

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Imuno-histoquímica e análise filogenética de *Pneumocystis* sp. e detecção  
imuno-histoquímica de circovírus suíno tipo 2 em pulmões de javalis (*Sus scrofa*)**

MAURO RIEGERT BORBA

PORTO ALEGRE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Imuno-histoquímica e análise filogenética de *Pneumocystis* sp. e detecção  
imuno-histoquímica de circovírus suíno tipo 2 em pulmões de javalis (*Sus scrofa*)**

MAURO RIEGERT BORBA

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção de grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias, na área de concentração de  
Microbiologia e Doenças Microbianas dos  
Animais, na Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul.

Orientador: Laerte Ferreira

Co-orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE

2009



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a Faculdade de Veterinária e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias por minha formação profissional.

Agradeço a minha família (pai, mãe, Fer e Jú) pelo carinho, apoio e incentivo para que nunca desistisse de meus objetivos, por mais distantes que eles fossem.

Agradeço às famílias Riegert e Borba, pois também fazem parte desta trajetória.

Aos Professores Laerte Ferreira e David Driemeier pela oportunidade, respeito e interesse na realização deste projeto de pesquisa.

À Edna Sanches e Edson Moleta pela amizade e disposição em sempre me ajudar.

Ao Professor Jacques Guillot e equipe da École Nationale Vétérinaire d'Alfort pelo auxílio na realização das análises moleculares e filogenéticas.

Ao Professor Luis Gustavo Corbellini pelo auxílio na realização do mapa de distribuição espacial das propriedades.

À Ângela e Marília pela amizade, atenção, carinho e disposição em sempre me ajudar.

Aos amigos André Corrêa (Dé), André Dalto (Uruguaio), Djeison Raymundo (DJ), Fábio Guagnini (Vacaria), Juliano Leal (Ogro), Luis Gustavo Corbellini (Titi) e Paulo Bandarra (Paulinho) pela amizade dentro e fora do laboratório.

A todos os amigos e colegas com quem convivi ao longo desses cinco anos no Setor de Patologia Veterinária - UFRGS.

A todos meus amigos. Junto com a família são os bens mais valiosos que se pode ter na vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
<b>2.1 Pneumocistose</b> .....	11
2.1.1 Histórico .....	12
2.1.2 Epidemiologia .....	13
2.1.3 Patogênese.....	15
2.1.4 Sinais clínicos e achados patológicos.....	16
2.1.5 Métodos diagnósticos.....	17
2.1.6 Prevenção e controle .....	18
<b>2.2 Circovírus suíno tipo 2</b> .....	19
2.2.1 Histórico .....	19
2.2.2 Epidemiologia .....	20
2.2.3 Patogênese.....	22
2.2.4 Sinais clínicos e achados patológicos.....	23
2.2.5 Métodos diagnósticos.....	24
2.2.6 Prevenção e controle .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>3.1 Procedimentos gerais</b> .....	26
<b>3.2 Imuno-histoquímica</b> .....	26
<b>3.3 Extração de DNA e amplificação por PCR</b> .....	27
<b>3.4 Análise filogenética</b> .....	28
<b>4. RESULTADOS</b> .....	29
<b>4.1 Dados gerais</b> .....	29
<b>4.2 Imuno-histoquímica</b> .....	31
<b>4.3 Amplificação por PCR</b> .....	35
<b>4.4 Análise filogenética</b> .....	36
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	43
<b>ANEXOS</b> .....	53

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Resultados da IHQ anti-*Pneumocystis* e anti-PCV2 em 78 javalis analisados. .... 33

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo evolutivo de <i>Pneumocystis</i> sp. ....	15
<b>Figura 2</b> - Mapa do Estado do Rio Grande do Sul demonstrando a distribuição das propriedades onde foram realizadas as coletas de material de javalis. ....	30
<b>Figura 3</b> - Imuno-histoquímica anti- <i>Pneumocystis</i> sp. com marcação positiva em pulmão de javali (obj. 20). ....	31
<b>Figura 4</b> - Imuno-histoquímica anti- <i>Pneumocystis</i> sp. com marcação positiva de ascos de <i>Pneumocystis</i> sp. em pulmão de javali (obj. 40). ....	32
<b>Figura 5</b> - Imuno-histoquímica anti-PCV2 com marcação positiva nos centros foliculares de linfonodo mesentérico de javali (obj. 20). ....	32
<b>Figura 6</b> - Imuno-histoquímica anti-PCV2 com marcação positiva em pulmão de javali (obj. 40). ....	33
<b>Figura 7</b> - <i>Nested</i> -PCR em amostras de tecido pulmonar de javalis. <b>A.</b> Amostras amplificadas para o gene mtLSU rRNA de <i>Pneumocystis</i> sp. <b>B.</b> Amostras amplificadas para o gene mtSSU rRNA de <i>Pneumocystis</i> sp. ....	35
<b>Figura 8</b> - Árvore filogenética obtida por análise de parcimônia a partir de gene mtLSU rRNA de <i>Pneumocystis</i> sp. PP e PN: amostras de suínos domésticos. P e POA: amostras de suínos provenientes da região de Porto Alegre/RS. C e CBA: amostras de suínos provenientes da região de Cuiabá/MT. J: amostras de javalis. ....	37
<b>Figura 9</b> - Árvore filogenética obtida por análise de parcimônia a partir de gene mtSSU rRNA de <i>Pneumocystis</i> sp. PP e PN: amostras de suínos domésticos. P e POA: amostras de suínos provenientes da região de Porto Alegre/RS. C e CBA: amostras de suínos provenientes da região de Cuiabá/MT. J: amostras de javalis. ....	38

## RESUMO

*Pneumocystis* é um importante patógeno oportunista que pode causar um quadro de pneumonia intersticial fatal em animais infectados por alguma doença imunodepressora. *Pneumocystis* sp. tem sido identificado em suínos domésticos e selvagens coinfectedos com o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) que desenvolvem a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS). O presente trabalho analisou 78 javalis (*Sus scrofa*) com histórico de SMDS procedentes de 6 diferentes propriedades com sistema de confinamento intensivo no Rio Grande do Sul no período de março de 2006 a junho de 2008. Amostras de tecido pulmonar de seis javalis que não desenvolveram clinicamente a SMDS, assim como, amostras de suínos procedentes de abatedouros dos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso foram incluídas nas análises molecular e filogenética do trabalho. O teste de imunohistoquímica (IHQ) para a detecção de *Pneumocystis* sp. foi positivo em 50% dos pulmões analisados. A IHQ para a detecção de PCV2 foi positiva em 37% dos animais, sendo que o linfonodo mesentérico foi o órgão que apresentou maior grau de marcação positiva. Coinfecção entre *Pneumocystis* sp. e PCV2 foi confirmada pela IHQ em 20,5% dos javalis. O teste de *nested*-PCR dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA identificou a presença de material genético de *Pneumocystis* sp. em pulmões de javalis que desenvolveram a SMDS e em pulmões de javalis que não apresentaram clinicamente a doença, sugerindo que somente a presença de *Pneumocystis* sp. não se caracteriza como causa suficiente para o desenvolvimento de pneumonia intersticial. Identificou-se pela análise filogenética que javalis e suínos no Brasil são afetados pela mesma espécie de *Pneumocystis* sp. e que esta subdivide-se em dois grupos distintos.

**Palavras-chave:** *Pneumocystis* sp., PCV2, javalis, imuno-histoquímica, reação em cadeia da polimerase, filogenia.



## ***ABSTRACT***

*Pneumocystis* is an important opportunistic pathogen that may cause lethal interstitial pneumonia in infected animals due to some immunosuppressive disease. *Pneumocystis* sp. has been found in domestic and feral swine co infected with porcine circovirus type 2 (PCV2) that developed the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). This study analyzed 78 wild boars (*Sus scrofa*) with PMWS background from 6 different farms with intensive confinement system in Rio Grande do Sul from March 2006 to June 2008. The lung tissue samples of six wild boars that did not develop PMWS, as well as the swine samples from slaughterhouses in Rio Grande do Sul and Mato Grosso were included in the molecular and phylogenetic analyses of this study. The immunohistochemistry test (IHC) for detection of *Pneumocystis* sp. was positive in 50% of the analyzed lungs. The IHC for PCV2 detection was positive in 37% of the animals and the mesenteric lymph node was the organ with the highest degree of positive staining. Co infection in *Pneumocystis* sp. and PCV2 was confirmed by IHC in 20.5% of wild boars. The nested-PCR test of the mtLSU rRNA and mtSSU rRNA genes identified the presence of genetic material of *Pneumocystis* sp. in lungs of wild boars that developed the PWMS and in wild boars that did not presented clinical disease, which may mean that only the presence of *Pneumocystis* sp. was not characterized as sufficient cause to interstitial pneumonia development. Through phylogenetic analysis it has been identified that wild boars and swine in Brazil are affected by the same specie of *Pneumocystis* sp. and its subdivision in two different groups.

**Key words:** *Pneumocystis* sp., PCV2, wild boars, immunohistochemistry, polimerase chain reaction, phylogeny.

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Pneumocystis* corresponde a um grupo heterogêneo de microrganismos já identificado em amostras de tecido pulmonar de diferentes espécies de mamíferos domésticos, selvagens e de laboratório, sendo específico para cada espécie de hospedeiro (GREENE; CHANDLER, 1998; LAAKKONEN, 1998; DEMANCHE *et al.*, 2001; WAKEFIELD, 2002; STRINGER, 2002a; DEMANCHE *et al.*, 2003; DEI-CAS *et al.*, 2006). *Pneumocystis* é considerado um importante patógeno oportunista, podendo causar um quadro de pneumonia intersticial fatal em seres humanos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em animais infectados por alguns agentes imunodepressores (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DYER; SCHAMBER, 1999; DEI-CAS, 2000; STRINGER, 2002a).

Em criações intensivas de suínos, *Pneumocystis* sp. tem sido identificado em animais coinfectados com o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (ELLIS *et al.*, 1998; SANCHES *et al.*, 2006b; SANCHES *et al.*, 2007). Em 11 amostras de pulmões de javalis infectados por PCV2 em propriedades com sistema de confinamento intensivo no Rio Grande do Sul, *Pneumocystis* sp. foi identificado em 6 amostras (SANCHES *et al.*, 2006a). O PCV2 é o agente da síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) que acomete suínos domésticos e selvagens (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006). Coinfecções entre o PCV2 e outros agentes infecciosos tendem a agravar o quadro clínico da SMDS (ELLIS *et al.*, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007) aumento os prejuízos econômicos à suinocultura (KONDO *et al.*, 1993).

Até o presente momento não existem dados disponíveis sobre a real prevalência de *Pneumocystis* sp. em rebanhos comerciais de javalis e sua associação com a infecção por PCV2. Assim como, se desconhece o grau de relação filogenética entre as espécies de *Pneumocystis* presentes em amostras de tecido pulmonar de javalis e de suínos domésticos.

O presente trabalho teve por objetivo diagnosticar *Pneumocystis* sp. através de técnicas de imuno-histoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de javalis com SMDS procedentes de sistemas de confinamento intensivo no Rio Grande do Sul; diagnosticar através da IHQ a ocorrência de PCV2 na mesma população de javalis; verificar a associação entre *Pneumocystis* sp. e infecção por PCV2; e, avaliar a relação filogenética entre as espécies de *Pneumocystis* presentes em javalis e em suínos domésticos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Pneumocistose

A pneumocistose corresponde a uma pneumonia intersticial difusa ou focal causada por diferentes espécies do gênero *Pneumocystis*, um fungo oportunista e de características atípicas, primeiramente denominado *Pneumocystis carinii* (STRINGER, 1996; DEI-CAS, 2000; LEE, 2006). *Pneumocystis* tem distribuição mundial e já foi identificado em amostras pulmonares de diferentes espécies de mamíferos domésticos, selvagens e de laboratório, além de ser um dos principais patógenos presentes em seres humanos infectados com o HIV (GREENE; CHANDLER, 1998; LAAKKONEN, 1998; WAKEFIELD, 2002; STRINGER, 2002a; DEMANCHE *et al.*, 2003; DEI-CAS *et al.*, 2006). *Pneumocystis* corresponde a um grupo heterogêneo de microrganismos que são específicos para cada espécie de hospedeiro. Desta forma, a pneumocistose não se caracteriza por ser uma zoonose (DEMANCHE *et al.*, 2001; WAKEFIELD, 2002; DEI-CAS *et al.*, 2006). A ocorrência da pneumocistose é mais comum em animais infectados por alguma doença imunodepressora. Outros fatores predisponentes, como doenças pulmonares crônicas, transplantes de órgãos e tratamentos quimioterápicos prolongados também podem propiciar o desenvolvimento da pneumocistose (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DYER; SCHAMBER, 1999; DEI-CAS, 2000; STRINGER, 2002a).

Em criações intensivas de suínos domésticos, *Pneumocystis* sp. tem sido identificado em animais coinfectados com o PCV2 (SANCHES *et al.*, 2006b; SANCHES *et al.*, 2007), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) (KONDO *et al.*, 1997), *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis* (KONDO *et al.*, 1993), podendo representar significantes perdas econômicas (KONDO *et al.*, 1993). *Pneumocystis* sp. foi identificado em javalis criados em sistema intensivo no estado do Rio Grande do Sul em propriedades acometidas por surtos de circovirose (SANCHES *et al.*, 2006a).

