

Pesquisa de antígenos e anticorpos contra Circovírus Suíno II em suínos com e sem sintomatologia da síndrome multisistêmica do definhamento em granjas comerciais mineiras

Research of antigen and antibodies against Porcine Circovirus Type - 2 in pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome from commercial farms of Minas Gerais State

Clara Nilce Barbosa¹; Nelson Rodrigo Martins²; Eduardo Gonçalves Esteves³; Tânia Rosária Pereira Freitas^{4*}

Resumo

Circovirus Suíno Tipo-2 (CSV-2) é um vírus não-envelopado, DNA fita única circular, classificado na família de *Circoviridae*, relacionado à Síndrome Multisistêmica do Definhamento de Suínos (SMDS) de leitões. A técnica de Imuno-Histoquímica (IHQ) é aplicada na detecção de antígenos do (CSV-2) em tecido lesionados. Entretanto, suínos infectados com CSV-2 assintomáticos ou com infecções subclínicas podem disseminar o vírus no plantel. A pesquisa de anticorpos contra o CVS-2 em porcos aparentemente saudáveis pode sugerir o risco de ingresso de vírus. Neste trabalho foram investigados antígenos e anticorpos contra CVS-2 de porcos de granjas comerciais de sete e oito mesorregiões de Estado de Gerais de Minas (MG). 32 porcos com idades de cinco a onze semanas que apresentaram sinais clínicos de SMDS foram necropsiados. Antígenos do CVS-2 foram investigados nos porcos sacrificados (grupo I) e amostras de demanda de diagnóstico (grupo II) pela IHQ. 7,60% e mais de 60% do primeiro e segundo grupo, respectivamente, foram positivos para antígeno viral. Em todos, marcação intensa de macrófagos e histiócitos, especialmente nos linfonodos e pulmão, evidenciou antígenos a CVS-2. Em paralelo, 955 amostras de soros de porcos de 35 granjas comerciais de ciclo completo sem sintomatologia clínica de SMDS foram investigadas para a detecção de anticorpos contra o CVS-2 aplicando a técnica de Imunoperoxidase em Monocamada de Células (IPMC). Todos os rebanhos de suínos (100%) apresentaram animais positivos (nível de confiança 90% a 100%) com frequência de 96,6% de porcos reagentes (nível de confiança 94,7% a 98,6%). Os títulos de anticorpos contra o CVS-2 variou 1:320 (médio) a 1:10.240 (alto). Os resultados sugerem que pelo menos 2,66% e 9% dos porcos das regiões Triângulo Mineiro e Zona da Mata, respectivamente, nesta amostragem poderiam desenvolver SMDS clínica e esta porcentagem alcança 3,35% no total dos soros.

Palavras-chave: Circovirus suíno tipo-2, antígeno (IHQ), anticorpos (IPMC)

Abstract

Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) is a non-enveloped circular single stranded DNA virus classified in the *Circoviridae* family related to post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) in piglets.

¹ Prof. Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal Rural do Pernambuco, UFRPE. E-mail: claranbarbosa@yahoo.com.br

² Prof. do Deptº de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. E-mail: rodrigo@vet.ufmg.br

³ Fiscal Federal Agropecuário, Laboratório Nacional Agropecuário, MG. E-mail: eduardo16esteves@hotmail.com

⁴ Pesquisadora em Ciências Exatas e da Natureza. Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO/MG. MAPA. Av. Rômulo Joviano, s/n. CP: 50. 33.600-000 - Pedro Leopoldo, MG. E-mail: taniafrei@hotmail.com

* Autor para correspondência

Immune-Histochemical (IHC) techniques are applied to detected PCV-2 antigen in the animal tissue injuries. Although, asymptomatic or sub clinic PCV-2 infected pigs could disseminate the virus in the flock. Serologic survey on apparently health pigs could suggest the virus ingression risk. In this work, antigens and antibodies against PCV-2 in swine from commercial farms of seven and eight mesorregions of Minas Gerais State (MG) were investigated. 32 pigs with ages from five to eleven weeks which presented SMDS clinical signs were submitted to necropsy. PCV-2 antigens were investigated either from sacrificed pigs (Group I) and diagnosis demand samples (Group II) by IHC. 7,60% and more than 60% of the first and second groups, respectively, were positive for viral antigen. In both of them, intense marking of macrophages and histiocytes, especially in the lymph nodes and lung, evidenced antigens to CVS-2. In parallel, Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA) was applied to antibody against PCV-2 screened in 955 pigs from 35 complete cycle commercial farms from same mesorregions. All pig flocks (100%) presented positive animals (confidence level 90% to 100%) and the frequency of reacting pigs varied 96.6% (confidence level 94,7% to 98,6%). PCV-2 antibody titers ranged 1:320 (medium) to 1:10.240 (high). The results suggest that 2.66% and 9% of pigs from Triângulo Mineiro and Zona da Mata regions respectively, would be able to develop clinical SMDS and that percentage reach 3.35% in the total serum.

Key words: Porcine circovirus type 2, viral Antigen (IHC), antibody (IPMA)

Introdução

O crescimento da suinocultura como atividade econômica impulsionou o uso de novas tecnologias que visam uma produção cada vez mais eficiente. Observa-se uma tendência a concentração e especialização com um número cada vez menor de produtores e o fortalecimento de um sistema de produção intensiva com um número crescente de animais por rebanho e em áreas restritas. Em contrapartida, estes precursores que visam a atender a lucratividade em um mercado internacional cada vez mais competitivo podem agravar o estresse animal (GAUVREAU, 2001) favorecendo a ocorrência de várias doenças entre elas a circovirose suína. A circovirose é uma enfermidade causada pelo *Circovirus Suíno* Tipo-2 (família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*). Este vírus, considerado o menor vírus com genoma DNA que infecta os animais, possui uma capsídeo protéico com diâmetro aproximado de 20nm em formato icosaédrico, não possui envelope. O genoma é uma fita única de DNA circular ambisenso composto por 1767-68 nucleotídeos.

