de circovírus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11.Porto Alegre, RS. **Resumos**. Porto Alegre, 2001. p.97-98, 2001,

ZANELLA JRC; MORÉS N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.522-527, 2003.

YANG, J.S.; SONG, D.S.; KIM, S.Y.; LYOO, K.S; PARK, B.K. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polimerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.15, n.4, p.369-373, 2003.

YUASA N, TANIGUCHI T, YOSHIDA I: Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. **Avian Dis** 23:366, 1979.

YAMAMOTO, R. MOLLICUTES. **Tratado de microbiologia veterinária**. Edited by BIBETEIN, D. V. M. e YUAN CHUN, ZEE. D. V. M. School of Medicine Veterinary of Califórnia, Davis, p 247-249, 1994.