Com o advento de diferentes métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos que os métodos baseados em colorações convencionais, como o exame de IHQ e a PCR, a detecção de *Pneumocystis* em animais infectados tornou-se mais eficaz (KONDO; HIKITA; KADOTA, 2000; DURAND-JOLY *et al.*, 2005). Estudos baseados na análise das relações filogenéticas têm propiciado a obtenção de informações relevantes sobre a heterogeneidade, especificidade e coevolução das diferentes espécies que compõem o gênero *Pneumocystis* (DEMANCHE *et al.*, 2001; GUILLOT *et al.*, 2004; DEI-CAS *et al.*, 2006).

### 2.1.1 Histórico

*Pneumocystis* foi primeiramente identificado por Carlos Chagas, em 1909, ao observar a presença de corpos císticos multinucleados em pulmões de porcos-da-índia (*Cavia* sp.). No entanto, Chagas erroneamente descreveu tais corpos císticos como sendo uma nova forma do parasito *Trypanossoma cruzi*, propondo uma nova nomenclatura: *Schizotrypanum cruzi* (CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002; REDHEAD *et al.*, 2006). Em 1910, Antonio Carini observou a presença de corpos císticos em pulmões de ratos infectados com *Trypanosoma lewisi*. Contudo, o pesquisador suspeitou que tais estruturas pudessem estar relacionadas a um outro organismo até então desconhecido. Coube aos pesquisadores Delanöe e Delanöe concluir que os corpos císticos não estavam relacionados aos tripanossomas e sim, correspondiam a um novo organismo (DELANÖE; DELANÖE, 1912; STRINGER, 1996; CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002). Eles denominaram-no *Pneumocystis carinii*: “Pneumo” devido ao tropismo pelo tecido pulmonar, “cystis” por causa de sua forma cística característica e, “carinii” em homenagem a Antonio Carini, que havia enviado as amostras para o casal de pesquisadores (DELANÖE; DELANÖE, 1914; CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002).

Em 1938 foi diagnosticado, na Europa, um tipo de pneumonia intersticial de etiologia desconhecida que afetava crianças prematuras e mal nutridas (CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002; SOUZA; BENCHIMOL, 2005). Esta pneumonia espalhou-se na forma de epidemia pela Europa Central durante a Segunda Guerra Mundial. Uma década depois, Vanêk, Jíroveci e Lukes concluíram que *P. carinii* era o agente etiológico de tal pneumonia (CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002).

Em 1981, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos evidenciou um aumento no número de requisições do fármaco Pentamidina para o tratamento de casos de pneumonia por *P. carinii* na cidade de Nova Iorque. Contudo, muitos destes casos não estavam relacionados a pacientes imunodeprimidos. Este fato, aliado a um aumento no número de casos do tumor Sarcoma de Kaposi, é considerado extremamente relevante na descoberta da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e do HIV (SEVERO, 1991; CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002).

Nas duas últimas décadas, *P. carinii* tem recebido atenção especial por parte de muitos pesquisadores, pois é uma das mais frequentes e oportunistas infecções em pacientes com o HIV, podendo inclusive causar a morte por falência pulmonar (SEVERO, 1991; SHINGAL; MIRDHA; GULERIA, 2005). Além disto, atualmente sabe-se que a pneumocistose pode

ocorrer em homens e animais que sofrem de doenças imunodepressoras ou doenças pulmonares crônicas. Assim como, em pacientes submetidos a transplantes de órgãos e tratamento quimioterápico prolongado (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DYER; SCHAMBER, 1999; DEI-CAS, 2000; STRINGER, 2002a).

### 2.1.2 Epidemiologia

A pneumonia por *Pneumocystis* já foi descrita em caninos (FARROW *et al.*, 1972; CANFIELD; CHURCH; MALIK, 1993; LOBETTI; LEISEWITZ; SPENCER, 1996; RAMSEY *et al.*, 1997), caprinos (MACCONNELL; BASSON; PIENAAR, 1971), coelhos (SOULEZ; DEI-CAS; CAMUS, 1988; DEI-CAS *et al.*, 2006), equinos (PETERS *et al.*, 1994; JENSEN; BOYE; BILLE-HANSEN, 2001; MACNEILL *et al.*, 2003), felinos (YUEZHONG; ZENG; BAOPING, 1996), javalis (SANCHES *et al.*, 2006a), ovinos (JÉCNLY, 1973), suínos (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; KONDO *et al.*, 1993; KONDO; HIKITA; KADOTA, 2000; JENSEN; BOYE; BILLE-HANSEN, 2001; SANCHES *et al.*, 2006b; SANCHES, 2006c; SANCHES *et al.*, 2007) e diferentes espécies de roedores (BARTLETT *et al.*, 1988; CHARY-REDDY; GRAVES, 1996; ICENHOUR *et al.*, 2002; CUSHION; KEELY; STRINGER, 2004; KEELY *et al.*, 2004). A ocorrência de *Pneumocystis* em animais selvagens tem sido diagnosticada em animais de zoológicos e colônias de animais selvagens, principalmente primatas, quando adquiridos de seu habitat natural (DEMANCHE *et al.*, 2001; HSUEH *et al.*, 2001; AMIT *et al.*, 2002; DEMANCHE *et al.*, 2003; LAAKKONEN, 1998; GUILLOT *et al.*, 2004).

Devido à dificuldade de se desenvolver o cultivo *in vitro* de *Pneumocystis*, algumas questões a respeito da epidemiologia do agente da pneumocistose, como os modos de transmissão, fontes ambientais, vetores e reservatórios, ainda são pouco conhecidas (CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002).

Primeiramente classificado como sendo um protozoário, atualmente *Pneumocystis* é classificado dentro do reino Fungi, entre as classes *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Eriksson (1994) propõe a classificação do organismo dentro de uma nova família, *Pneumocystidaceae*, e de uma nova ordem, *Pneumocystidales*, dentro da classe *Ascomycota*. A nomenclatura utilizada para classificar as diferentes espécies pertencentes ao gênero *Pneumocystis* ainda hoje é motivo de discussão. Muitos autores têm adotado a seguinte classificação em suas publicações científicas: *Pneumocystis carinii* (presente em ratos), *Pneumocystis wakefieldiae* (variação da forma encontrada em ratos, antigamente denominada *P. ratti*), *Pneumocystis*

*murina* (em camundongos, primeiramente denominada *P. muris*), *Pneumocystis oryctolagi* (em coelhos) e *Pneumocystis jiroveci* (em humanos). Nas outras espécies animais, tanto as domésticas quanto as selvagens, nas quais o fungo está presente torna-se conveniente utilizar a denominação *Pneumocystis* sp. (CUSHION, 1998; STRINGER, 2002b; WAKEFIELD, 2002; REDHEAD *et al.*, 2006).

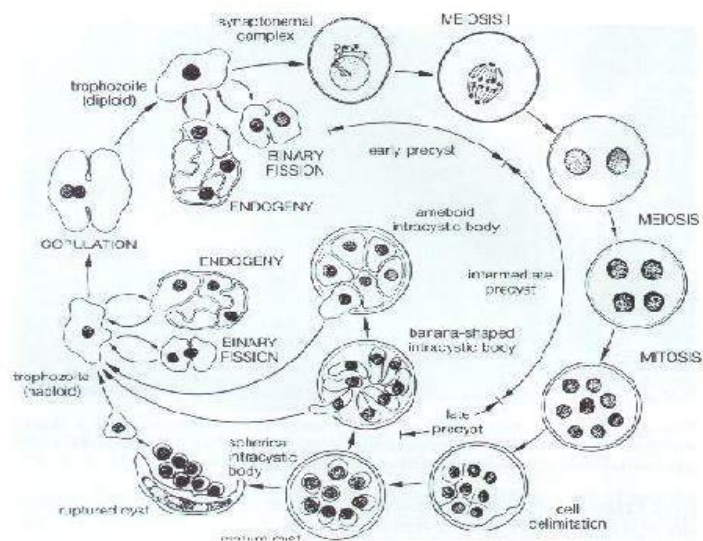
Apesar do *Pneumocystis* encontrado em humanos e em animais serem morfologicamente indistinguíveis, análises moleculares indicam que os organismos são específicos para cada espécie hospedeira (DEMANCHE *et al.*, 2003), eliminando assim, a possibilidade de transmissão entre espécies e a ocorrência de uma zoonose (DEI-CAS, 2000).

A teoria de uma re-infecção por novas formas infectantes de *Pneumocystis* tem sido mais aceita por parte dos pesquisadores do que a teoria da reativação de uma antiga infecção causada pelo agente da pneumocistose (DUMOULIN *et al.*, 2000; WAKEFIELD, 2002).

A prevalência e a transmissão do agente podem diferir entre áreas geográficas dependendo da infectividade e patogenicidade de cada espécie, assim como, seu crescimento e reprodução são favorecidos pela presença de umidade e temperatura ambiental mais adequadas (LAAKKONEN, 1998).

*Pneumocystis* caracteriza-se por ser altamente estável no meio ambiente, suportando o calor, o frio, a luz, a obscuridade e diferentes taxas de umidade (SEVERO, 1991). Entretanto, a ocorrência de fatores predisponentes, como doenças imunodepressoras, doenças pulmonares crônicas, transplantes de órgãos e tratamentos quimioterápicos prolongados são necessários para o desenvolvimento da pneumocistose (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DYER; SCHAMBER, 1999; DEI-CAS, 2000; STRINGER, 2002a).

O provável ciclo evolutivo de *Pneumocystis* é composto por células leveduriformes (fase assexuada do ciclo de vida), ascos (fase sexuada do ciclo de vida) e esporos (CUSHION *et al.*, 1997; CUSHION, 1998; SANCHES, 2006c). Os ascos sobrevivem no ambiente, podendo ser transmitidos por via aérea e ao alcançarem os alvéolos pulmonares rompem-se liberando oito esporos haplóides. Destes originam-se os esporos diplóides, que se aderem à parede de pneumócitos tipo I e diferenciam-se em pré-ascos. Estes sofrem duas meioses, originando quatro núcleos haplóides. Os pré-ascos desenvolvem-se em ascos após sofrerem espessamento das paredes e mitoses, resultando na formação de oito esporos haplóides individualizados. Quando os ascos se rompem, liberam os esporos haplóides, que se conjugam formando esporos diplóides, reiniciando o ciclo. Os detalhes da dinâmica das meioses, mitoses e conjugação ainda não são bem conhecidos (CUSHION *et al.*, 1997; CUSHION, 1998; SOUZA; BENCHIMOL, 2005; SANCHES, 2006c).



**Figura 1** - Ciclo evolutivo de *Pneumocystis* sp. Fonte: HOPKIN, 1991.

### 2.1.3 Patogênese

Após a inalação de *Pneumocystis* e a ausência de controle por parte dos macrófagos alveolares, os microrganismos aderem-se aos pneumócitos tipo I (células responsáveis pela intervenção nas trocas gasosas entre os alvéolos e os capilares pulmonares) através da ligação de lecitinas presentes na parede do fungo aos receptores de manose e frutose das células hospedeiras. A presença de fibronectina e vitronectina, também secretadas pelas células do hospedeiro auxiliam na fixação do *Pneumocystis* (SEVERO, 1991; RENSBURG, 2004). A degeneração de pneumócitos tipo I é acompanhada por um aumento da permeabilidade da membrana capilar alveolar, resultando na produção de um exsudato de coloração eosinofílica, composto por fibrina e proteínas séricas. Os pneumócitos tipo I são substituídos por pneumócitos tipo II (responsáveis pela síntese, secreção e renovação da substância surfactante, assim como, apresentam a capacidade de se diferenciar e se multiplicar em pneumócitos tipo I em caso de lesão parenquimatosa de origem inflamatória ou infecciosa). Estas mudanças, juntamente com a multiplicação dos microrganismos, levam a um preenchimento dos espaços aéreos alveolares, distúrbios nas trocas gasosas e pode causar a morte do hospedeiro (SEVERO, 1991; GREENE; CHANDLER, 1998; JONES; HUNT; KING, 2000; RENSBURG, 2004).

A resposta inflamatória intersticial desencadeada pela multiplicação de *Pneumocystis* é consistida principalmente de histiócitos, linfócitos e células plasmáticas. Os macrófagos alveolares ligam-se ao fungo através de um mecanismo receptor-ligante, resultando em uma rápida destruição dos microrganismos fagocitados. Anticorpos específicos (IgG e IgA) funcionam, provavelmente, como opsoninas, aumentando a capacidade de fagocitose dos macrófagos. O desenvolvimento de uma resposta imune adequada (principalmente através de macrófagos alveolares e linfócitos T CD4) permite que o organismo do hospedeiro elimine a infecção, embora, a remoção completa do exsudato alveolar e restos celulares pode levar até oito semanas (SEVERO, 1991; GREENE; CHANDLER, 1998; RENSBURG, 2004).

#### 2.1.4 Sinais clínicos e achados patológicos

A pneumocistose em animais é similar àquela encontrada em seres humanos, com início insidioso, tosse não produtiva, taquipnéia, dispnéia e taquicardia. Também pode haver um pequeno aumento de temperatura corporal, leucocitose e moderada eosinofilia (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; RENSBURG, 2004).