O CVS-2 é associado principalmente com a Síndrome Multissistêmica do Definhamento de Suínos (SMDS) que acomete suínos de seis a doze semanas de vida.

Os sinais clínicos da SMDS são inespecíficos e

para a confirmação do envolvimento do Circovirus, é necessária a demonstração do ácido nucléico e/ou do antígeno viral dentro das lesões. A técnica de Imuno-Histoquímica (IHQ) é aplicada na demonstração de antígenos virais tissulares *in situ* por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GIMENO, 1995).

A rapidez na disseminação do CVS-2 no rebanho incitou a pesquisa sobre as rotas e os mecanismos de transmissão do vírus sugerindo que o contato direto entre animais é a principal via de contágio. A presença de suínos infectados assintomáticos, (CALSAMIGLIA; SEGALÊS; QUINTANA, 2002), alerta sobre o risco de entrada do vírus pelo ingresso de animais no rebanho. O rastreamento sorológico pode sugerir o grau de risco do estabelecimento da infecção em determinado rebanho.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, o IBGE, subdividiu cada estado brasileiro em Mesorregiões que congregam diversos municípios de uma área geográfica com similaridades econômicas e sociais. Pelo critério do IBGE, o estado de Minas Gerais pode ser dividido geograficamente em doze mesorregiões: Campo das Vertentes; Central Mineira; Jequitinhonha; Metropolitana de Belo Horizonte; Noroeste de Minas; Norte de Minas; Oeste de Minas; Sul e Sudoeste de Minas; Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba; Vale do Mucuri; Vale do

Rio Doce; Zona da Mata.

O objetivo deste trabalho foi pesquisar antígenos virais e anticorpos contra CVS-2 em mesorregiões mineiras de representatividade na produção suinícola estadual e nacional: Central Mineira; Metropolitana de Belo Horizonte; Oeste; Sul, Sudeste; Triângulo Mineiro e Zona da Mata. Os antígenos virais foram investigados em tecidos de suínos com sinais clínicos sugestivos de SMDS em granjas de Minas Gerais e em amostras de tecido de suínos recebidas para o diagnóstico laboratorial. Paralelamente, foi avaliada a presença de anticorpos contra o CVS-2 em suínos de granjas comerciais de ciclo completo, livres SMDS, visando o conhecimento do status imune e conseqüente predisposição ao desenvolvimento da doença nestes rebanhos.

Material e Métodos

Pesquisa de antígenos virais

As amostras de tecido de suínos analisadas neste trabalho foram distribuídas em dois grupos distintos de amostragem denominados grupos I e II. Grupo I: doze (12) granjas comerciais das Mesorregiões mineiras: Central Mineira (01 granja do município de Felixlândia), Metropolitana de Belo Horizonte (01 granja do município de Vespaziano), Oeste (01 granja do município de Oliveira), Sul e Sudeste (01 granja do município de Passos), Triângulo Mineiro (02 granjas do município de Patos de Minas e 02 granjas do município de Patrocínio) e Zona da Mata (01 granja do município de Juiz de Fora e 01 granja do município de Ponte Nova). As granjas foram selecionadas por apresentarem um plantel de suínos com suspeita de SMDS. De cada propriedade visitada foram necropsiados os animais que apresentavam sinais clínicos de inapetência, dispnéia, taquipnéia, palidez da pele, diarreia, tosse, necrose de orelha e febre. O manejo dos suínos e as formas de eutanásia obedeceram às normas internacionais de bem estar animal. No total foram necropsiados 32 suínos com idades de cinco a onze semanas. Os animais foram identificados pela letra S (suíno) acrescentando o número

de ordem (1 a 32). A necropsia foi direcionada para a observação das alterações macroscópicas sugestivas da SMDS como: linfadenomegalia regional ou generalizada; pulmão com áreas de consolidação especialmente nos lobos porção crânio ventrais e rins com manchas brancacentas com hemorragias petequiais distribuídas sobre o córtex. Para a análise histopatológica foram selecionadas 92 amostras de tecidos: 38 (41,30%) linfonodos, 16 (17,39%) pulmões, 14(15,21%) fígados, 16(17,39%) rins, 05 (5,43%) fragmentos de intestino e 03 (3,60%) tonsilas. Estas amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por um período de até 48 horas, laminados a cinco micrômetros e coradas através da técnica de hematoxilina e eosina (HE). Grupo II: cento e nove (109) amostras de demanda recebidas no laboratório de patologia da Escola de Veterinária da UFMG, provenientes de granjas de suínos localizadas nos Estados de Goiás, Santa Catarina e Mato Grosso que apresentavam animais com suspeita clínica da SMDS, foram testadas pela IHQ. As amostras foram recebidas durante o período de setembro de 2003 a março de 2004 e compreendiam 36 linfonodos, 31 pulmões, 16 fígados e 26 rins.

A técnica de Imuno-histoquímica (IHQ) (BARBOSA; FREITAS, 2008) foi aplicada nas 201 amostras recebidas para análise (92 amostras de tecido do grupo I e nas 109 amostras do grupo II). Em cada bateria de testes foram utilizados dois controles positivos e dois controles negativos seguindo os seguintes parâmetros para a interpretação dos resultados: Reação negativa = (-) ausência total de marcações (ausência do antígeno viral). Reação positiva fraca = (+) visualização de marcações em menos de 25% do campo em análise (quantidade mínima do antígeno viral). Reação positiva moderada = (++) visualização de marcações entre 25 a 50% do campo em análise (quantidade moderada do antígeno viral). Reação positiva forte = (+++) visualização de marcações acima de 50% do campo em análise (quantidade abundante do antígeno viral). Amostras de tecido de suínos contendo antígenos

do CVS-2, embebidas em parafina, previamente testadas, foram utilizadas como controles positivos. Amostras de tecidos de suínos do plantel de animais livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free - SPF), previamente testados e negativos para a presença de antígenos do CVS-2 foram utilizadas como controles negativos.

