



Pesquisa de proteínas antigênicas do *circovirus* suíno tipo 2 pela técnica de Imuno-histoquímica

[Search antigenic proteins of porcine circovirus type 2 by the technique of immunohistochemistry]

"Artigo Científico/Scientific Article"

C N Barbosa^{1(*)}, T R P Freitas²

¹Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE, Recife –PE, Brasil.

²Pesquisadora em Ciências Exatas e da Natureza. Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/MG. MAPA. Brasil.

Resumo

O *circovirus* suíno tipo 2 (CSV2) é um vírus classificado na família *Circoviridae* e está associado à Síndrome Multissistêmica do Definhamento de Suínos (SMDS). O diagnóstico deve ser fundamentado em três pontos principais: a presença dos sinais clínicos compatíveis, as lesões histopatológicas características e a demonstração do ácido nucléico e/ou do antígeno viral dentro das lesões. A técnica de Imuno-histoquímica (IHQ) permite a demonstração de antígenos virais através do uso de anticorpos específicos e sondas. Neste trabalho, dois grupos de amostras foram analisados pela IHQ. O grupo I composto por 32 suínos submetidos à necropsia com suspeita clínica da SMDS provenientes de 12 granjas comerciais do Estado de Minas Gerais. O grupo II formado por 109 amostras de tecidos, recebidas pelo laboratório de histopatologia, com lesões sugestivas da SMDS. A primeira e a segunda amostragem revelaram, respectivamente, 7,6% e 60,0%, de positividade para a presença de antígenos do CVS2. Em ambos os grupos, os antígenos virais foram demonstrados com maior frequência nos linfonodos e pulmões evidenciados pela intensa marcação nos histiócitos. A aplicação da IHQ possibilitou a comparação entre as alterações histopatológicas e a distribuição do antígeno viral no tecido.

Palavras-chave: diagnóstico, doença, suíno, vírus.

Abstract

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a virus classified in the family *Circoviridae* and is associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). The diagnosis should be on three main points: The presence of compatible clinical signs, histopathological lesions and demonstration of the nucleic acid and / or viral antigen inside lesions. Immunohistochemistry (IHC) method allows the demonstration of viral antigens by using specific antibodies and probes. In this study, two groups of samples were analyzed by IHC. Group I consists of 32 necropsied pigs with clinical signs indicative of the PMWS from commercial farms in Minas Gerais State. Group II consists of 109 tissues received by histopathology laboratory, with lesions suggestive of PMWS. The first and second sampling revealed, respectively, 7,60% and 60,55% positivity for the presence of antigen PCV2. In both groups, the viral antigens were demonstrated more frequent in lymph nodes and lungs evidenced by the intense immunoreactivity of histiocytes. The application of IHC allowed the comparison of between histopathological changes and the distribution of viral antigen in tissue.

Key-words: diagnosis, disease, swine, virus.

(*) Autor para correspondência/Corresponding author : e-mail: clara@dmv.ufrpe.br

Recebido em: 30 maio de 2011

Aceito em: 16 de junho de 2011

Introdução

Nos anos 90, um vírus associado à Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS) foi descrito por pesquisadores da Universidade de Saskatchewan, no Canadá (ALLAN et al., 1998; ELLIS et al., 1998; HARDING, 2004). O vírus foi denominado *circovirus* suíno tipo 2 (CVS2) por ser geneticamente e antigenicamente diferente do *circovirus* suíno tipo 1 (CVS1), anteriormente, descrito como contaminante em células de linhagem de suíno (TISCHER et al., 1982).

Na ocasião, a SMDS foi considerada doença emergente com potencial para gerar prejuízos à indústria suinícola. No entanto, foi demonstrado que a SMDS resultava de infecções sincrônicas e sinérgicas com agentes patógenos virais, bacterianos ou micóticos (HARDING, 2004). Concomitantemente, reconheceu-se que o desencadeamento da SMDS envolve fatores infecciosos e não infecciosos (GAUVREAU, 2001). As condições inadequadas de manejo podem maximizar o estresse que agravado pelo aspecto imunossupressor das infecções com CVS2 contribui para o estabelecimento de doenças associadas ao *circovirus* suíno ou circovirose (KRAKOWKA et al., 2001; SEGALÉS e MATEU, 2006).