Ao exame de necropsia observam-se os pulmões aumentados, consolidados e com consistência elástica. À superfície de corte estes apresentam aspecto seco. Hidrotórax, pneumotórax, edema e enfisema pulmonar também podem estar presentes (KONDO *et al.*, 1993; JONES; HUNT; KING, 2000; RENSBURG, 2004).

Histologicamente observa-se uma pneumonia intersticial difusa ou focal, com a presença de um exsudato de coloração eosinofílica preenchendo os espaços aéreos alveolares, acompanhada por hipertrofia de septos alveolares, descamação das células epiteliais e presença de macrófagos, linfócitos e, ocasionalmente, neutrófilos (KONDO *et al.*, 1993; GREENE; CHANDLER, 1998; RENSBURG, 2004).

A presença de lesões extrapulmonares por *Pneumocystis* é bastante rara, já tendo sido relatada no baço, fígado, linfonodos, medula óssea e timo de humanos (SEVERO, 1991). Em ratos de laboratório imunodeprimidos já foi detectada a presença de material genético de *Pneumocystis* no sangue e em órgãos como a adrenal, baço, coração, fígado, linfonodo, medula óssea, rim e tireóide (CHARY-REDDY; GRAVES, 1996).



### 2.1.5 Métodos diagnósticos

O diagnóstico definitivo de pneumocistose somente pode ser feito através da identificação morfológica de *Pneumocystis* ou da detecção de seu material genético em tecido pulmonar ou lavado broncopulmonar de animais infectados. O diagnóstico baseado somente no exame clínico é considerado inespecífico, uma vez que os sintomas desenvolvidos na pneumocistose podem estar presentes em outras doenças e, além disto, normalmente os animais abrigam concomitantemente outras infecções (RENSBURG, 2004).

Diferentes métodos diagnósticos têm sido empregados na detecção de *Pneumocystis*, uma vez que ainda não existe um meio de cultivo *in vitro* eficaz para a sua detecção. Dentre as principais técnicas utilizadas estão as colorações convencionais, exame de imunofluorescência, exame imunohistoquímico e técnicas moleculares (WAKEFIELD, 2002).

As técnicas de coloração convencional (Azul de Toluidina, Giemsa e Grocott) e o exame de imunofluorescência são utilizados para a visualização de ascos e células leveduriformes de *Pneumocystis*. A coloração de Grocott é um método largamente utilizado na identificação de organismos fúngicos, sendo utilizado para se diferenciar *Pneumocystis* de outros fungos, como *Candida* spp. e *Histoplasma capsulatum* (SEVERO, 1991; PROPHET *et al.*, 1992; WAKEFIELD, 2002).

A IHQ para detecção de *Pneumocystis* através de anticorpos monoclonais é uma técnica mais sensível e específica que os métodos diagnósticos baseados em colorações convencionais (KONDO; HIKITA; KADOTA, 2000).

Exames moleculares que apresentam alta sensibilidade e especificidade, como a PCR, baseados na amplificação de regiões específicas do genoma de *Pneumocystis* têm sido amplamente utilizados. No caso de *Pneumocystis* os genes mais utilizados para a amplificação são: *mitochondrial large subunit rRNA* (mtLSU rRNA), *mitochondrial small subunit rRNA* (mtSSU rRNA), *dihydropteroate synthetase* (DHPS), *internal transcribed spacer* (ITS1 e ITS2) e *thymidylate syntase* (TS) (CHARY-REDDY; GRAVES, 1996; CALIENDO *et al.*, 1998; SING *et al.*, 2000; DEMANCHE *et al.*, 2001; HSUEH *et al.*, 2001; AMIT *et al.*, 2002; WAKEFIELD, 2002; BEARD *et al.*, 2004; GUILLOT *et al.*, 2004; DURAND-JOLY *et al.*, 2005; DEI-CAS *et al.*, 2006).

Com o advento da PCR e análise filogenética, informações sobre a heterogeneidade, especificidade e coevolução das diferentes espécies que compõem o gênero *Pneumocystis* têm sido obtidas (DEMANCHE *et al.*, 2001; GUILLOT *et al.*, 2004; DEI-CAS *et al.*, 2006).

### 2.1.6 Prevenção e controle

A ausência de conhecimentos epidemiológicos básicos sobre *Pneumocystis* dificulta a aplicação de métodos de prevenção e controle eficazes. Por se tratar de uma doença de caráter oportunista, na maioria das vezes a prevenção da doença primária que cause imunodepressão, e conseqüentemente o desenvolvimento da pneumocistose, é mais importante. O tratamento eficaz da pneumocistose deve ser feito concomitantemente com o tratamento da doença primária que possibilitou a infecção por *Pneumocystis* (GREENE; CHANDLER, 1998; RENSBURG, 2004).

Após a detecção da presença do *Pneumocystis*, acompanhado de alguma outra doença, em um ambiente onde os animais estejam alojados (laboratórios, propriedades de criação animal, hospitais veterinários, zoológicos ou colônias de animais selvagens), torna-se indispensável a separação entre os indivíduos infectados e os sadios. A retirada de todos os animais do ambiente no qual estavam alojados também pode ser utilizada como uma medida de controle, embora não haja informações definitivas sobre a resistência e o tempo de permanência do microrganismo no ambiente (GREENE; CHANDLER, 1998; RENSBURG, 2004). A inexistência de um meio de cultivo *in vitro* adequado para o crescimento do *Pneumocystis* torna a realização de estudos a partir de modelos animais experimentais fundamental para o entendimento sobre os aspectos biológicos do agente, seu provável ciclo de vida, interações fisiológicas e patológicas com o hospedeiro, e desenvolvimento *in vivo* de fármacos anti-*Pneumocystis* (DEI-CAS, 2000; CALDERÓN-SANDUBETE *et al.*, 2002; SOUZA; BENCHIMOL, 2005; LEE, 2006).

Dentre os modelos animais mais estudados, destacam-se aqueles que utilizam roedores (ratos, camundongos e coelhos) (BARTLETT *et al.*, 1988; SOULEZ; DEI-CAS; CAMUS, 1988) e primatas não-humanos (DEMANCHE *et al.*, 2003). Os modelos animais experimentais que envolvem primatas não-humanos são de grande utilidade científica, uma vez que foi relatada através do estudo do gene *dihydropteroate synthetase* uma grande semelhança genotípica entre o *Pneumocystis* presente em primatas não-humanos e seres humanos (STRINGER, 1996). Também foi observado em estudos experimentais envolvendo macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) e macacos-caranguejeiros (*Macaca fascicularis*) infectados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV) que os animais desenvolveram defeitos imunitários e infecções oportunistas (entre elas a pneumocistose) muito semelhantes a seres humanos infectados com o HIV (DEMANCHE *et al.*, 2001).

## 2.2 Circovírus suíno tipo 2

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é o agente da síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS), uma síndrome de importante repercussão econômica que afeta suínos domésticos e selvagens (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006). O PCV2 apresenta distribuição mundial, estando presente em granjas de suínos com diferentes padrões sanitários (CHAE, 2004; CHAE, 2005; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). Identificada pela primeira vez no Brasil no ano 2000 (CIACCI ZANELLA *et al.*, 2005), surtos relacionados à circovirose em granjas de suínos domésticos em diferentes estados brasileiros têm causado importantes perdas econômicas nos últimos anos (PESCADOR *et al.*, 2003; FRANÇA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006b). A circovirose em javalis foi identificada tanto em animais de vida livre quanto em animais criados em sistemas intensivos (ELLIS *et al.*, 2003; SEGALÉS *et al.*, 2003; VICENTE *et al.*, 2004). Surtos relacionados à doença no Rio Grande do Sul têm sido descritos em javalis alojados em sistemas de confinamento intensivo desde o ano de 2005 (CORRÊA *et al.*, 2006a).

A circovirose é considerada uma doença multifatorial, na qual o PCV2 é a causa necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento das diferentes formas de apresentação clínica da doença (ELLIS *et al.*, 2004). Coinfecções entre o PCV2 e outros agentes infecciosos, tais como vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), parvovírus suíno (PPV), vírus da influenza suína (IVS), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Candida* spp. e *Pneumocystis* sp. tendem a agravar o quadro clínico da circovirose (KIM *et al.*, 2001; KIM; CHUNG; CHAE, 2003; ALLAN *et al.*, 2004; ELLIS *et al.*, 2004; SANCHES *et al.*, 2006b; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). A adoção de medidas de prevenção e controle que buscam reduzir ou eliminar coinfecções torna-se importante para reduzir as perdas relacionadas à circovirose (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

### 2.2.1 Histórico

A circovirose foi relatada pela primeira vez em 1991 em granjas de suínos domésticos com elevado padrão sanitário no Oeste do Canadá, onde os animais infectados desenvolveram clinicamente a SMDS (MORI *et al.*, 2000). Desde então, a circovirose tem sido identificada em países da América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa (CHAE, 2004; CHAE, 2005;

OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Amostras de órgãos e soro de suínos procedentes de diversos países arquivadas desde 1970 revelaram que o PCV2 estava presente em populações suínas antes do aparecimento de casos clínicos relacionados ao vírus (MORI *et al.*, 2000; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). No Brasil, a circovirose foi identificada pela primeira vez no ano 2000, porém o vírus foi detectado em material biológico de suínos que apresentaram lesões compatíveis com circovirose desde o ano de 1988 (CIACCI ZANELLA *et al.*, 2005). No Rio Grande do Sul, assim como em outros estados brasileiros onde a suinocultura é uma importante atividade sócio-econômica, surtos relacionados à circovirose em granjas de suínos domésticos têm causado importantes perdas econômicas nos últimos anos (PESCADOR *et al.*, 2003; FRANÇA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006b).

O PCV2 em javalis foi identificado tanto em animais de vida livre quanto em animais criados em sistemas intensivos (ELLIS *et al.*, 2003; SEGALÉS *et al.*, 2003; VICENTE *et al.*, 2004). Descrições de animais acometidos pela doença ocorreram na Alemanha (SCHULZE *et al.*, 2003; KNELL *et al.*, 2005), Brasil (BARBOSA *et al.*, 2005; CIACCI ZANELLA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006a), Canadá (ELLIS *et al.*, 2003), Croácia (LIPEJ *et al.*, 2006), Eslovênia (TOPLAK *et al.*, 2004), Espanha (SEGALÉS *et al.*, 2003) e Hungria (CSÁGOLA *et al.*, 2006).

### 2.2.2 Epidemiologia

A circovirose é uma doença infecciosa causada pelo PCV2 que afeta suínos domésticos e selvagens (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006). Apresenta distribuição mundial, estando presente em granjas de suínos com diferentes padrões sanitários em todos os continentes com exceção da Oceania (CHAE, 2004; CHAE, 2005; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007), onde já foi identificada a presença de PCV1 e PCV2 em populações suínas, mas não há relato da ocorrência de doença clínica (MUHLING *et al.*, 2006). A circovirose acomete principalmente leitões com idade entre 5 e 12 semanas, embora já tenha sido descrita em leitões de 1 a 6 meses. A taxa de morbidade pode variar de 70-80% e a mortalidade de 4-30% dependendo da granja, fase em que a doença acontece e o manejo empregado no sistema de criação (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). O PCV2 pode ser transmitido a partir de animais infectados de forma vertical e horizontal, sendo que esta ocorre através do contato direto com secreções respiratórias (forma mais freqüente de transmissão) e orais, urina e fezes (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

Material genético de PCV2 já foi identificado no sêmen de machos infectados, embora não haja comprovação científica se o vírus pode ser transmitido através de sêmen contaminado (LAROCHELLE *et al.*, 2000). Instalações, fômites e pessoal contaminado podem ser importantes fontes de transmissão. O circovírus é muito resistente às condições ambientais e aos desinfetantes (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

A circovirose é considerada uma doença multifatorial, na qual o PCV2 é a causa necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento das diferentes formas de apresentação clínica da doença (ELLIS *et al.*, 2004). Nem todos os animais infectados com o PCV2 desenvolvem clinicamente a doença (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Os fatores determinantes para o desenvolvimento da circovirose estão relacionados ao vírus, o hospedeiro, as coinfeções e a modulação do sistema imune (KIM; CHUNG; CHAE, 2003; ELLIS *et al.*, 2004; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Fatores ambientais e de manejo como densidade elevada, variações térmicas acentuadas, baixa qualidade do ar, misturas de leitões com idades e leitegadas diferentes podem exacerbar os sinais clínicos e a gravidade da doença (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

Coinfeções entre o PCV2 e outros agentes infecciosos tendem a agravar o quadro clínico da circovirose (ELLIS *et al.*, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). Dentre os principais agentes identificados em coinfeções com o PCV2 estão: vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína, parvovírus suíno, vírus da influenza suína, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus parasuis* (KIM *et al.*, 2001; KIM; CHUNG; CHAE, 2003; ALLAN *et al.*, 2004; ELLIS *et al.*, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). Lesões por *Candida* spp. foram relatadas em suínos domésticos e javalis infectados pelo PCV2 no Rio Grande do Sul (ZLOTOWSKI *et al.*, 2006; CORRÊA *et al.*, 2006a).