Pesquisa de anticorpos contra o CVS-2

Amostras de soros: 955 amostras de soros de suínos de ambos os sexos com quatorze a vinte e duas semanas de idade, provenientes de trinta e cinco granjas localizadas nas mesorregiões já descritas e uma granja da mesorregião Noroeste do Estado de Minas Gerais, foram utilizadas na pesquisa de anticorpos contra o CVS-2, realizada no Laboratório Nacional Agropecuário LANAGRO/MG.

Os critérios adotados para a inclusão dos rebanhos no estudo foram de apresentar no mínimo 300 matrizes com ciclo completo de produção de suínos destinados ao abate e ser livre da SMDS.

A análise de anticorpos foi realizada no período de novembro/2003 a dezembro/2004. Estes soros foram enviados ao laboratório em lotes, identificadas com o número do animal, a data da coleta e armazenadas sob congelamento a -20°C .

A amostra do CVS-2 utilizada na análise sorológica foi isolada de um suíno com SMDS pela University of Minnesota-USA, sendo replicada em células de linhagem de rim de suíno (Swine Kidney-6 – SK6) e titulada pelo método de Spearman e Karber (FREITAS et al., 2006).

Soros controle: como controle positivo foi utilizado anticorpo policlonal de origem suína anti CVS-2 (VMRD, EUA) e como controle negativo, anticorpo policlonal de origem suína livre de anticorpos contra o CVS-2 (VMRD, EUA).

As células da linhagem SK6 foram cultivadas em MEM (GIBCO BRL, EUA) suplementado com 5 % de Soro Fetal Bovino (SFB), antibióticos (200UI/

mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) e antifúngico (100 $\mu\text{g/mL}$ de fungizona). O meio de manutenção das células foi o mesmo, exceto pela suplementação com 2% SFB. A titulação de anticorpos contra CVS-2 nos soros de suínos foi realizada pela técnica de Imunoperoxidase em Monocamadas de Células – IPMC (BARBOSA; LOBATO; MARTINS, 2008).

A leitura foi realizada em microscópio de luz invertida com o aumento de 100x. Para interpretação, os resultados sorológicos foram classificados como reagentes (positivos) e não reagentes (negativos). Os soros reativos foram considerados com baixo título de anticorpos quando os valores da titulação foram ≤ 160 , médios com valores de 320 até 2560 e altos com valores ≥ 5120 .

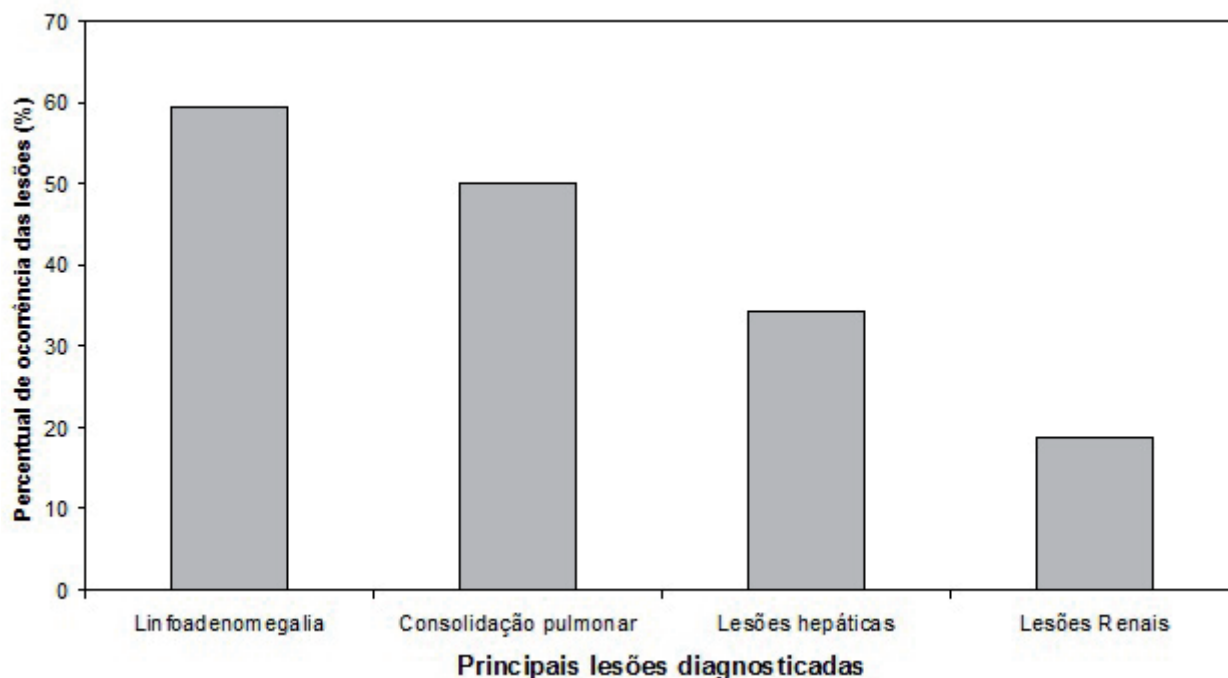
Análise Estatística

A frequência e o intervalo de confiança dos animais sorologicamente positivos foram calculados segundo BENNET et al. (1991). O intervalo de confiança da frequência das granjas soropositivas foi calculado pelo teste binominal exato (SAMPAIO, 1998). O teste Qui quadrado foi aplicado na análise comparativa do perfil de positividade entre as mesorregiões mineiras e entre os dos títulos de anticorpos encontrados. As mesorregiões foram agrupadas pela proximidade e identificadas como agrupamento A: triangulo mineiro e noroeste de minas; B: Oeste, Sul e Sudoeste mineiro; C: Zona da mata; D: central mineira e metropolitana de Belo Horizonte.