Dentre as circovirose, a SMDS é citada como estritamente relacionada à presença do CVS2 (CINO-OZUNA et al., 2011). Os prejuízos decorrentes da síndrome nos plantéis afetados são substanciais para a indústria suinícola. Entre eles, os elevados índices de morbidade, os gastos com antibióticos, o declínio das taxas de crescimento e a queda na conversão alimentar, que elevam os números de animais debilitados e / ou refugos (SEGALÉS et al., 2005; BARBOSA et al., 2008).

A enfermidade apresenta sinais clínicos inespecíficos, porém caracterizada pelo definhamento progressivo, dispnéia, palidez e icterícia, acometendo principalmente os animais de seis a doze semanas de idade (ALLAN e ELLIS, 2000; HARDING, 2004; KIM et al., 2003). As

lesões macroscópicas associadas à SMDS incluem linfadenomegalia regional ou generalizada e pulmões com áreas de consolidação nos lobos anteriores cranio-ventral (SEGALÉS et al., 2005). As alterações histopatológicas ocorrem, principalmente, nos órgãos linfóides e são caracterizadas por redução nos números de linfócitos, proliferação de histiócitos, formação de células gigantes multinucleadas e os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (ROSELL et al., 1999; KIM et al., 2003). A associação do CVS2 com a SMDS foi verificada em condições naturais ou experimentais pela presença de proteínas virais e/ou genoma viral dentro das lesões (ALAN e ELLIS, 2000; ROVIRA, et al., 2002). A presença de antígenos virais e anticorpos contra o CVS2 vêm demonstrando uma distribuição cosmopolita do vírus (ALAN e ELLIS, 2000; BARBOSA et al., 2008; GUO et al., 2010).

A pesquisa de antígenos do CVS2 se torna importante para se conhecer o envolvimento deste vírus na SMDS, como também para futuras caracterizações moleculares do vírus em rebanhos brasileiros. A técnica de Imuno-histoquímica (IHQ) conjuga as técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas. Além disso, possibilita a demonstração de antígenos teciduais *in situ* por meio da utilização de anticorpos policlonais específicos contra o vírus ou anticorpos monoclonais e moléculas marcadoras (BOENISCH, 2001).

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de proteínas antigênicas do CVS2 em suínos com sinais clínicos e lesões sugestivas da SMDS aplicando a técnica de IHQ.

Material e Métodos

As amostras de tecido de suínos analisadas neste trabalho foram oriundas de dois grupos distintos nomeados grupo I e II. Grupo I compreendeu 12 granjas comerciais localizadas no Estado de Minas Gerais que apresentaram suínos com suspeita de SMDS. De cada propriedade

visitada foram selecionados e necropsiados animais que apresentavam sinais clínicos tais como: inapetência, dispnéia, taquipnéia, palidez da pele, diarreia, tosse, necrose de orelha e febre. No total foram necropsiados 32 suínos com idades entre seis a doze 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 (SEGALÉS et al., 2005). Para a análise histopatológica foram selecionadas 92 amostras de tecidos sendo: 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. Essas amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas, laminadas a cinco micrômetros e coradas através da técnica de hematoxilina e eosina (HE). Grupo II compreendeu de cento e nove (109) amostras de demanda recebidas no laboratório de patologia da Escola de Veterinária da UFMG durante o período de setembro de 2003 a março de 2004 e continham 36 linfonodos, 31 pulmões, 16 fígados e 26 rins. As amostras de tecidos foram provenientes de granjas de suínos localizadas nos Estados de Goiás, Santa Catarina e Mato Grosso que apresentavam animais com suspeita clínica da SMDS.

A técnica de IHQ foi aplicada no total de 201 amostras (92 amostras do grupo I e 109 amostras do grupo II) de acordo com a metodologia descrita por Barbosa e Freitas (2008). Em cada bateria de testes, foram utilizados dois controles positivos e dois controles negativos, bem como a adoção dos 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

Grupo II

do antígeno viral). Reação positiva forte = (+++) visualização de marcações acima de 50% do campo em análise (quantidade abundante do antígeno viral).