Infecção pulmonar por *Pneumocystis* sp. foi identificada em 5% dos casos iniciais de SMDS em suínos no Canadá (ELLIS *et al.*, 1998) e em 19% dos casos em um estudo no Japão (SATO *et al.*, 2000). Em estudo realizado com amostras de pulmões, com lesão macroscópica, de suínos procedentes de abatedouros dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso a coinfeção entre o PCV2 e *Pneumocystis* sp. foi de 28% (SANCHES *et al.*, 2006b). Em 11 amostras de pulmões de javalis infectados por PCV2 em propriedades com sistema de confinamento intensivo no Rio Grande do Sul, *Pneumocystis* sp. foi identificado em 6 amostras (54,5%) (SANCHES *et al.*, 2006a).

Estudos de soroprevalência realizados no Brasil e em diferentes países indicam que anticorpos para o PCV2 estão presentes na maioria dos rebanhos de suínos domésticos (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). Estudo epidemiológico realizado com 1322 amostras de soro de javalis procedentes de criatórios de seis diferentes estados brasileiros (Goiás, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) revelou uma prevalência de 84,9% de anticorpos para o PCV2, sendo que em todas as propriedades amostradas foram identificados animais soropositivos, permitindo-se concluir que a infecção por PCV2 em javalis é endêmica no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2005). Knell *et al.* em um estudo das relações filogenéticas entre amostras de PCV2 de javalis e de suínos domésticos identificaram uma alta homologia (95,5 - 97,8%) entre as amostras de PCV2 presentes em javalis na Alemanha e àquelas presentes em suínos domésticos na China (KNELL *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Patogênese

O PCV2 pode ser encontrado principalmente no citoplasma de histiócitos, células gigantes multinucleadas e outras células mononucleares, tais como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas foliculares de tecidos linfóides (DARWICH; SEGALÉS; MATEU, 2004). Esporadicamente o vírus pode ser detectado no citoplasma de células renais, pancreáticas, do epitélio respiratório, do endotélio vascular e de linfócitos, assim como, no núcleo de monócitos, macrófagos, células musculares, hepatócitos e enterócitos (DARWICH; SEGALÉS; MATEU, 2004).

A replicação inicial do PCV2 provavelmente acontece em macrófagos e células apresentadoras de antígenos de tecidos linfóides, tais como a tonsila e linfonodos regionais, ou alternativamente nas placas de Peyer no intestino (ROSELL *et al.*, 1999). Embora o mecanismo pelo qual a infiltração de histiócitos em tecidos, principalmente em linfonodos, não seja bem conhecido, estudos apontam que se trata de um evento inicial na infecção por PCV2 e coincide com a ocorrência macroscópica de linfadenopatia (ROSELL *et al.*, 1999). Casos mais crônicos tendem a apresentar uma depleção linfóide menos severa associada a um menor infiltrado de histiócitos e células gigantes multinucleadas (QUINTANA *et al.*, 2001). A infecção por PCV2 cursa com a redução ou perda de linfócitos B e T, aumento no número de macrófagos e perda parcial com re-distribuição parcial das células apresentadoras de antígenos no tecido linfóide. Essas alterações sugerem efeito imunodepressivo da circovirose nos leitões infectados (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

#### 2.2.4 Sinais clínicos e achados patológicos

Os sinais clínicos e as lesões causadas pelo PCV2 diferem de acordo com as diferentes formas de apresentação clínica da doença e pela presença de coinfeções (ELLIS *et al.*, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). A infecção pelo PCV2 pode se manifestar na forma de síndrome multissistêmica do definhamento, síndrome da dermatite e nefropatia suína, doença respiratória, enterite, falhas reprodutivas e infecção subclínica (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; CHAE, 2005; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Atualmente, as formas de apresentação da circovirose têm sido denominadas de doenças associadas ao PCV2 ou PCVAD (do termo em inglês *Porcine circovirus type 2 - associated diseases*) (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). A síndrome multissistêmica do definhamento é a forma mais importante e freqüente de apresentação da circovirose (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Nesta síndrome, o sinal clínico mais comumente observado é o emagrecimento rápido e progressivo dos animais doentes (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). Apatia, anorexia, dispnéia, palidez e icterícia da pele e mucosas, sinais de pneumonia, diarreia e caquexia também podem ser observados em rebanhos afetados pelo PCV2 (CHAE, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). A infecção subclínica pode se manifestar na forma de desempenho insuficiente de leitões infectados (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

As principais lesões macroscópicas incluem a hipertrofia de linfonodos (inguinais, mediastínicos, mesentéricos e submandibulares), hipotrofia do timo e pulmão não-colapsado (ROSELL *et al.*, 1999; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

As lesões microscópicas características da síndrome multissistêmica do definhamento incluem a presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário ou granulomatoso em órgãos linfóides (baço, linfonodo, placas de Peyer, timo, tonsila), pulmão, rins, fígado e coração (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Corpúsculos de inclusão viral de PCV2 podem estar presentes no citoplasma de histiócitos, células gigantes multinucleadas e outras células mononucleares (ROSELL *et al.*, 1999; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006). As alterações histológicas no pulmão são caracterizadas por espessamento dos septos alveolares devido à infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e células gigantes

multinucleadas) e hiperplasia de pneumócitos tipo II (CHAE, 2004). Infiltrado inflamatório também pode estar presente ao redor de vasos, brônquios e bronquíolos, caracterizando um quadro de pneumonia intersticial (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007). Nos casos crônicos pode haver o desenvolvimento de bronquiolite fibrosa obliterante (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

### 2.2.5 Métodos diagnósticos

O diagnóstico de circovirose está baseado na observação de três critérios: a) presença de sinais clínicos compatíveis; b) presença de lesões microscópicas características; e, c) presença de material genético ou antígenos de PCV2 associados às lesões (CHAE, 2004).

Entre os métodos desenvolvidos para a detecção de PCV2, a IHQ e a hibridização *in situ* são rotineiramente utilizados no diagnóstico laboratorial (SORDEN *et al.*, 1999; CHAE, 2004; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

Métodos moleculares, como a PCR, também podem ser utilizados para o diagnóstico de circovirose. Entretanto os resultados obtidos através deste tipo de técnica devem ser associados à identificação de sinais clínicos e lesões características da doença, uma vez que o material genético de PCV2 pode ser detectado em animais que não desenvolveram a circovirose (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

Métodos sorológicos baseados na detecção de anticorpos para PCV2 são utilizados para estudos de soroprevalência em rebanhos e regiões (VICENTE *et al.*, 2004; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007), mas não devem ser utilizados como diagnóstico definitivo da doença uma vez que os padrões de soro-conversão encontrados em animais doentes e animais saudáveis são similares (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006).

### 2.2.6 Prevenção e controle

As principais medidas de prevenção e controle adotadas para reduzir as perdas com a circovirose estão baseadas em ações de desinfecção, manejo, vazio sanitário e manejo sanitário geral (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

Ações que visam diminuir o estresse, eliminar coinfeções ou minimizar os seus efeitos nos animais, incluem limitar o contato entre suínos e adoção de boas práticas de higiene e nutrição (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).



Medidas que visam reduzir ou eliminar a ocorrência de outros agentes infecciosos concomitantes ao PCV2 são importantes na prevenção e controle da circovirose, uma vez que as coinfeções desempenham um papel importante no desenvolvimento das diferentes formas de apresentação clínica da doença, podendo levar a um agravamento do quadro clínico da mesma (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Atualmente estão disponíveis diferentes vacinas comerciais contra o PCV2 (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedimentos gerais

As 78 amostras de tecido pulmonar utilizadas no presente estudo foram procedentes de javalis alojados em sistemas de confinamento intensivo em seis diferentes propriedades localizadas em cinco municípios no Estado do Rio Grande do Sul (Antônio Prado (2), Casca, Caxias do Sul, Cristal e Flores da Cunha). Foram incluídas no estudo 6 amostras de javalis, sorteadas ao acaso em um total de 48, procedentes de uma propriedade em Antônio Prado e enviados a um abatedouro no município de Harmonia/RS, assim como, 52 amostras de suínos domésticos procedentes de abatedouros dos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso.

Amostras do baço, coração, estômago, fígado, intestino delgado e grosso, pele, pulmão, rins, sistema nervoso central e tonsila foram obtidas através de exames de necropsia dos animais realizados entre o período de março de 2005 até junho de 2008. Após coletados, os órgãos foram fixados em solução de formalina 10% por 24 a 48 horas, e processados por técnicas rotineiras de histologia. Os tecidos foram cortados em 4 $\mu$ c e posteriormente corados com Hematoxilina-eosina (PROPHET *et al.*, 1992).

Amostras de pulmão também foram coletadas em recipientes sem solução de formalina 10% e mantidas em ambiente refrigerado. Após, cada amostra foi manipulada separadamente em uma capela de fluxo e acondicionadas em tubos Eppendorf, sendo enviadas ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBIOT/UFRGS) onde foram submetidas à liofilização (processo de desidratação usado tipicamente para preservar um material perecível ou torná-lo mais conveniente para o transporte).

O mapa de distribuição espacial das propriedades visitadas para coleta de material foi desenvolvido no Laboratório de Epidemiologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária (FAVET/UFRGS) a partir do programa computacional ArcView 9.3.

#### 3.2 Imuno-histoquímica

O exame de imuno-histoquímica para detecção de *Pneumocystis* sp. foi realizado em cortes histológicos de pulmão preparados em lâminas com solução de gelatina 0,3% ou Polilisina 10% (Sigma) e fixados em estufa a 60°C por 24 horas. Foi utilizado um anticorpo primário monoclonal anti-*Pneumocystis carinii* (ViroStat, Portland, ME) na diluição de 1:100.

Utilizou-se o método imuno-histoquímico da streptavidina-biotina peroxidase, tendo como cromógeno NovaRed (Vector Labs, Burlingame, CA). Como controle positivo da imuno-histoquímica utilizou-se cortes histológicos de pulmão com extensa marcação positiva de um javali infectado por *Pneumocystis* sp. O protocolo imuno-histoquímico completo utilizado para detecção de *Pneumocystis* sp. é apresentado no ANEXO 1.

O exame de imuno-histoquímica para detecção de PCV2 foi realizado em cortes histológicos de intestino delgado, linfonodo mesentérico, pulmão e rim preparados em lâminas com solução de gelatina 0,3% ou Polilisina 10% (Sigma) e fixados em estufa a 60°C por 24 horas. Foi utilizado um anticorpo primário policlonal anti-PCV2 (SORDEN *et al.*, 1999) na diluição de 1:1000. Utilizou-se o método imuno-histoquímico da streptavidina-biotina peroxidase, tendo como cromógeno o 3,3' diaminobenzidine (DAB-DAKO). Como controle positivo da imuno-histoquímica utilizou-se cortes histológicos de linfonodo mesentérico com extensa marcação positiva de um suíno doméstico infectado por PCV2. O protocolo imuno-histoquímico completo utilizado para detecção de PCV2 é apresentado no ANEXO 2.

### 3.3 Extração de DNA e amplificação por PCR

Amostras de tecido pulmonar previamente liofilizadas de 10 javalis necropsiados e de 6 javalis enviados a um abatedouro no Rio Grande do Sul no ano de 2005 foram submetidas à extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) a partir de um Kit Qiagen (*NucleoSpin Tissue Kit Macherey Nagel*, Qiagen, France) (ANEXO 3). Após a extração, o DNA de *Pneumocystis* sp. foi amplificado a partir da técnica de *nested*-PCR tendo como alvo os genes *mitochondrial large subunit rRNA* (mtLSU rRNA) e *mitochondrial small subunit rRNA* (mtSSU rRNA).

Para a amplificação do gene mtLSU rRNA (produto de amplificação da PCR II com 300 pares de base) foram utilizados os *primers* pAZ 102-H e pAZ 102-E (5'- GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA -3' e 5'- GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC -3') para a PCR I, e pAZ 102-X e pAZ 102-Y (5'- GGG AAT TCG TGA AAT ACA AAT CGG ACT AGG -3' e 5'- GGG AAT TCT CAC TTA ATA TTA ATT GGG GAG -3') para a PCR II (ANEXO 4).

Na amplificação do gene mtSSU rRNA (produto de amplificação da PCR II com 400 pares de base) foram utilizados os *primers* 10F-RI e 10R-RI (5'- GGG AAT TCT AGA CGG TCA CAG AGA TCA G -3' e 5'- GGG AAT TCG AAC GAT TAC TAG CAA TTC C -3')

para a PCR I, e 13RI e 14RI (5'- GGG AAT TCG AAG CAT GTT GTT TAA TTC G -3' e 5'- GGG AAT TCT TCA AAG AAT/c CGA GTT T/cCA G -3') para a PCR II (ANEXO 5).

Os produtos de amplificação de ambos os genes foram submetidos à eletroforese em gel agarose 2% em tampão TAE. Os fragmentos de DNA obtidos foram purificados através de um Kit Qiagen (*Qiaquick Gel Extraction Kit*) (ANEXO 6) e posteriormente seqüenciados utilizando-se um seqüenciador automático de DNA (*Genome Express*, Montreuil, France). Estas etapas da pesquisa foram realizadas na École Nationale Vétérinaire d'Alfort, França.