Resultados

Análise macroscópica e histopatológica. Grupo I. Treze suínos (40,62%) apresentaram distúrbios respiratórios e em seis (18,75%) foi verificada diarreia. Os principais achados macroscópicos da necropsia foram linfadenomegalia (59,37%) e áreas de consolidação pulmonar (50,00%) (Figura 1).

Figura 1. Achados macroscópicos de necropsias dos suínos suspeitos de SMDS em 12 granjas do Estado de Minas Gerais.



Quatro amostras (10,52%) de linfonodos apresentaram lesões histopatológicas com evidente redução do número de células linfóides e com proliferação de histiócitos. Somente em três amostras (7,9%) foi observada a ausência de foliculos. Corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e células gigantes multinucleadas foram demonstrados em duas amostras (6,25%). Em duas amostras (12,50%) de pulmões foram encontradas lesões típicas de pneumonia intersticial. Somente uma amostra apresentou broncopneumonia e presença de células gigantes (6,25%), sendo diagnosticada como pneumonia enzoótica e negativa para CVS-2. As amostras de tecidos de intestino, baço, tonsila, rim e fígado não mostraram alterações compatíveis com a SMDS (Tabela 1). Grupo II. As lesões mais frequentes nos linfonodos foram proliferação de histiócitos (94,44%) e redução de células linfóides (88,88%), ausência de foliculos linfóides (80,55%), presença de células gigantes (52,77%) e corpúsculos de inclusão em 44,44%. Nos órgãos não linfóides foi evidenciada a presença de lesões de pneumonia-

intersticial, broncopneumonia e a presença de células gigantes multinucleadas. Nefrite intersticial multifocal e glomerulonefrite também foram observadas. Uma significativa proliferação de histiócitos (81,25%) nas amostras de fígado. Células inflamatórias, concentradas em focos aleatórios, estavam distribuídas na tríade portal (Tabela 2).

IHQ. Antígenos virais foram identificados pela marcação de pequenos grânulos, amorfos, amarronzados, distribuídos de forma abundante e uniforme pelo citoplasma ocasionalmente, no núcleo das células, sempre em associação com lesões histopatológicas características da SMDS como descrito em Barbosa e Freitas (2008). As marcações antigênicas foram evidenciadas principalmente nos histiócitos, embora, tenha sido demonstrado, em menor frequência no citoplasma das células gigantes e na periferia dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. Não obstante ocorresse variação na quantidade e distribuição dos antígenos, a detecção de antígenos virais pela IHQ

foi superior nos linfonodos e pulmões seguidos pelo rim e fígado. Nos linfonodos, inúmeros histiócitos presentes no infiltrado apresentaram marcações de moderadas (++) a fortes (+++). No pulmão observaram-se marcações moderadas (++)). Nos rins, na região intersticial, as marcações

variavam de moderadas (++) a fracas (+). No fígado, células positivas na região periportal apresentaram marcações fracas (+). Os controles negativos analisados conjuntamente com as análises mostraram uma estrutura histológica inalterada quando corados pela HE.

Tabela 1. Antígenos virais do CVS-2 em amostras de tecido de suínos suspeitos de SMSD submetidos à necropsia dirigida oriundos de sete mesorregiões mineiras.

Mesorregião/Município	Granjas	Suínos	Amostras de tecido positivas		
			IHQ - Intensidade da Marcação		
			Linfonodos	Pulmão	IHQ
Zona da Mata/Urucânia	G1	S1*	2/3	1/1	++
					+++
Triângulo Mineiro/Patrocínio	G9	S24**	1/1	1/1	++
					+++
	G11	S28**	1/1	1/1	++
					+++

*O suíno S1 apresentou marcação de moderada (++) a forte (+++) nos cortes oriundos de dois linfonodos inguinais e mesentéricos e no pulmão.

**Os suínos S24 e S28 apresentaram marcações fortes(+++) nos linfonodos inguinais e moderada (++) no pulmão.

No grupo I, a IHQ indicou a presença de antígenos do CVS-2 em sete amostras de tecido dos três suínos S1, S24 e S28. Nestas amostras a marcação variou de forte (+++) a moderada (++)). O suíno S1 oriundo da Zona da Mata apresentou marcação em dois linfonodos inguinais e mesentéricos e também no pulmão. Os suínos S24 e S28 oriundos do Triângulo mineiro apresentaram marcações de linfonodos inguinais e pulmão (Tabela 1). No grupo II, em mais de 60% das amostras foi demonstrada a presença de antígenos virais. Nas amostras de linfonodos a marcação foi mais intensa e em maior número (86%) enquanto os pulmões, rins e fígado esse

percentual fica em torno de 50% (Tabela 2).

Pesquisa de anticorpos anti CVS -2

Todos os rebanhos (100%) apresentaram animais reagentes com intervalo de confiança de 90% a 100%. A frequência de animais soro-reagentes para o CVS-2 variou de 96,6% com intervalo de confiança 94,7% a 98,6% com os títulos de anticorpos entre 1:320 (Médio) a 1:10.240 (Alto), como pode ser observado na (Tabela 3).

Tabela 2. Lesões histopatológicas e resultados da IHQ das amostras de tecido de suíno recebidas do Laboratório de Patologia - UFMG.

Quantidade e amostras analisadas	Lesões	Tecidos com lesões	Nº. Amostras e percentual (%) de reações positivas para antígenos do CVS-2	Intensidade da marcação
36 Linfonodos	Proliferação de histiócitos	34	31 (86,11)	++
	Redução de células linfóides	32		+++
	Ausência de folículos	29		
	Presença de célula gigante	19		
	Presença de corpúsculos de inclusão	16		
31 Pulmões	Pneumonia intersticial	13	16 (51,61)	++
	Broncopneumonia	09		
	Presença de células gigantes	02		
26 Rins	Nefrite intersticial multifocal	09	11 (42,30)	++
	Glomerulonefrite	04		+
16 Fígados	Hepatite periportal	13	08 (50)	+
	Necrose	01		
Total: 109	-	-	66 (60,55)	-

O exame sorológico apontou 32 (3,35%) soros não reativos, ou seja, negativos para presença de anticorpos contra o CVS-2 e 77 (8,07%) com títulos altos (valores ≥ 5120) enquanto, 846 (88,58%) apresentaram títulos de anticorpos médios (320 até 2560).