Para os controles positivos, foram utilizadas amostras de tecido de suínos contendo antígenos do CVS2, embebidas em parafina, previamente testadas. Os controles foram, gentilmente, fornecidos pelos Drs. James Collins do Veterinary Diagnostic Laboratory-University of Minnesota - USA e pelo Dr. Joaquim Segalés da Universidade Autônoma de Barcelona-ES. Os controles negativos foram amostras de tecidos de suínos do plantel de animais livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free – SPF*) fornecidos pela Embrapa Suínos e Aves.

Resultados

Grupo I

Dos 32 suínos submetidos à necropsia, 13 (40,62%) apresentaram distúrbios respiratórios e em seis (18,75%) foi verificada diarreia. Os principais achados macroscópicos foram linfadenomegalia em 23(59,37%) e áreas de consolidação pulmonar em oito (50,00%) animais, conforme mostra a Figura 1.

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 (7,90%) foi observada a ausência de folículos. Os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e as 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 CVS2. As amostras do intestino, baço, tonsila, rim e fígado não mostraram alterações macroscópicas compatíveis com a SMDS.

As lesões histopatológicas mais frequentes nos linfonodos foram proliferação de histiócitos e redução de células linfóides, perfazendo em 34 (94,44%) e 32 (88,88%), respectivamente. A ausência de folículos linfóides foi evidenciada em 29 (80,55%), a presença de células gigantes em 19 (52,77%) e corpúsculos de inclusão em 16 (44,44%).

Nos órgãos não linfóides assinalamos a presença de lesões de

pneumonia-intersticial, broncopneumonia e a presença de células gigantes multinucleadas. Nos rins, nefrite intersticial multifocal e glomerulonefrite, além de significativa proliferação de histiócitos 13 (81,25%) nas amostras do fígado. As células inflamatórias estavam distribuídas na tríade portal, concentradas em focos, distribuídas aleatoriamente e, menos frequentemente, nas áreas com necrose (Tabela 1).

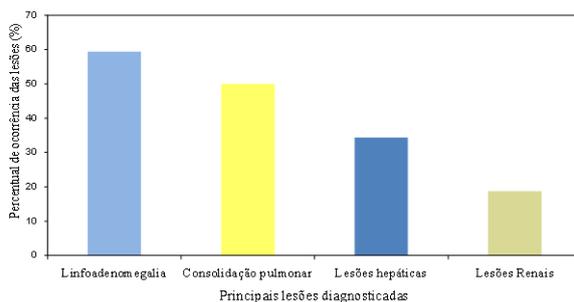


Figura 1. Percentagem das lesões macroscópicas em 32 suínos submetidos à necropsia de 12 granjas com suspeita de síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) no Estado de Minas Gerais.

Tabela 1. Lesões histopatológicas e resultados no teste de Imuno-histoquímica nas amostras de tecidos do grupo II

Amostras de tecidos	Lesões histopatológicas	Número de tecidos com lesões	Nº de amostras e percentual (%) de reações positivas para o antígeno de CVS2	Intensidade da marcação pela IHQ
36 linfonodos	Proliferação de histiócitos	34	31 (8,11)	+++
	Redução de células linfóides	32		
	Ausência de folículos	29		
	Presença de célula gigante	19		
	Presença de corpúsculos de inclusão	16		
31 Pulmão	Pneumonia intersticial	13	16 (51,61)	++
	Broncopneumonia	9		
	Presença de célula gigante	2		
26 Rim	Nefrite intersticial multifocal	9	11 (42,30)	++
	Glomerulonefrite	4		
16 Fígado	Hepatite periportal	13	8 (50,00)	+
	Necrose	1		
TOTAL: 109			66 (60,55)	

Imuno-histoquímica

Antígenos virais foram identificados pela marcação de pequenos grânulos, amorfos, amarronzados, distribuídos de forma abundante e uniforme pelo citoplasma (Figura 2) e, ocasionalmente, no núcleo das células, sempre em associação com lesões

histopatológicas características da SMDS. 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 intracitoplasmático.