### 3.4 Análise filogenética

Primeiramente, as seqüências de nucleotídeos dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA foram alinhadas através do programa de computação CLUSTAL X (versão 1,63b, dezembro de 1997). Somente as amostras que não apresentaram ambiguidade foram incluídas na análise. Para a comparação das seqüências alinhadas e a geração das árvores filogenéticas foi utilizado o programa *Phylogenetic Analysis Using Parsimony* (PAUP 4.0). As árvores filogenéticas foram geradas através do método de análise de parcimônia. Todas as árvores foram testadas estatisticamente através da análise de *bootstrap*. As seqüências obtidas das amostras de javalis, assim como, seqüências obtidas de amostras de suínos domésticos procedentes de abatedouros dos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso foram comparadas com seqüências conhecidas de outras espécies de *Pneumocystis* no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html)). Esta etapa da pesquisa foi realizada na École Nationale Vétérinaire d'Alfort, França.

## 4 RESULTADOS

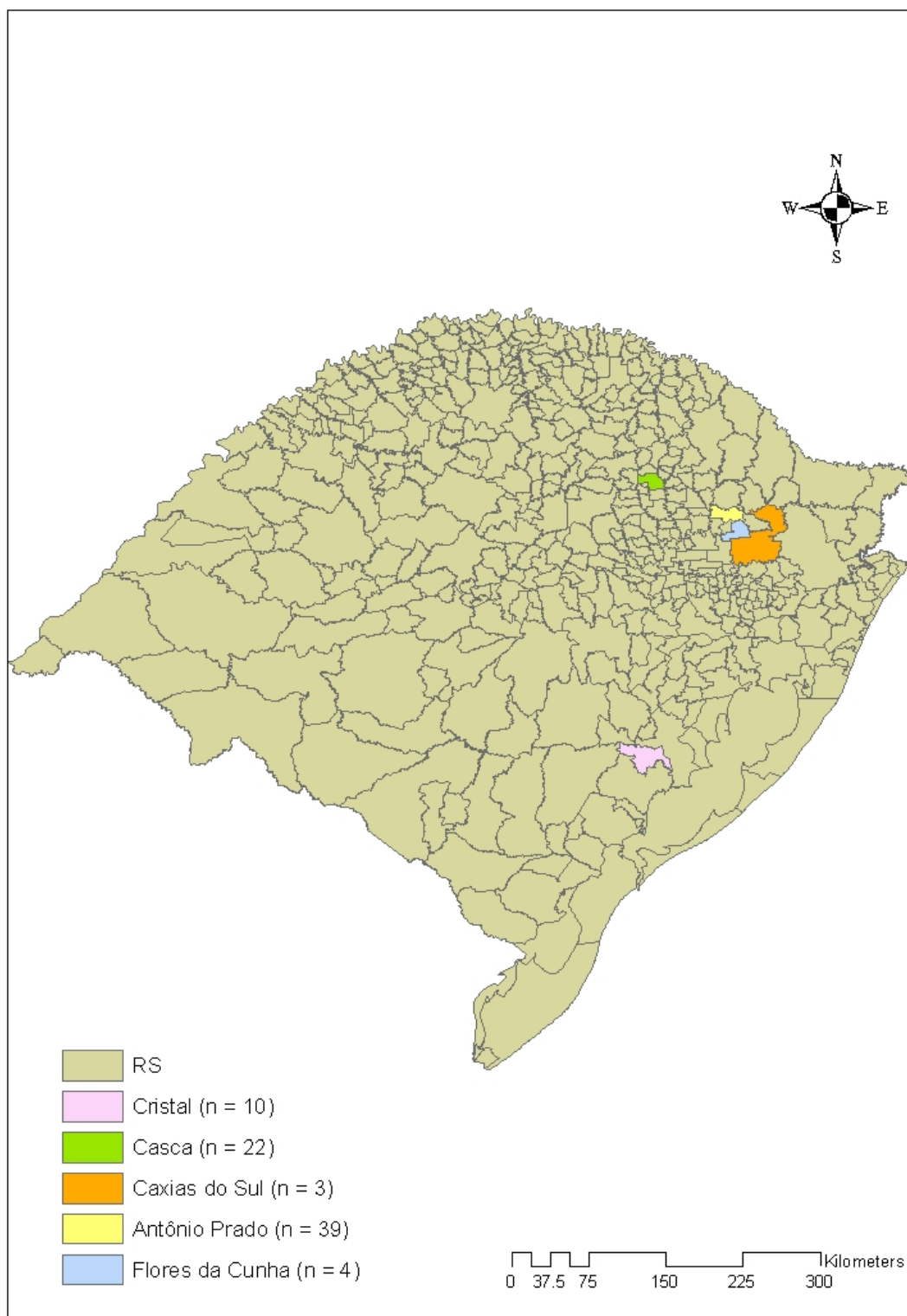
### 4.1 Dados gerais

No período de março de 2005 a junho de 2008 foram realizadas pelo Setor de Patologia Veterinária da UFRGS 78 necropsias de javalis com idade entre 2 meses a 5 meses. Os animais eram alojados em sistemas de confinamento intensivo em seis diferentes propriedades localizadas em cinco municípios no Estado do Rio Grande do Sul.

Dos animais necropsiados, 46 estavam em propriedades distribuídas na mesorregião Nordeste do estado, sendo que 39 procediam do município de Antônio Prado (35 da propriedade “a” e 4 da propriedade “b”), 3 de Caxias do Sul e 4 de Flores da Cunha. No município de Casca, mesorregião Noroeste, foram necropsiados 22 javalis e em Cristal, mesorregião Sudeste, amostras de 10 animais foram coletadas (Figura 2).

Todas as cinco propriedades apresentaram um histórico clínico de aumento da taxa de mortalidade e definhamento progressivo em animais jovens. Tosse, espirro, diarreia e descarga ocular também foram sinais clínicos comumente observados. Aumento do tamanho do baço e linfonodos, ascite, hidrotórax e presença de pulmões não-colapsados foram os achados macroscópicos mais relevantes observados ao exame de necropsia.

Na microscopia, os achados mais importantes foram a presença de infiltrado linfocitário de grau variável no baço, linfonodos e intestino, e pneumonia intersticial associada a um infiltrado inflamatório composto por células mononucleares, por vezes afetando os brônquios. A partir da análise histológica dos órgãos coletados, pela técnica de Hematoxilina-eosina, 60% dos animais (47/78) apresentaram lesões compatíveis com SMDS. Pneumonia intersticial foi observada em 38,5% dos pulmões analisados (30/78) e em 27% (21/78) a pneumonia broncointersticial foi evidenciada. Broncopneumonia supurativa, sem pneumonia intersticial, foi visualizada em 14% (11/78) dos casos.

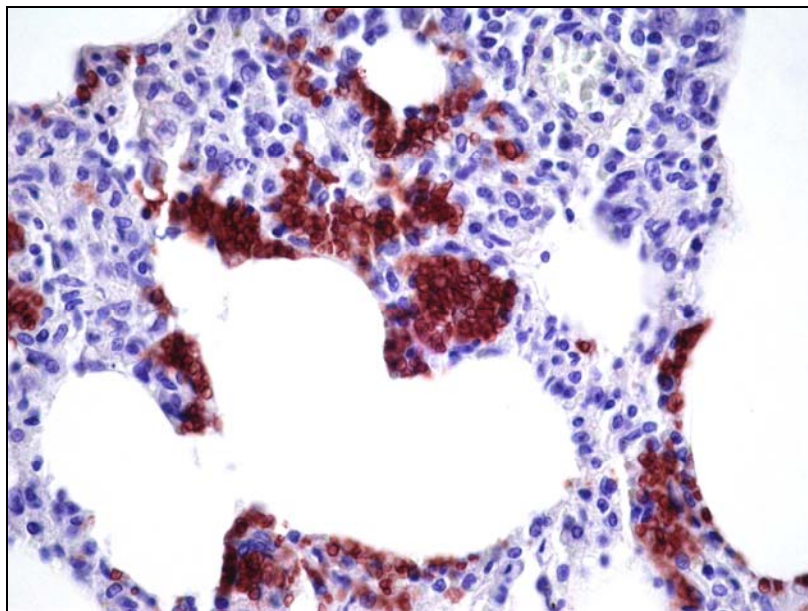


**Figura 2** - Mapa do Estado do Rio Grande do Sul demonstrando a distribuição das propriedades onde foram realizadas as coletas de material de javalis.

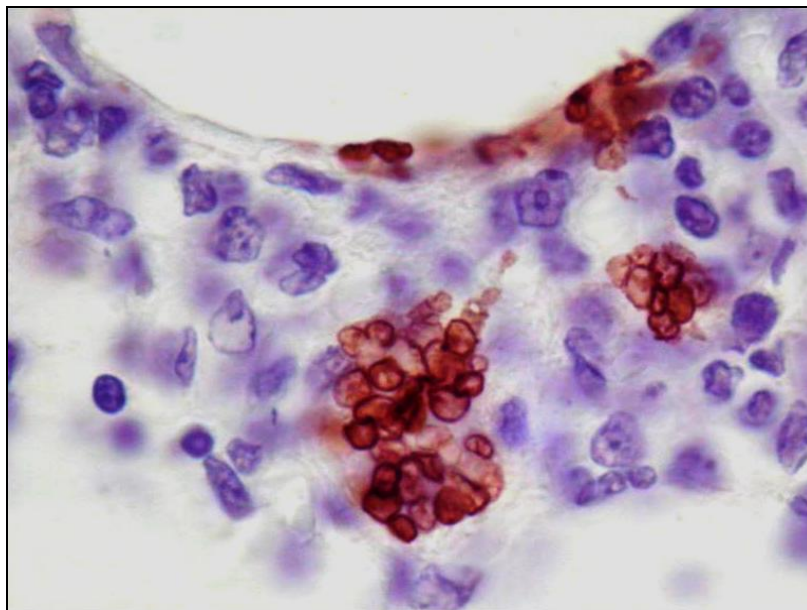
## 4.2 Imuno-histoquímica

No teste imuno-histoquímico anti-*Pneumocystis* foi observada a marcação de ascos de *Pneumocystis* sp. em 50% dos pulmões (39/78) (Figuras 3 e 4). No teste imuno-histoquímico anti-PCV2 foi observada a presença de antígenos virais, em ao menos um dos órgãos analisados, em 37% dos casos (29/78). O linfonodo mesentérico foi o órgão que apresentou maior marcação de antígenos virais de PCV2 (Figura 5), seguido do intestino delgado, pulmão (Figura 6) e rim, respectivamente.

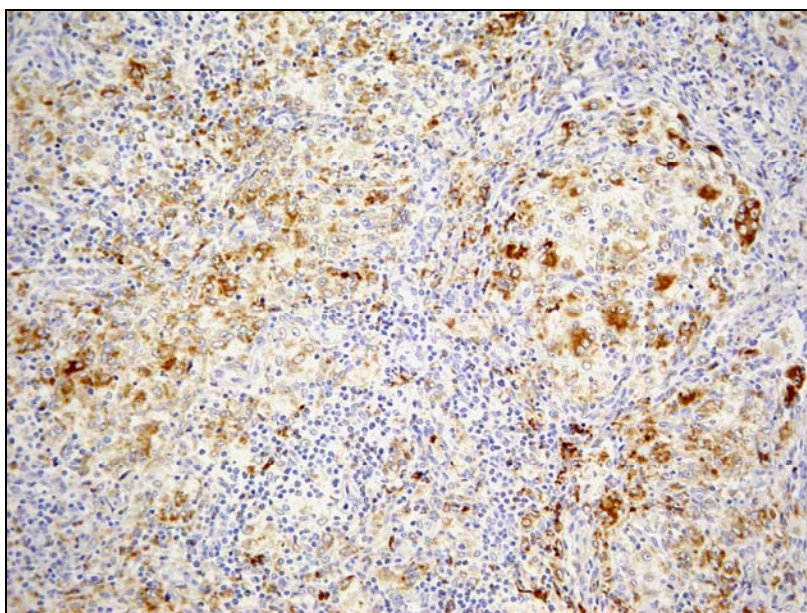
Em 20,5% dos javalis (16/78) foi identificada a presença de *Pneumocystis* sp. e PCV2. Nos animais com marcação positiva para *Pneumocystis* sp., antígenos virais de PCV2 foram observados em 41% dos animais (16/39). Dos 29 casos em que houve marcação imuno-histoquímica positiva para PCV2, *Pneumocystis* sp. foi detectado em 55% dos animais (16/29). Tanto *Pneumocystis* sp. quanto PCV2 foram detectados em todas as propriedades visitadas, à exceção da propriedade localizada no município de Caxias do Sul (Tabela 1).



**Figura 3** - Imuno-histoquímica anti-*Pneumocystis* sp. com marcação positiva em pulmão de javali (obj. 20).

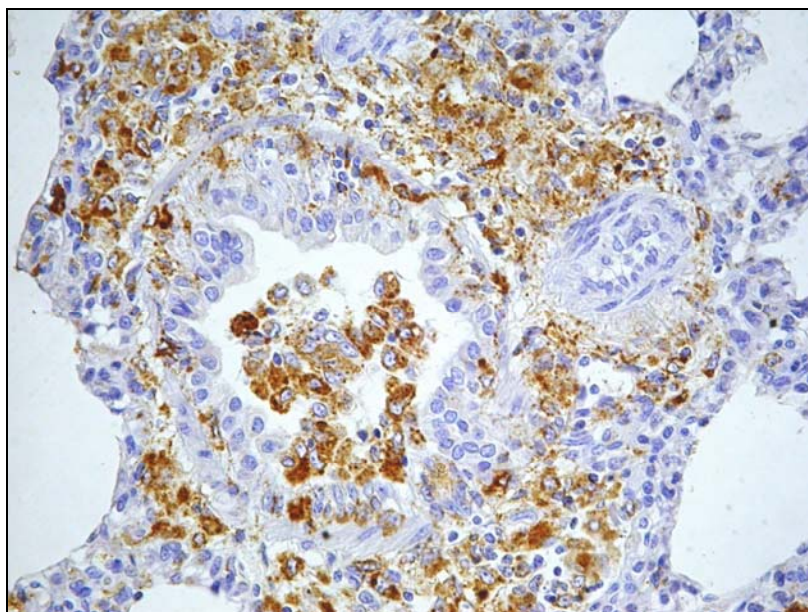


**Figura 4** - Imuno-histoquímica anti-*Pneumocystis* sp. com marcação positiva de ascos de *Pneumocystis* sp. em pulmão de javali (obj. 40).