A análise qualitativa entre as mesorregiões (presença de animais positivos e negativos) realizada pelo Qui quadrado mostrou diferenças entre elas tanto no grau de positividade como nos títulos de anticorpos (Tabela 4). Essa análise apontou similaridade entre os agrupamentos A (Triângulo mineiro e Noroeste de Minas) e o B

(oeste, Sul e Sudoeste) ($P=0.132$) e entre o A e D (Central Mineira e Metropolitana de BH) ($P=0,185$) e diferença entre os agrupamentos A e C (Zona da Mata) ($P=0,006$). O agrupamento B mostrou diferença quando confrontado com C ($P= 0,001$) e D ($P=0, 026$), enquanto, os agrupamentos C e D não mostraram diferenças significativas ($P=0,113$). A quantidade de animais distribuída nas classes de títulos de anticorpos negativos; médio-baixo, médio-alto e alto apresentou diferenças significativas entre todas as mesorregiões ($P= 0,0001$).

Tabela 3. Perfil dos títulos de anticorpos contra o CVS-2 em suínos sem sintomatologia SMDS em diferentes municípios de Minas Gerais.

Municípios	Granjas	Soros	Negativo	320	640	1280	2560	5120	10240	Frequência %
Oliveira	03	29	00	03	10	09	04	02	01	100
	31	00	00	12	16	01	00	02		
	48	00	01	12	19	11	01	04		
Divinópolis	03	12	00	00	02	06	01	03	00	97
	11	00	00	07	00	02	01	01		
	13	01	00	00	03	09	00	00		
Patos de Minas	09	30	00	00	12	16	02	00	00	97
	32	00	00	11	14	07	00	00		
	30	04	00	13	05	02	03	03		
	29	00	00	04	16	09	00	00		
	27	01	00	06	06	09	02	03		
	30	00	00	13	12	00	04	01		
	47	02	04	11	13	07	08	02		
	14	00	00	00	06	08	00	00		
	32	00	00	10	16	06	00	00		
	06	22	00	00	05	11	06	00	00	
30	00	00	12	11	02	04	01			
12	03	07	00	02	00	00	00			
26	00	00	14	09	03	00	00			
15	00	00	03	12	00	00	00			
Pará de Minas	14	02	01	05	06	00	00	00		
	04	30	00	00	09	15	06	00	00	97
	12	01	00	00	03	08	00	00		
	29	02	00	14	08	02	03	00		
	26	00	03	04	13	06	00	00		
Passos	01	13	00	00	03	07	00	02	01	
Curvelo	01	11	00	00	02	07	02	00	00	100
Belo Horizonte	03	79	05	04	13	28	12	11	06	87
	41	03	08	06	15	04	02	03		
	39	01	05	03	21	09	00	00		
Presidente Olegário	01	30	00	01	11	18	00	00	00	100
Manhuaçu	01	24	00	00	15	08	00	00	01	100
Viçosa	02	30	00	00	04	07	19	00	00	97
	25	07	09	03	00	04	02	00		
Coromandel	01	32	00	02	17	12	01	00	00	100
Total	35	955	32	48	266	370	162	48	29	955

Tabela 4. Análise do número de animais sorologicamente positivos contra o CVS-2 por mesorregiões mineiras agrupadas. As mesorregiões foram agrupadas pela proximidade geográfica e comparadas pelo Qui quadrado que mostrou semelhanças e diferenças entre elas no perfil de positividade (P).

Agrupamentos	Mesorregiões	Municípios	Granjas	Soros	Positivos	Negativos	%Positivos
A	Triângulo; NO	Coromandel	1	32	32	0	
A/B (P=0,132)	2	Patos de Minas	9	271	264	7	
A/D(P=0,185)		Patrocínio	6	119	114	5	
		Presidente Olegário	1	30	30	0	
Total		4	17	452	440	12	97,34
B	Oeste; Sudeste; Sul	Oliveira	3	108	108	0	
B/C (P=0,001)	3	Divinópolis	3	36	35	1	
B/D(P=0,026)		Passos	1	13	13	0	
Total		3	7	157	156	1	99,36
C	Zona da Mata	Manhuaçu	1	24	24	0	
A/C (P=0,006)	1	Viçosa	2	55	48	7	
Total		2	3	79	72	7	91,14
D	C. Mineira;	Curvelo	1	11	11	0	
C/D (P=0,113)	Metropolitana BH	Belo Horizonte	3	159	150	9	
	2	Pará de Minas	4	97	94	3	
Total		3	8	267	255	12	95,5
Total geral	8	12	35	955	923	32	96,65

Discussão

Os achados macroscópicos não são conclusivos para o diagnóstico de SMDS no plantel, contudo, lesões macroscópicas como linfadenomegalia e áreas de consolidação pulmonar como as encontradas nos animais do grupo I, são citadas como fortes indicativos da existência da SMDS (ROSELL et al., 1999; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005). A eficácia da IHQ na detecção de antígenos virais é conhecida (BARBOSA; FREITAS, 2008; BOENISCH, 2001; MCNEILLY et al., 1999) contudo, a inclusão de amostras de

demanda laboratorial, agrupamento II, processadas paralelamente as amostras de suínos submetidos a necropsia dirigida, agrupamento I, corroborou esta eficácia na detecção de antígenos do CVS-2 em suínos oriundos de diferentes origens e graus de refugagem.