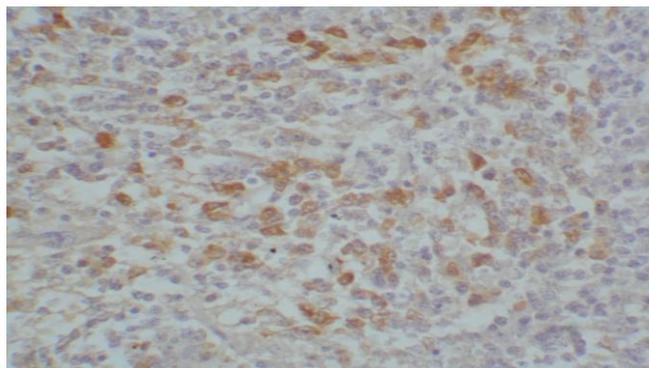


Figura 2. Fotomicrografia do linfonodo naturalmente infectado pelo *circovirus* suíno tipo 2. Antígeno viral detectado pela técnica de Imuno-histoquímica. Notar a marcação específica no citoplasma dos macrófagos. Aumento 400X.

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 (Figura 3).

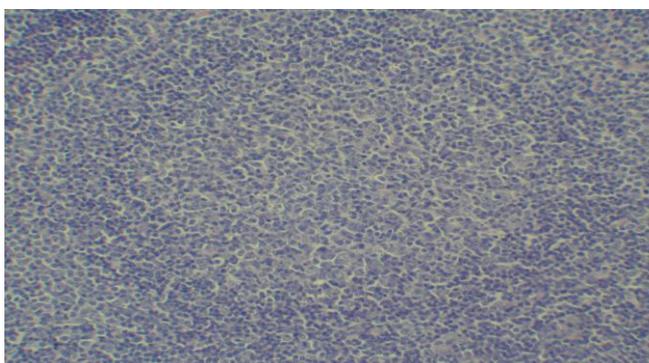


Figura 3. Controle negativo da reação no teste de Imuno-histoquímica no linfonodo de suíno *specific pathogens free* - SPF. Contracoloração por Hematoxilina de Mayer. Aumento 200X.

No grupo I, a IHQ indicou a presença de antígenos do CVS2 em sete amostras de tecido dos três suínos S1, S24 e S28. Nestas amostras a marcação variou de forte (++++) a moderada (++). O suíno S1 apresentou marcação em dois linfonodos inguinais e mesentérios e também no pulmão. Os suínos S24 e S28 apresentaram marcações no linfonodo e pulmão.

No grupo II, em 66 (60,55 %) das amostras foi demonstrada a presença de antígenos virais. Nas amostras de linfonodos a marcação foi mais intensa e em maior número 31(86,11%). Enquanto, nos pulmões, rins e fígado o antígeno foi evidenciado em 16 (51,61%), 11(42,30) e oito (50,00%), respectivamente (Tabela 1).

No grupo I, a IHQ indicou a presença de antígenos do CVS2 em sete amostras de tecido dos três suínos S1, S24 e S28. Nestas amostras a marcação variou de forte (++++) a moderada (++). O suíno S1 apresentou marcação em dois linfonodos inguinais e mesentérios e também no pulmão. Os suínos S24 e S28 apresentaram marcações no linfonodo e pulmão.

No grupo II, em 66 (60,55 %) das amostras foi demonstrada a presença de antígenos virais. Nas amostras de linfonodos a marcação foi mais intensa e em maior número 31(86,11%). Enquanto, nos pulmões, rins e fígado o antígeno foi evidenciado em 16 (51,61%), 11(42,30) e oito (50,00%), respectivamente (Tabela 1).

Discussão

Os achados macroscópicos não são conclusivos para o diagnóstico de SMDS no plantel. Contudo, as lesões macroscópicas como linfadenomegalia e áreas de consolidação pulmonar que foram encontradas nos animais do grupo I, são indicativas da existência da SMDS (ROSELL et al., 1999; SEGALÉS et al., 2005). Uma vez que, em rebanhos suínos as infecções subclínicas causadas pelo CVS2 podem ser frequentes, é recomendada a investigação laboratorial de antígenos e/ou ácido nucléico viral para comprovar a presença do vírus nas lesões histopatológicas (McNEILLY et al., 1999).