**Figura 5** - Imuno-histoquímica anti-PCV2 com marcação positiva nos centros foliculares de linfonodo mesentérico de javali (obj. 20).





**Figura 6** - Imuno-histoquímica anti-PCV2 com marcação positiva em pulmão de javali (obj. 40).

**Tabela 1** - Resultados da IHQ anti-*Pneumocystis* e anti-PCV2 em 78 javalis analisados.

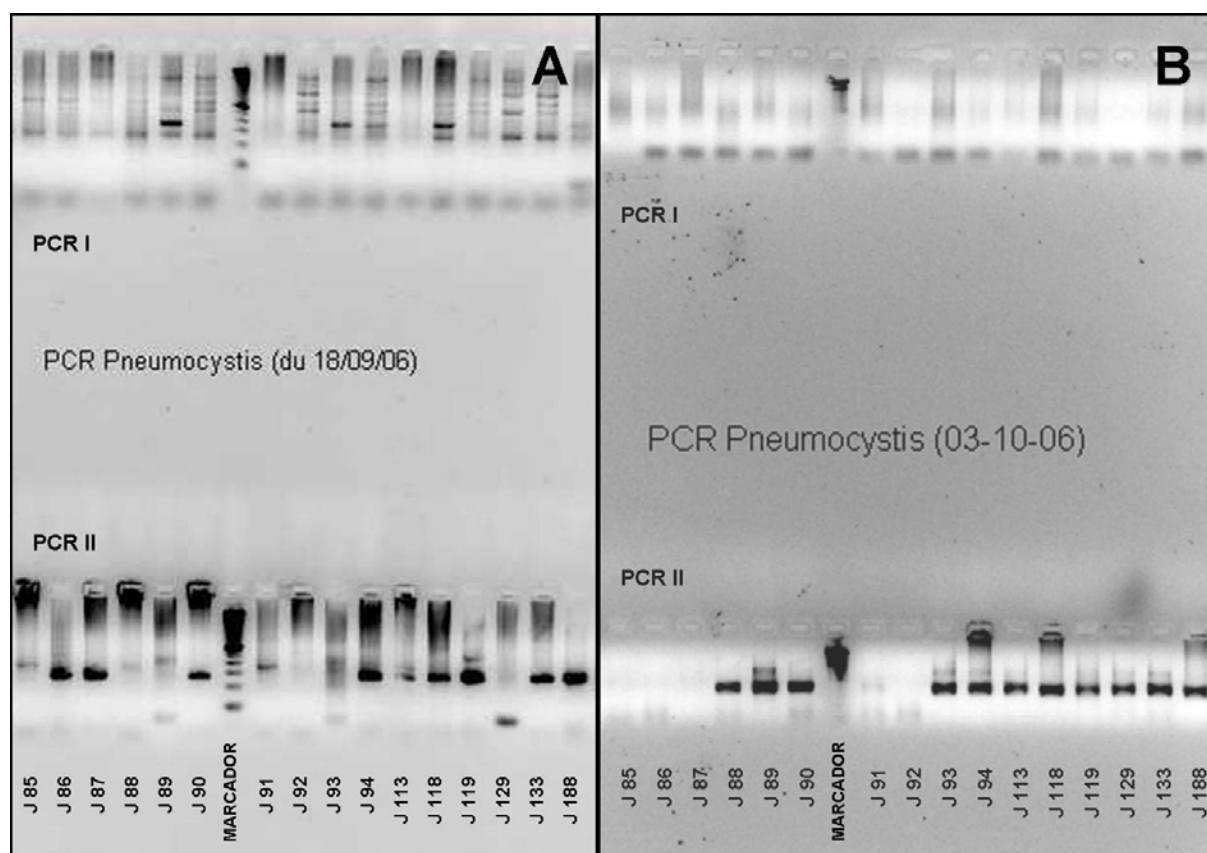
	<b>Município</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>IHQ anti-<i>Pneumocystis</i></b>	<b>IHQ anti-PCV2</b>
1	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
2	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	+
3	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	+
4	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	+
5	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	+
6	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
7	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
8	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	+
9	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
10	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	+
11	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	-
12	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
13	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	-
14	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
15	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
16	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	-
17	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
18	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	+
19	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
20	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	+
21	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	-
22	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	+	+
23	Antônio Prado <sup>a</sup>	Março de 2005	-	-
24	Casca	Mai de 2005	+	-
25	Casca	Mai de 2005	+	-
26	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	+	-
27	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	-	-
28	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	-	+
29	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	+	-

	<b>Município</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>IHQ anti-<i>Pneumocystis</i></b>	<b>IHQ anti-PCV2</b>
30	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	+	-
31	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	+	-
32	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2005	+	-
33	Flores da Cunha	Agosto de 2005	-	-
34	Flores da Cunha	Agosto de 2005	+	-
35	Flores da Cunha	Agosto de 2005	+	+
36	Flores da Cunha	Agosto de 2005	+	-
37	Casca	Fevereiro de 2006	+	-
38	Casca	Fevereiro de 2006	+	-
39	Casca	Fevereiro de 2006	+	-
40	Casca	Fevereiro de 2006	+	-
41	Antônio Prado <sup>b</sup>	Fevereiro de 2006	+	+
42	Antônio Prado <sup>b</sup>	Fevereiro de 2006	-	+
43	Antônio Prado <sup>b</sup>	Fevereiro de 2006	-	-
44	Antônio Prado <sup>b</sup>	Fevereiro de 2006	+	+
45	Casca	Setembro de 2006	-	-
46	Casca	Setembro de 2006	+	-
47	Casca	Setembro de 2006	-	-
48	Casca	Setembro de 2006	-	+
49	Casca	Setembro de 2006	-	+
50	Casca	Setembro de 2006	-	+
51	Casca	Setembro de 2006	-	+
52	Casca	Setembro de 2006	-	+
53	Casca	Setembro de 2006	+	+
54	Casca	Setembro de 2006	-	+
55	Casca	Setembro de 2006	+	+
56	Casca	Setembro de 2006	+	-
57	Casca	Setembro de 2006	+	-
58	Casca	Setembro de 2006	+	+
59	Casca	Setembro de 2006	+	-
60	Casca	Setembro de 2006	+	-
61	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2007	-	-
62	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2007	-	-
63	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2007	-	-
64	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2007	+	-
65	Antônio Prado <sup>a</sup>	Agosto de 2007	-	-
66	Caxias do Sul	Agosto de 2007	-	-
67	Caxias do Sul	Agosto de 2007	-	-
68	Caxias do Sul	Agosto de 2007	-	-
69	Cristal	Junho de 2008	+	+
70	Cristal	Junho de 2008	-	+
71	Cristal	Junho de 2008	+	+
72	Cristal	Junho de 2008	+	+
73	Cristal	Junho de 2008	+	+
74	Cristal	Junho de 2008	-	-
75	Cristal	Junho de 2008	-	-
76	Cristal	Junho de 2008	-	-
77	Cristal	Junho de 2008	-	-
78	Cristal	Junho de 2008	-	+

1-78 javalis com idade de 2 meses a 5 meses, <sup>a</sup> e <sup>b</sup> (diferentes propriedades localizadas no município de Antônio Prado/RS), + (imuno-histoquímica com marcação positiva), - (ausência de marcação imuno-histoquímica).

### 4.3 Amplificação por PCR

Das 16 amostras de tecido pulmonar de javalis coletadas no ano de 2005 e submetidas à amplificação por *nested*-PCR para o gene mtLSU rRNA (produto de amplificação da PCR II com 300 pares de base), 13 foram amplificadas após a realização da PCR II (Figura 7A). Para a análise do gene mtSSU rRNA (produto de amplificação da PCR II com 400 pares de base), as mesmas 16 amostras foram submetidas à amplificação por *nested*-PCR. Como resultado final obteve-se 11 amostras amplificadas após a realização da PCR II (Figura 7B). As amostras J 85, J 86, J 87, J 88, J 89, J 90 e J 91 foram coletadas na propriedade “a” localizada no município de Antônio Prado e correspondem respectivamente às amostras 26 a 32 da Tabela 1. As amostras J 92, J 93 e J 94 foram coletadas em Flores da Cunha e correspondem respectivamente às amostras 33, 34 e 35. As amostras J 113, J 118, J 119, J 129, J 133 e J 188 são de javalis procedentes da propriedade “a” localizada no município de Antônio Prado, que não desenvolveram SDMS e foram enviados para o abate.



**Figura 7** - *Nested*-PCR em amostras de tecido pulmonar de javalis. **A.** Amostras amplificadas para o gene mtLSU rRNA de *Pneumocystis* sp. **B.** Amostras amplificadas para o gene mtSSU rRNA de *Pneumocystis* sp.

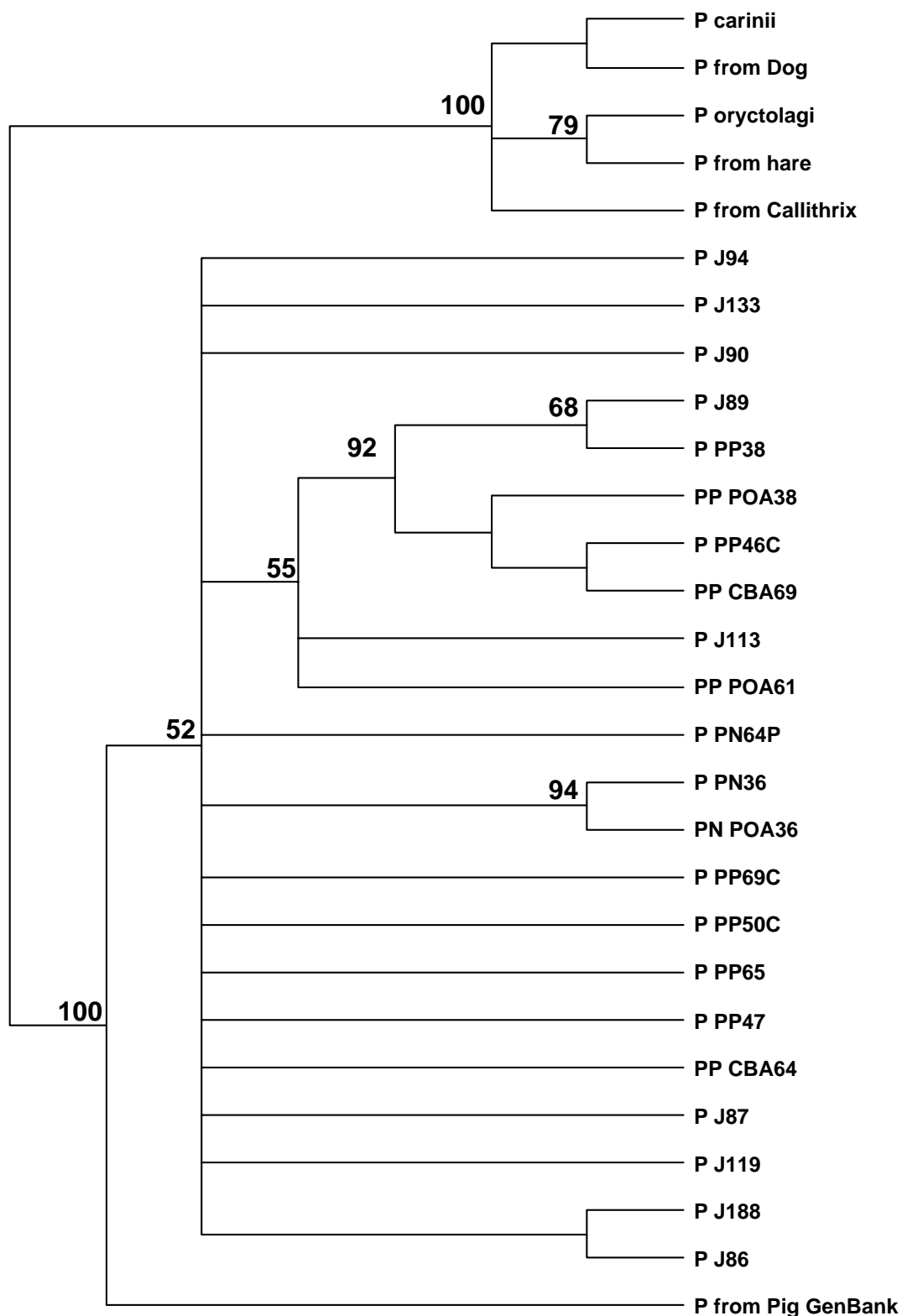
#### 4.4 Análise filogenética

A análise filogenética das amostras de javalis e suínos domésticos baseada na seqüência de nucleotídeos dos genes mtLSU rRNA (Figura 9) e mtSSU rRNA (Figura 10) sugere que javalis e suínos no Brasil são afetados pela mesma espécie de *Pneumocystis* sp.