No relatório do IBGE, Minas Gerais consta como o quarto colocado no ranking de produção suinícola abrigando 3.535.101 cabeças representando 10,7% do rebanho nacional (IBGE, 2006). As mesorregiões Zona da Mata, o Triângulo Mineiro e Central Mineira compõem os maiores plantéis do Estado e participavam na ocasião da coleta das

amostras com cerca 1.829.413 cabeças (51,8%) do rebanho mineiro, com representatividade de 21,2%, 18,1%, 12,5%, respectivamente. No grupo I a pesquisa de antígenos virais do CVS-2 foi dirigida para granjas comerciais com suínos com suspeita de SMDS, pelo menos uma granja de suínos por mesorregião. Paralelamente se buscou rastrear anticorpos contra o CVS-2 nessas mesmas mesorregiões pela proximidade e facilidade de circulação de animais e conseqüentemente do vírus. Considerando a importância na suinocultura mineira, foram visitadas 04 granjas na mesorregião do Triângulo (02 granjas de Patos de Minas e 02 granjas de Patrocínio) e 02 na mesorregião da Zona da Mata (01 granja de Juiz de Fora e 01 granja de Ponte Nova). Trinta e dois suínos considerados refugos apresentaram lesões sugestivas da SMDS e destes, noventa e duas amostras de tecidos foram processadas pela histopatologia e IHQ. Em 7,60% (7/92) das amostras de tecidos, antígenos virais do CVS-2 foram demonstrados pela IHQ. Esse dado indica que as amostras teciduais foram procedentes de animais que já eram refugos e não que se tornaram refugos por causa da infecção pelo CVS-2. Segundo Segalés, Allan e Domingo (2005) não é raro que em suínos ocorram sintomas de definhamento ocasionados por outros fatores que não uma infecção pelo CVS-2. Interessante observar que as amostras positivas pela IHQ foram obtidas de suínos de granjas localizadas das mesorregiões mais representativas da suinocultura mineira (Triângulo e da Zona da Mata). Nessas regiões o percentual de animais soropositivos para CVS-2 atingiu 97,34% (Triângulo mineiro) e 91% (Zona da Mata). Esse alto percentual de animais com anticorpos contra o CVS-2 e sem sintomatologia de SMDS sugere que o vírus está circulando na área e que um rastreamento de antígenos em um número maior de granjas e animais pode resultar no aumento do número de amostras reagentes pela IHQ.

No segundo agrupamento, antígenos virais foram diagnosticados em órgãos linfóides e não linfóides. Nessas amostras, o percentual de linfonodos

reagentes na IHQ foi sensivelmente superior aos outros órgãos que foram analisados (Tabela 2). Segalés, Allan e Domingo (2005) afirmaram que tecidos com redução dos números de linfócitos, proliferação de histiócitos em órgãos linfóides, com fortes imuno-reações pela IHQ representam a forma aguda da doença. Independente do tipo de órgão, mais de 60% dos tecidos apresentaram marcação positiva na IHQ, compatíveis com MCNEILLY et al. (1999) que verificaram que em 131 tecidos, 54 foram positivos no teste de IHQ e 27 apresentavam lesões histopatológicas características da SMDS. Nas 201 amostras, a IHQ permitiu demonstrar a presença do antígeno viral distribuído no citoplasma de histiócitos em células gigantes multinucleadas e na periferia dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. A presença de corpúsculos de inclusão é corroborada por HUANG et al. (2008). Os resultados dos exames histopatológicos (HE) dos grupos I e II foram confrontados com os resultados de IHQ (Tabelas 1 e 2) com o objetivo de associar a presença de antígenos do CVS-2 às lesões histopatológicas, uma vez que a literatura sustenta a localização de antígenos virais do CVS-2 em linfonodos, mesmo nas infecções subclínicas (MCNEILLY et al., 1999). Em nossas condições de trabalho, esta correlação foi evidenciada efetivamente, pois em ambos os agrupamentos os linfonodos analisados que apresentaram intensa marcação pela IHQ. Essa possível correlação fora anteriormente citada por ROSELL et al. (1999) pelas técnicas de IHQ e HIS, respectivamente. Este fato seria justificado pelo aumento da produção de proteínas virais durante processo de replicação do CVS-2 os tecidos linfóides, considerados alvo do tropismo viral (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005). O que nos permite sugerir que esse tecido deve ser usado como amostra de eleição para a demonstração do CVS-2.

A pesquisa de anticorpos contra um agente patogênico permite avaliar previamente a predisposição ou risco de animais susceptíveis/receptores a determinada infecção. Quando a

enfermidade ainda não se estabeleceu na forma clínica no rebanho, o rastreamento permite avaliar os riscos do estabelecimento da infecção. A idade dos animais pesquisados é importante para se assegurar que os anticorpos detectados são oriundos de infecção e não são anticorpos maternos. Em suínos a meia-vida dos anticorpos maternos demonstrados pela técnica de ELISA é estimada em 19 dias (OPRIESSNIG et al., 2004). RODRIGUES-ARRIOJA et al. (2003) e LAROCHELLE, MAGAR e D'ALLAIRE (2003) demonstraram a soro-conversão em suínos variou entre onze a quinze semanas idade. Os animais analisados neste trabalho estavam na faixa de quatorze a vinte e duas semanas de idade, portanto os anticorpos detectados pela IPMC nestes animais foram desencadeados pela infecção com CVS-2. Anticorpos humorais contra o CVS foram encontrados em quase todos os rebanhos de suínos no mundo e em até 100% dos animais dentro dos rebanhos. Há um predomínio alto de infecção de CSV-2 nas populações de suínos do Canadá, França, Alemanha, Nova Zelândia, Irlanda do Norte, Reino Unido, e os Estados Unidos (ALLAN; ELLIS, 2000; DULAC; AFSHAR, 1989; EDWARDS; SANDS, 1994; HINES; LUKERT, 1995; HORNER, 1995; MAGAR; MÜLLER; LAROCHELLE, 2000; TISCHER et al., 1986. SIBILA et al. (2004) citaram a presença de PCV2 em 5 fazendas sem história de SMDS e em 4 fazendas com SMDS.