Em ambos os ensaios as amostras foram analisadas pelas técnicas histopatológicas e pela IHQ para rastrear a presença do vírus. Embora os animais do grupo I apresentassem lesões sugestivas da SMDS, a baixa ocorrência na demonstração do antígeno viral, em somente 7,60% (7/92) das amostras de tecidos pela IHQ indica que as amostras teciduais foram procedentes de animais que já eram refugos e não que se tornaram refugos por causa da infecção pelo CVS2. Segundo Segalés et al. (2005) não é raro que em rebanhos de suínos ocorram sinais de definhamento ocasionados por outros fatores que não uma infecção pelo CVS2. Ainda assim, no mesmo trabalho os autores afirmam que quando existe um alto índice de refugagem no rebanho e a SDMS é diagnosticada em dois ou três animais, pode-se assumir que a maioria dos animais estejam acometidos pela SDMS.

No grupo II, antígenos virais foram evidenciados em órgãos linfóides (linfonodos) e não linfóides (pulmões, rim e fígado). Embora, as amostras oriundas do laboratório de patologia variassem em número, o percentual de linfonodos reagentes na IHQ foi sensivelmente superior aos outros órgãos que foram analisados (Tabela 1). Rosell et al. (1999) sugeriram que existe variação na distribuição das lesões histopatológicas em órgãos linfóides e não-linfóides em animais suspeitos da SMDS. Essa variação é dependente do estágio da doença. Segalés et al. (2005) afirmaram que os tecidos com redução dos números de linfócitos, proliferação de histiócitos em órgãos linfóides e com fortes marcações pela técnica de IHQ podem representar a forma aguda da doença. Essas informações sugerem que as amostras analisadas se originaram de rebanhos acometidos pela SMDS. Independente do tipo de órgão, no grupo II, mais de 60% dos tecidos analisados apresentaram marcação positiva na IHQ. Os nossos resultados são compatíveis com Ellis et al. (1999) que verificaram que em 131 tecidos analisados 54 foram positivos no teste de IHQ dentre

os quais, 27 apresentavam lesões histopatológicas características da síndrome como redução nos números de linfócitos e infiltração de histiócitos.

Nas 201 amostras analisadas, a aplicação da IHQ permitiu demonstrar a presença do antígeno viral regularmente distribuído no citoplasma de histiócitos, em células gigantes multinucleadas e, eventualmente na periferia dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Figura 2). A presença de corpúsculos de inclusão ou formações arredondadas de coloração basofílica encontrada em macrófagos e células gigantes multinucleadas de animais infectados pelo CVS2 são corroboradas pelos achados de Magar et al. (2000), em ensaios com suínos infectados experimentalmente com CVS2. Segalés et al. (2005) também citaram a presença dos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, em animais com SMDS, associada presença do CVS2. Huang et al. (2008) demonstraram os corpúsculos de inclusão no citoplasma de células epiteliais dos túbulos renais e evidenciaram a presença do CVS2 tanto pela IHQ como por estudos ultra-estruturais.

Os resultados dos testes histológicos (HE) do grupo II foram confrontados com os resultados dos testes de IHQ (Tabela 1). O objetivo foi associar a presença de antígenos do CVS2 às lesões histopatológicas, uma vez que a literatura corrente sustenta a localização de antígenos virais do CVS2 em linfonodos, mesmo nas infecções subclínicas (ELLIS et al., 1999). Essa correlação foi evidenciada efetivamente em 86,11% dos linfonodos analisados que apresentaram intensa marcação pela IHQ, embora os fragmentos de outros tecidos também tenham apresentado antígenos do CVS2 em menor percentual. Essa possível correlação fora anteriormente citada por Rosell et al. (1999) e Calsamiglia et al. (2002) nas técnicas de IHQ e hibridização *in situ* (HIS), respectivamente. O estágio de replicação e o tropismo viral contribuem para a intensidade da marcação pela IHQ, pois

durante uma infecção ativa, a replicação viral é acompanhada pelo aumento da produção de proteínas virais nas células-alvo, no caso, os tecidos linfóides, facilitando a detecção pela IHQ (SEGALÉS et al., 2005).