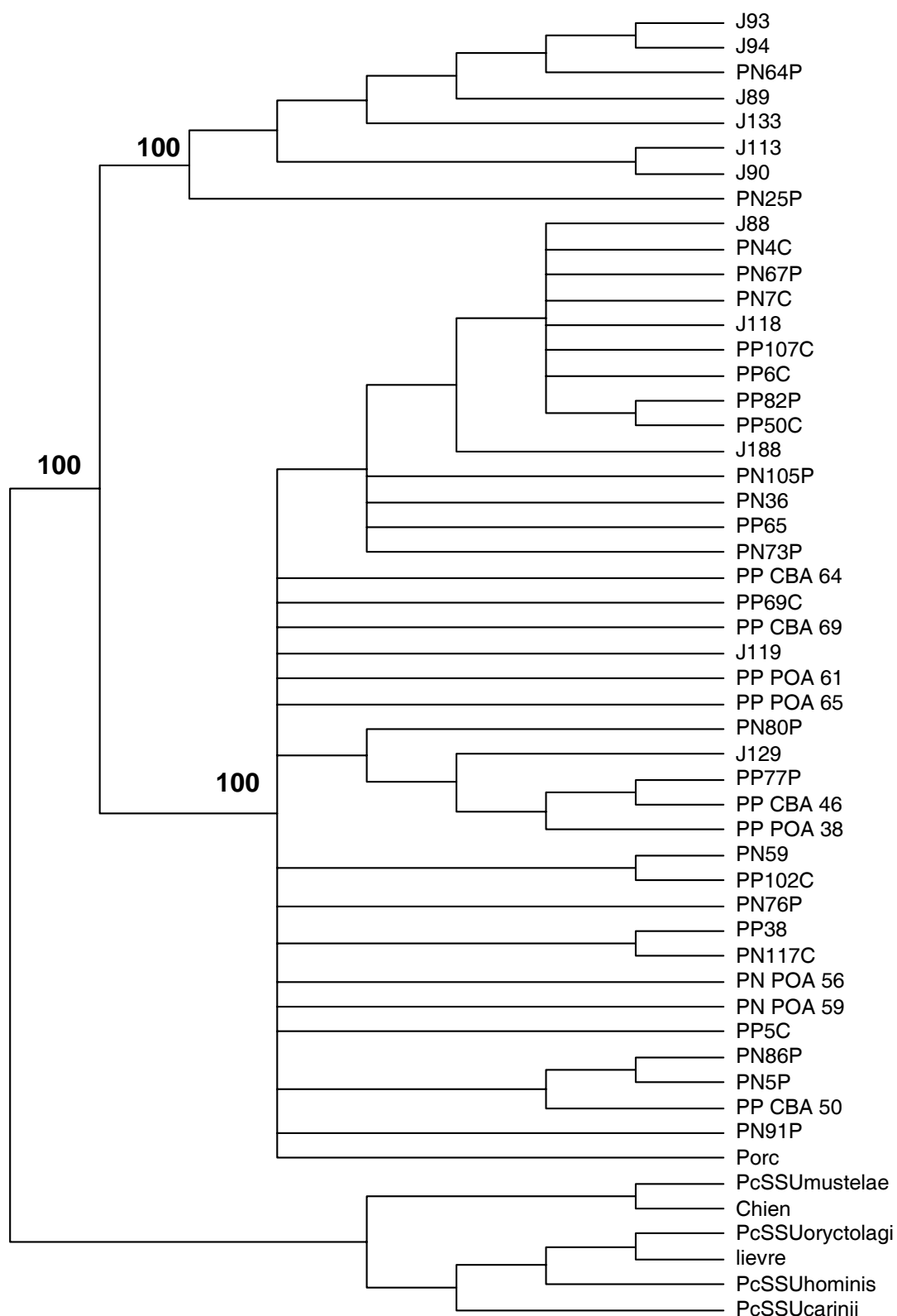
Todavia, principalmente a partir da análise do gene mtSSU rRNA, que apresentou valores de *bootstrap* considerados altamente confiáveis (100%) e maiores que àqueles observados na análise do gene mtLSU rRNA, pode-se dividir as amostras analisadas em dois grupos distintos de *Pneumocystis* sp. O primeiro é composto pelas amostras J 89, J 90, J 93, J 94, J 113 e J 133 de javalis e pelas amostras PN 64P e PN 25P de suínos domésticos procedentes de abatedouros da região de Porto Alegre/RS. O segundo grupo é composto pelas amostras J 88, J 118, J 119, J 129 e J 188 de javalis e por diferentes amostras de suínos procedentes de abatedouros da região de Porto Alegre e Cuiabá/MT.

As amostras de javalis que compõem o primeiro grupo são procedentes de animais que desenvolveram a SMDS em propriedades localizadas nos municípios de Antônio Prado (J 89 e J 90) e Flores da Cunha (J 93 e J 94). Assim como, animais da mesma propriedade em Antônio Prado que não apresentaram clinicamente a SMDS e foram enviados para o abate (J 113 e J 133). O segundo grupo foi formado por amostras procedentes de propriedade em Antônio Prado, sendo que um animal foi acometido pela SMDS (J 88) e os demais não (J 118, J 119, J 129 e J 188).

Somente as amostras que não apresentaram ambigüidade foram incluídas na análise. Amostras que apresentaram uma possível contaminação cruzada nas etapas anteriores ao processo de análise filogenética foram eliminadas. Desta forma, as amostras J 85, J 88, J 91 e J 118 que apresentaram amplificação após a PCR II para o gene mtLSU rRNA não foram incluídas na análise, assim como, as amostras J 90 e J 113 amplificadas após a PCR II para o gene mtSSU rRNA.



**Figura 8** - Árvore filogenética obtida por análise de parcimônia a partir de gene mtLSU rRNA de *Pneumocystis* sp. PP e PN: amostras de suínos domésticos. P e POA: amostras de suínos provenientes da região de Porto Alegre/RS. C e CBA: amostras de suínos provenientes da região de Cuiabá/MT. J: amostras de javalis.



**Figura 9** - Árvore filogenética obtida por análise de parcimônia a partir de gene mtSSU rRNA de *Pneumocystis* sp. PP e PN: amostras de suínos domésticos. P e POA: amostras de suínos provenientes da região de Porto Alegre/RS. C e CBA: amostras de suínos provenientes da região de Cuiabá/MT. J: amostras de javalis.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que javalis alojados em sistemas de confinamento intensivo em propriedades localizadas em diferentes municípios no Estado do Rio Grande do Sul são acometidos pelo circovírus suíno do tipo 2 (PCV2), podendo desenvolver a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS). O histórico clínico de aumento da taxa de mortalidade e definhamento progressivo em animais jovens, assim como, os sinais clínicos e as principais lesões macroscópicas e microscópicas descritas no trabalho foram também relatados por outros autores em javalis (ELLIS *et al.*, 2003; SCHULZE *et al.*, 2003; SEGALÉS *et al.*, 2003; CIACCI ZANELLA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006a; LIPEJ *et al.*, 2006) e suínos domésticos (ROSELL *et al.*, 1999; QUINTANA *et al.*, 2001; PESCADOR *et al.*, 2003; CHAE, 2004; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; CHAE, 2005; FRANÇA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006b; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007) acometidos pela SMDS.

A principal lesão microscópica evidenciada no pulmão foi a pneumonia intersticial em 38,5% dos javalis analisados, seguida de pneumonia broncointersticial em 27% dos casos e de broncopneumonia supurativa em 14% dos casos. Pneumonia intersticial em suínos acometidos por *Pneumocystis* sp. foi relatada por Bille-Hansen *et al.* (1990), Kondo *et al.* (1993), Sanches (2006c) e Sanches *et al.* (2007). Em suínos, a pneumonia intersticial e a pneumonia broncointersticial são achados histopatológicos característicos de animais infectados pelo PCV2 (CHAE, 2004; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; FRANÇA *et al.*, 2005; CORRÊA *et al.*, 2006b; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2006; MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007), mas podem estar associados a coinfeções por outros agentes, tais como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína, vírus da influenza suína, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (KIM; CHUNG; CHAE, 2003; CHAE, 2005; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). Broncopneumonia supurativa é comumente relatada em casos de coinfeção pulmonar por *Pasteurella multocida* (MORÉS; BARCELLOS; CIACCI ZANELLA, 2007).

Através da análise imuno-histoquímica (IHQ), *Pneumocystis* sp. foi identificado em 50% das amostras (39/78). Kondo *et al.* (2000) identificou pela IHQ uma prevalência de 35,5% de *Pneumocystis* sp. em pulmões de suínos necropsiados entre os anos de 1988 e 1995.

A prevalência de PCV2 detectada pela IHQ neste trabalho foi de 37% (29/78). Este valor é superior aos 20,5% de prevalência encontrada por Cságola *et al.* (2006) através de análise pela PCR em estudo envolvendo uma população de javalis.

Em 20,5% dos javalis (16/78) analisados no presente trabalho foi identificada a presença de coinfeção entre *Pneumocystis* sp. e de PCV2. Resultado este semelhante aos 19% de coinfeção em suínos encontrada por Sato *et al.* (2000) e inferior aos 28% encontrados por Sanches *et al.* (2006) em estudo realizado com amostras de pulmões, com lesão macroscópica, de suínos procedentes de abatedouros dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso. A ocorrência de fatores predisponentes, como a SMDS, é descrita por outros autores como causa necessária para o desenvolvimento da pneumocistose (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DYER; SCHAMBER, 1999; DEI-CAS, 2000; STRINGER, 2002a). Este dado sugere que a infecção por PCV2 pode ter influenciado na ocorrência de animais afetados por *Pneumocystis* sp.

*Pneumocystis* sp. e PCV2 foram detectados em três diferentes mesorregiões do Rio Grande do Sul (Nordeste, Noroeste e Sudeste). A distribuição espacial de propriedades afetadas pelo PCV2 coincide com resultados anteriormente obtidos em estudos soropidemiológicos que relatam uma ampla distribuição de PCV2 em populações de javalis localizadas em diferentes regiões no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2005) e na Espanha (VICENTE *et al.*, 2004).

No teste de amplificação por *nested*-PCR para os genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA 15 diferentes amostras foram amplificadas após a PCR II. Quando comparados os resultados da amplificação por PCR com os da IHQ de 10 amostras de tecido pulmonar de javalis necropsiados pode-se observar que em 8 casos, sendo 7 positivos e 1 negativo, obteve-se resultado igual na PCR e na IHQ. Em dois casos negativos na IHQ, foi detectada a presença de material genético de *Pneumocystis* sp. Este resultado demonstra que a técnica de PCR apresentou maior sensibilidade quando comparada com a IHQ. A detecção de material genético de *Pneumocystis* sp. nos pulmões de 6 javalis que não desenvolveram a SMDS sugere que somente a presença de *Pneumocystis* sp. não se caracteriza como causa suficiente para o desenvolvimento da pneumocistose, conforme relatam outros autores (BILLE-HANSEN *et al.*, 1990; DEI-CAS, 2000).



Sanches *et al.* (2007) relatou através do teste de IHQ uma prevalência de 33,8% (47/139) de *Pneumocystis* sp. em pulmões sem lesão macroscópica de suínos no Estado do Rio Grande do Sul.

A análise filogenética dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA sugere até o presente momento que javalis e suínos domésticos no Brasil são afetados pela mesma espécie de *Pneumocystis* sp. A partir da análise do gene mtSSU rRNA pode-se dividir as amostras analisadas em dois grupos distintos de *Pneumocystis* sp. Demanche *et al.* (2001) e Guillot *et al.* (2004) relataram um resultado semelhante em estudo envolvendo diferentes espécies de primatas não-humanos, no qual dois grupos distintos de *Pneumocystis* sp. foram identificados simultaneamente em duas espécies de primatas procedentes do continente asiático: macaco-rhesus (*Macaca mulatta*) e macaco-caranguejeiro (*Macaca fascicularis*). Nas demais espécies de primatas pesquisados foram identificadas espécies específicas de *Pneumocystis* sp. para cada espécie hospedeira. Segundo Demanche *et al.* (2001) e Guillot *et al.* (2004) estes resultados sugerem um longo processo de coevolução entre as espécies de *Pneumocystis* e as diferentes espécies de mamíferos que são afetados pelo microrganismo, assim como, uma associação de correlação entre as espécies de *Pneumocystis* e a posição filogenética de cada espécie hospedeira. Desta forma, pode-se sugerir que as relações evolutivas compartilhadas entre javalis e suínos domésticos (família *Suidae*, gênero *Sus*) permitem que os mesmos sejam infectados pela mesma espécie de *Pneumocystis* sp.

Dados mais precisos sobre a subdivisão de *Pneumocystis* sp. em dois grupos distintos poderão vir a serem obtidos a partir da análise de um maior número de amostras de tecido pulmonar de javalis e suínos domésticos a partir de pesquisas envolvendo outros genes alvo, como: *dihydropteroate synthetase*, *internal transcribed spacer* e *thimidylate syntase*.