A ocorrência de circovirose suína no Brasil foi principalmente descrita de casos clínicos de suspeita SMDS algumas vezes em criações de animais precárias (ZANELLA; MORÉS, 2003; FRANÇA et al., 2005; CORREIA et al. 2006). Logo, este trabalho representa o primeiro rastreamento de anticorpos séricos contra o CVS em animais sem sintomatologia sugestiva da SMDS e oriundos de granjas representativas da qualidade de manejo e sanitárias no país. As granjas envolvidas neste estudo são comerciais e possuem um manejo em escala de produção, utilizam uma genética melhorada, nutrição balanceada e cuidados especiais com

programas sanitários. Elas são representativas da realidade nacional em termos de técnica e resultados zootécnicos. Debalde as condições de manejo, a frequência de animais soro-reagentes para o CVS-2 variou de 96,6% com intervalo de confiança 94,7% a 98,6% com os títulos de anticorpos contra o CVS-2 na faixa de 1: 320 (Médio) a 1: 10.240 (Alto) como podem ser observados na Tabela 3, sendo que a maioria dos animais apresentou anticorpos na faixa de título médio. A variabilidade de perfis de anticorpos é assinalada quando comparadas as mesorregiões (Tabela 4). A similaridade no perfil de anticorpos contra o CVS-2 entre os agrupamentos A (Triângulo mineiro e Noroeste de Minas) e o B (oeste, Sul e Sudoeste) e entre o A e D (Central Mineira e Metropolitana de Belo Horizonte) não obstante o número de granjas analisadas seja diferente, sugerem que a infecção com o CVS-2 se dispersa de forma equivalente entre essas regiões o que não se observa entre os agrupamentos A e C (Zona da Mata). Este achado pode ser consequência do trânsito e o comércio de animais entre as mesorregiões e a proximidade geográfica das granjas que permitiria a circulação dos vírus entre as granjas com maior ou menor intensidade. Como podemos observar na divergência de perfil do agrupamento B quando confrontado quando com C e D enquanto os agrupamentos C e D não mostraram diferenças significativas.

Estes resultados mostram uma ampla distribuição da infecção pelo CVS-2 nas propriedades analisadas, contudo, citações de alta prevalência de animais com anticorpos contra CVS não são raras: RODRÍGUEZ-ARROJA et al. (2003) verificaram pela IPMC 72,7% soros reagentes contra o CVS-2. Anteriormente, DULAC E AFSHAR (1989) citaram a presença de anticorpos para este vírus pelos dos testes de Imunofluorescência Indireta (IFI) e IPMC em 80% dos suínos avaliados. No reino Unido, Edwards e SANDS (1994) e ALLAN; ELLIS (2000) encontraram 86% e 92% de soros de suínos positivos, respectivamente, sendo que todos os rebanhos investigados havia pelo menos

um animal positivo. Na Alemanha, Tischer et al. (1995), evidenciaram a presença de anticorpos para o CVS em 75% dos soros de suínos provenientes de abatedouros.

Considerando que todos os rebanhos (100%) apresentaram animais reagentes com intervalo de confiança de 90% a 100% e uma vez que eram granjas de ciclo completo, consideradas as de maiores susceptibilidade para circovirose (ALLAN; ELLIS, 2000), a amostragem de 955 soros de suínos analisadas neste trabalho, embora representando menos de 1% dos suínos das regiões produtoras de Minas, sugerem muita atenção para o risco potencial do desenvolvimento de circovirose.

O estímulo do sistema imune influencia diretamente a ocorrência clínica da SMDS uma vez que CVS-2 está associado a aspectos imunossupressores que irão permitir a replicação persistente do vírus como também favorecer a infecção por outros agentes patogênicos indutores da SMDS no plantel (KRAKOWKA et al., 2001). Segundo Meerts et al. (2006), a ausência ou atraso na produção de anticorpos neutralizantes em suínos aumenta a replicação do CVS-2, que é fator crucial na patogênese da SMDS (GRAU-ROMA et al. 2009). A IPMC detecta a presença de anticorpo total e embora não permita a diferenciação anticorpos entre neutralizantes e não neutralizantes favorece a observação efetiva da resposta imune do animal frente à infecção viral. Uma vez que os animais não respondem igualmente a resposta viral, a presença ou ausência de anticorpos pode sugerir se o animal está mais ou menos predisposto a desenvolver a circovirose clínica. Isto significa que 2,66% dos soros de suínos oriundos, principalmente, do Triângulo Mineiro e 9% da Zona da Mata poderiam desenvolver a SMDS clínica e esse percentual alcança para 3,35% no total dos soros analisados.

Concluindo, ainda é muito limitado o conhecimento sobre as condições exatas que desencadeiam a SMDS assim como os mecanismos de controle da doença. Concomitantemente, o

caráter imunossupressor do vírus que possibilita o estabelecimento de outras infecções que associadas a fatores estressantes como as altas densidades populacionais em ambientes restritos e a junção de animais de diferentes idades, podem favorecer o desencadeamento da SMDS. As medidas profiláticas se fundamentam na melhoria das condições de manejo que visem principalmente à higiene, alimentação e a redução do estresse dos animais além de boas práticas visando o bem-estar animal certamente reduzirão o risco do estabelecimento da circovirose no plantel.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Massami Nakajima do LANAGRO/MG e ao Dr. Lúcio Ayres Caldas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ pela leitura crítica deste manuscrito. Ao Dr. Jorge Caetano da SDA/MAPA pelo apoio a realização dos trabalhos sobre Circovírus Suíno. Agradecemos também aos Drs. James Collins e Han So-Joo do Veterinary Diagnostic Laboratory da University of Minnesota, USA, ao Dr. Joaquim Segalés da Universidade Autônoma de Barcelona-ES e a equipe de histopatologia do Centro Nacional de Suínos e Aves, CNPSA-EMBRAPA, Concórdia, SC. Este trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.