Nos pulmões, a localização depende do grau da lesão. Em casos severos da SMDS foi observado proteínas virais tanto no citoplasma de macrófagos como nas células alveolares, bronquiais e no epitélio bronquial. Esporadicamente, no epitélio tubular e nas células endoteliais dos rins (HUANG et al., 2008).

Em nossas condições de trabalho, os linfonodos apresentaram a maior frequência de marcações classificadas como forte no teste de IHQ, o que nos permite concluir que esse tecido poderia ser usado como amostra de eleição para a demonstração do CVS2. Além disso, os linfonodos são órgãos de fácil identificação, especialmente, o linfonodo inguinal que geralmente se apresenta com elevação do volume na maioria dos casos da SMDS, o que facilita a visualização e o processo de colheita. Tornam-se imprescindíveis considerar os exames clínicos completos, coletivos e individuais, assim como a seleção cuidadosa dos animais que serão submetidos à necropsia para coleta de amostras. Se essa conduta for inviável, a disponibilidade de tecidos linfóides, em particular os linfonodos, permitirá a avaliação de lesões pela histopatologia e a detecção de antígenos virais pela IHQ.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Jorge Caetano, ex-Diretor do Programa de Saúde Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária, pelo apoio a realização dos trabalhos sobre *circovirus* suíno; ao Dr. Massami Nakajima do Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO - MG e pela leitura crítica deste manuscrito.

Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento,

MAPA e a Universidade Federal de Minas Gerais.

Referências

- ALLAN, G. M; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p.1-14, 2000.
- ALLAN, G.M. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic. Investigation**, v.10, p. 3–10, 1998.
- BARBOSA, C. N.; FREITAS, T. R. P. Implementação da técnica de imunohistoquímica (IHQ) para o diagnóstico do *circovirus* suíno tipo-2 (CVS-2). **Revista Ciências. Médicas e. Biológicas**, v.7, n.3, p. 211-219, 2008.
- BARBOSA, C. N. et al. Perfil sorológico para *circovirus* suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, p. 815-820, 2008.
- BOENISCH, T. **Immunohistochemical Staining Methods Handbook**. 3rd. ed. California: Dako Corporation, 2001. 67p.
- CALSAMIGLIA, M. et al. 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**, v. 40, p. 1848-1850, 2002.
- CINO-OZUNA, A. G. et al. Characterization of a new disease syndrome associated with porcine circovirus type 2 in previously vaccinated herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 2012–2016, 2011.
- ELLIS, J. A. et al. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virology Methods**, v.80, p. 123–128, 1999.
- ELLIS J.A; HASSARD, L.; CLARK, E; HARDING J; ALLAN G; WILLSON P; STROKAPPE J; MARTIN K; MCNEILLY F; MEEHAN B; TODD D; HAINES D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, p. 44-51, 1998.
- GAUVREAU, H. Porcine circovirus update. **Advances in Pork Production**, v. 12, p. 31-34, 2001.
- GUO, L. J. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. **Virology Journal**, 2010, doi:10.1186/1743-422X-7-273.
- HARDING, J.C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiological**, v.98, p.131-135, 2004.
- HUANG, Y. Y. et al. Porcine circovirus 2 inclusion bodies in pulmonary and renal epithelial cells. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 640-644, 2008.
- MAGAR, R. et al. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned Pigs: a sequential study. **Journal of Comparative Pathology**, v.123, n.4, p 258-269, 2000.
- MCNEILLY, F. et al. Comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine *circovirus* in formalin-fixed tissues from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Virology Methods**, v.80, p. 123-128, 1999.
- KIM, J. et al. Association of porcine *circovirus* 2 with porcine respiratory disease com
- KRAKOWKA, S. et al. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). **Veterinary Pathology**, v. 3, p. 31-42, 2001.
- ROVIRA, A. et al. Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3232-3239, 2002.
- ROSELL, C. et al. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.120, p.59-78, 1999.
- SEGALÉS, J. et al. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research and review**, v.6, p.119-142, 2005.
- SEGALÉS, J.; MATEU, E. Immunosuppression as a feature of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Journal**, v. 171, p. 396-397, 2006.
- TISCHER, I. et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, p. 64-66, 1982.