Referências

- ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, USA, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2000.
- BARBOSA, C. N.; FREITAS, T. R. P. Implementação da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico do Circovírus Suíno Tipo-2 (CVS-2). *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, v. 7, n. 3, p. 211-219, 2008.
- BARBOSA, C. N.; LOBATO, Z. I. P.; MARTINS, N. R. S. Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arquivo Brasileiro de*

- Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 815-820, 2008.
- BENNETT, S.; WOODS, T.; LIYANAGE, W. M.; SMITH, D. L. A simplified general method for cluster surveys of health in developing countries. *Rapport Trimestral. Statistic Sainte Mondial*, London, UK, v. 44, p. 98-106, 1991.
- BOENISCH, T. *Immunochemical staining methods handbook*. 3. ed. California: Dako Corporation, 2001. 67 p.
- CALSAMIGLIA, M.; SEGALÊS, J.; QUINTANA, J. Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, Barcelona, Spain, v. 40, n. 5, p. 1848-1850, 2002.
- CORREIA, A. M.; PESCADOR, C. A.; SCHMITZ, M.; ZLOTOWSKI, P.; ROZZA, D. B.; OLIVEIRA, E. C.; BARCELLOS, D. E.; DRIEMEIER, D. Aspectos clínico patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 9-13, jan./mar. 2006.
- DULAC, G.; AFSHAR, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC-CCL 33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Canadian Journal Veterinary Research*, Ottawa, Canadá, v. 53, p. 431-433, 1989.
- EDWARDS, S.; SANDS, J. J. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Veterinary Records*, London, v. 134, n. 26, p. 680-681, 1994.
- FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; DRIEMEIER, D.; MORES, N.; ZANELLA, J. Surto de circovirose (síndrome debrinhante multissistêmica de suínos desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, v. 25, n. 1, p. 39-53, 2005.
- FREITAS, T. R. P.; CALDAS, L. A.; ESPÍRITO-SANTO, M. P.; MENESES, M. D. F. *Conceitos básicos, métodos e técnicas em laboratório de virologia animal: imunologia*. Pedro Leopoldo: Ed. Tavares Gráfica e Editora, 2006, 176 p.
- GAUVREAU, H. Porcine circovirus update. *Advances in Pork Production*, Wheatland Trail, Strathmore, v. 12, p. 31-34, 2001.
- GIMENO, E. J. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada à patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995. Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG/UFV/CBP, 1995. p. 17-51.
- GRAU-ROMA, L.; HJULSAGER, C. K.; SIBILA, M.; KRISTENSEN, C. S.; LÓPEZ-SORIA, S.; ENØE, C.; CASAL, J.; BØTNER, A.; NOFRARIÁS, M.; BILLE-HANSEN, V.; FRAILE, L.; BAEKBO, P. SEGALÉS, J.; LARSEN, L. E. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary Microbiology*, Barcelona, Spain, v. 135, p. 272-282, 2009.
- HINES, R. K.; LUKERT, P. D. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States. *Swine Health Production*, Athens, Georgia, USA, v. 3, n. 2, p. 71-73, 1995.
- HORNER, G. W. *Pig antibodies present in New Zealand pigs*. *Surveil Wellington*, v. 18, p. 23, 1995.
- HUANG, Y. Y.; WALTHER, I.; MARTINSON, S. A.; LÓPEZ, A.; YASON, C.; GODSON, D. L.; CLARK, E. G. SIMKO, E. Porcine circovirus 2 inclusion bodies in pulmonary and renal epithelial cells. *Veterinary Pathology*, USA, v. 45, n. 5, p. 640-644, 2008.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. *Censo agropecuário 2006 - resultados preliminares*. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. 145 p.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J. A.; MCNEILLY, F.; RINGLER, S.; RINGS, D. M.; ALLAN, G. Activation of the immune system is the pivotal event in the reproduction of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Veterinary Pathology*, USA, v. 38, n. 1, p. 31-42, 2001.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serological and virological study of herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Canadian Journal Veterinary Research*, Ottawa, Canadá, v. 67, n. 2, p. 114-120, 2003.
- MAGAR, R.; MÜLLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and 2. *Canadian Journal Veterinary Research*, Ottawa, Canadá, v. 64, n. 3, p. 184-186, 2000.
- MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MEEHAN, B. M.; FOSTER, J. C.; CALRKE, 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*, London, v. 80, n. 2, p. 123-128, 1999.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; LEFEBVRE, D.;

- NIELSEN, J.; BØTNER, A.; KRISTENSEN, C. S.; NAUWYNCK, H. J. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Veterinary Research*, Ghent, Belgium, v. 2, p. 6, 2006.
- OPRIESSNIG, T.; YU, S.; THACKER, E. L.; HALBUR, P. G. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *Journal of Swine Health and Production*, Ames, USA, v. 12, p. 186-191, 2004.
- RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; ROVIRA, A.; PUJOLS, J.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Journal. Veterinary Medicine B*, Barcelona, Spain, v. 50, n. 2, p. 99-101, 2003.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANA-DURÁN, J.; BALASCH, M.; RODRIQUEZ-ARRIOJA, G. M.; KENNEDY, S.; ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; LATIMER, K. S.; DOMINGO, M. Pathological, immunohistochemical, and In-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, Barcelona, Spain, v. 120, n. 1, p. 59-78, 1999.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 221 p.
- SEGALÉS, J.; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research and Review*, Belfast, Northern Ireland, v. 6, n. 2, p. 119-142, 2005.
- SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; BLANCHARD, P.; BADIELLA, L.; LE DIMNA, M.; JESTIN, A.; DOMINGO, M. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal Veterinary Research*, USA, v. 65, n. 1, p. 88-92, 2004.
- TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D.; POCIULI, S.; GERMANN, B. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Archives of Virology*, Berlin, Germany, v. 140, n. 4, p. 737-743, 1995.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, Berlin, Germany, v. 91, n. 3/4, p. 271-276, 1986.
- ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N. Diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 522-527, 2003.