## 6 CONCLUSÕES

Javalis alojados em propriedades com sistema de confinamento intensivo em diferentes mesorregiões no Estado do Rio Grande do Sul são infectados por *Pneumocystis* sp. e pelo PCV2, desenvolvendo clinicamente a SMDS.

Detectou-se pelo teste de IHQ a presença de *Pneumocystis* sp. em 50% dos pulmões analisados e antígenos virais de PCV2 em 37% dos animais, sendo o linfonodo mesentérico o órgão que apresentou maior grau de marcação positiva.

Coinfecção entre *Pneumocystis* sp. e PCV2 foi confirmada pela IHQ em 20,5% dos animais.

Detectou-se pelo teste de PCR a presença de material genético de *Pneumocystis* sp. em pulmões de javalis que desenvolveram a SMDS e em pulmões de javalis que não apresentaram clinicamente a doença.

Javalis e suínos domésticos no Brasil são infectados pela mesma espécie de *Pneumocystis* sp., a partir das regiões analisadas do ácido desoxirribonucléico do fungo.

Detectou-se pela análise filogenética a presença de dois grupos distintos de *Pneumocystis* sp. em amostras de pulmão de javalis e suínos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLAN, G. M. *et al.* PMWS: experimental model and co-infections. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 165-168, 2004.

AMIT, Z. *et al.* Detection of *Pneumocystis carinii* in lungs of wildlife mammals from crocker range park by PCR amplification. **ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation**, 2002.

BARBOSA, C. N. *et al.* Prevalência do Circovírus Suíno Tipo 2 (CVS-2) em javalis (*Sus scrofa scrofa*) no Brasil. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 2005.

BARTLETT, M. S. *et al.* New rat model of *Pneumocystis carinii* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 1100-1102, 1988.

BEARD, C. B. *et al.* Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1729-1735, 2004.

BILLE-HANSEN, V. *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia in Danish piglets. **Veterinary Record**, v. 20, p. 407-408, 1990.

CALDERÓN-SANDUBETE, E. J. *et al.* Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. **Protist**, v. 153, p. 303-310, 2002.

CALIENDO, A. M. *et al.* Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 979-982, 1998.

CANFIELD, P. J.; CHURCH, D. B.; MALIK, R. *Pneumocystis* pneumonia in a dog. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 23, n. 3, p. 150-154, 1993.

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

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. **The Veterinary Journal**, n. 169, p. 326-336, 2005.

CHARY-REDDY, S.; GRAVES, D. C. Identification of extrapulmonary *Pneumocystis carinii* in immunocompromised rats by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1660-1665, 1996.

CIACCI ZANELLA, J. R. *et al.* Detecção do Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV2) em javalis (*Sus scrofa*) com sintomatologia de definhamento. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 2005.

CORRÊA, A. M. R. *et al.* Postweaning multisystemic wasting syndrome in farmed wild boars (*Sus scrofa*) in Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 26, v. 3, p. 154-156, 2006a.

CORRÊA, A. M. R. *et al.* Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 26, v. 1, p. 9-13, 2006b.

CSÁGOLA, A. *et al.* Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. **Archives of Virology**, n. 151, v. 3, p. 495-507, 2006.

CUSHION, M. T. *et al.* Terminology for the life cycle of *Pneumocystis carinii*. **Infection and immunity**, n. 65, v. 10, p. 4365, 1997.

CUSHION, M. Taxonomy, genetic organization and life cycle of *Pneumocystis carinii*. **Seminars in respiratory infections**, n. 13, p. 304-312, 1998.

CUSHION, M. T.; KEELY, S. P.; STRINGER, J. R. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. **Mycologia**, n. 96, v. 3, p. 429-438, 2004.

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

DEI-CAS, E. *Pneumocystis* infections: the iceberg. **Medical Mycology**, n. 38, v. S1, p. 23-32, 2000.

DEI-CAS, E. *et al.* *Pneumocystis orictology* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. **FEMS Microbiological Reviews**, n. 30, p. 853-871, 2006.

DELANÖE, P.; DELANÖE, M. Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le *Tripanosoma lewisi*. **Comptes rendus de l'Académie des sciences**, n. 155, p. 658-660, 1912.

DELANÖE, P.; DELANÖE, M. De la rareté de *Pneumocystis carinii* chez les cobayes de la région de Paris, absence de Kystes chez d'autres animaux (lapins, grenouilles, trois anguilles). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, n. 7, p. 271-272, 1914.

DEMANCHE, C. *et al.* Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, v. 6, p. 2126-2133, 2001.

DEMANCHE, C. *et al.* Assessment of *Pneumocystis* species carriage in captive primates. **The Veterinary Record**, n. 152, v. 26, p. 811-813, 2003.

DUMOULIN, A. *et al.* Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, n. 19, p. 671-678, 2000.

DURAND-JOLY, I. *et al.* Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 45, p. 405-410, 2005.

DYER, N. W.; SCHAMBER, G. J. Pneumocystosis associated with canine distemper virus infection in a mink. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 40, p. 577-578, 1999.

ELLIS, J. *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Veterinary Journal**, n. 39, p. 44-51, 1998.

ELLIS, J. *et al.* Porcine circovirus 2-associated disease in Eurasian wild boar. **Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 15, v. 4, p. 364-368, 2003.

ELLIS, J. *et al.* Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**, n. 98, p. 159-163, 2004.

ERIKSSON, O. E. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). **Systema Ascomycetum**, n. 13, p. 165-180, 1994.

FARROW, B. R. H. *et al.* *Pneumocystis* pneumonia in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, n. 82, p. 447-453, 1972.

FRANÇA, T. N. *et al.* Surto de Circovirose (Síndrome Definhante Multissistêmica de Suínos Desmamados) no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 25, v. 1, p. 39-53, 2005.

GUILLOT, J. *et al.* Phylogenetic relationships among *Pneumocystis* from Asian macaques inferred from mitochondrial rRNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, n. 31, p. 988-996, 2004.

GREENE, C. E.; CHANDLER, F. W. Pneumocystosis. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 1998, p. 524-530.

HOPKIN, J. M. *Pneumocystis carinii*. New York: Oxford University Press, 1991, 131p.

HSUEH, J. Y. *et al.* Internal transcribed spacer regions of rRNA genes of *Pneumocystis carinii* from monkeys. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, n. 8, v. 3, p. 503-508, 2001.

ICENHOUR, C. R. *et al.* Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. **Eukaryotic Cell**, n. 1, v. 3, p. 414-419, 2002.

JÉCNLY, V. *Pneumocystis carinii* findings in young ones of some farm animals. **Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology**, n. 22, p. 135-140, 1973.

JENSEN, T. K.; BOYE, M.; BILLE-HANSEN, V. Application of fluorescent in situ hybridization for specific diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals and pigs. **Veterinary Pathology**, n. 38, v. 3, p. 269-274, 2001.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole. 2000, 1415p.

KEELY, S. P. *et al.* Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. **Society General Microbiology**, n. 150, p. 1153-1165, 2004.

KIM, J. *et al.* Simultaneous detection of circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. **Veterinary Record**, n. 149, p. 304-305, 2001.

KIM, J.; CHUNG, H.-K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, n. 166, p. 251-256, 2003.

KNELL, S. *et al.* Comparative genetic characterization of Porcine Circovirus type 2 samples from German wild boar populations. **Veterinary Microbiology**, n. 109, p. 169-177, 2005.

KONDO, H. *et al.* Pathological changes in epidemic porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, n. 108, p. 261-268, 1993.

KONDO, H. *et al.* Serological studies on porcine *Pneumocystis carinii* pneumonia: kinetics of the antibody titers in swine herds and the association of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection. **Journal of Veterinary Medicine Science**, n. 59, v. 12, p. 1161-1163, 1997.

KONDO, H.; HIKITA, M.; KADOTA, K. Immunohistochemical study of *Pneumocystis carinii* infection in pigs: evaluation of *Pneumocystis* pneumonia and a retrospective investigation. **Veterinary Record**, n. 147, p. 544-549, 2000.

LAACKONEN, J. *Pneumocystis carinii* in wildlife. **International Journal for Parasitology**, n. 28, p. 241-252, 1998.

LAROCHELLE, R. *et al.* PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 38, v. 12, p. 4629-4632, 2000.

LEE, S. A. A review of *Pneumocystis* pneumonia. **Journal of Pharmacy Practice**, n. 19, v. 1, p. 5-9, 2006.

LIPEJ, Z. *et al.* Postweaning multisystemic wasting syndrome in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia. **Veterinarski Arhiv**, n. 76, p. S41-S50, 2006.

LOBETTI, R. G.; LEISEWITZ, A. L.; SPENCER, J. A. *Pneumocystis carinii* in the miniature dachshund: case report and literature review. **Journal of Small Animal Practice**, n. 37, v. 6, p. 280-285, 1996.

MACCONNELL, E. E.; BASSON, P. A.; PIENAAR, J. G. Pneumocystosis in a domestique goat. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, n. 38, p. 117-126, 1971.

MACNEILL, A. L. *et al.* Pneumonia in a Paso-Fino mare. **Veterinary Clinical Pathology**, n. 32, v. 2, p. 73-76, 2003.



MORÉS, N.; BARCELLOS, D. E. S. N.; CIACCI ZANELLA, J. R. Circovirose suína. In: **Doenças dos Suínos**. 1. ed. Goiânia: Cênone. 2007, p. 213-225.

MORI, M. *et al.* Restropective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. **Veterinary Pathology**, n. 37, p. 667-669, 2000.

MUHLING, J. *et al.* Genetic characterization of Australian strains of porcine circovirus types 1 and 2. **Australian Veterinary Journal**, n. 84, v. 12, p. 421-425, 2006.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X-J.; HALBUR, P. G. Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 19, p. 591-615, 2007.

PESCADOR, C. A. *et al.* Principais lesões histológicas associadas à circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos no Rio Grande do Sul. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, 2003.

PETERS, S. E. *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia in thoroughbred foals: identification of a genetically distinct organism by DNA amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 32, v. 1, p. 213-216, 1994.

PROPHET, E. B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 274p.

QUINTANA, J. *et al.* Clinical and pathological observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**, n. 149, p. 357-361, 2001.

RAMSEY, I. K. *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia in two Cavalier King Charles spaniels. **Veterinary Record**, n. 140, p. 372-373, 1997.

REDHEAD, S. A. *et al.* *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. **Journal of Eukariotic Microbiology**, n. 53, v. 1, p. 2-11, 2006.

RENSBURG, I. B. J. V. Pneumocystosis. In: **Infectious Diseases of Livestock**. COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. 2<sup>nd</sup> ed. Cape Town: Oxford University Press, 2004, p. 2137-2139.

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**, n. 120, p. 59-78, 1999.

SANCHES, E. M. C. *et al.* Occurrence of co-infection of *Pneumocystis* and Porcine Circovirus 2 in wild boar herds of Brazil. **Proceedings of the IX International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-9)**, p. 85, 2006a.

SANCHES, E. M. C. *et al.* Co-infection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* and Porcine Circovirus-2 (PCV2) in pig lungs obtained from slaughterhouses in southern and midwestern regions of Brazil. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 53, n. S1, p. S92-S94, 2006b.

SANCHES, E. M. C. *Pneumocystis* sp. e circovírus (PCV2) em pulmões de suínos de abate, procedentes dos Estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso e estudo das relações filogenéticas das amostras de *Pneumocystis* sp., p. 125. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária. Porto Alegre. RS. 2006c.

SANCHES, E. M. C. *et al.* Detection of *Pneumocystis* spp. in lung samples from pigs in Brazil. **Medical Mycology**, v. 45, n. 5, p. 395-399, 2007.

SATO, K. *et al.* Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 627-633, 2000.

SCHULZE, C. *et al.* Case report: Porcine circovirus type 2 infections in an European wild boar (*Sus scrofa*) in the state of Brandenburg, Germany. **Deutschland Tierarztl Wochenschr**, n. 110, v. 10, p. 426-428, 2003.

SEGALÉS, J. *et al.* First description of postweaning multisystemic wasting syndrome in the wild boar (*Sus scrofa*) in Europe. **Proceedings of the International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases**, p. 177-178, 2003.

SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, n. 98, p. 137-149, 2004.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G. M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. In: **Diseases of Swine**. 9<sup>th</sup> ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006, p. 299-307.

SEVERO, L. C. Pneumocistose. In: **Compêndio de pneumologia**. 2. ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1991, p. 630-636.

SING, A. *et al.* Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 38, v. 4, p. 1461-1467, 2000.

SINGHAL, R.; MIRDHA, B. R.; GULERIA, R. Human Pneumocystosis. **The Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences**, n. 47, p. 273-283, 2005.

SORDEN, S. D. *et al.* Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, n. 11, v. 6, p. 528-530, 1999.

SOULEZ, B.; DEI-CAS, E.; CAMUS, D. Le lapin, hôte experimental de *Pneumocystis carinii*. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, n. 63, v. 1, p. 5-15, 1988.

SOUZA, W. D.; BENCHIMOL, M. Basic biology of *Pneumocystis carinii* – a mini review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 100, v. 8, p. 903-908, 2005.

STRINGER, J. *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? **Clinical Microbiological Reviews**, n. 9, v. 4, p. 489-498, 1996.

STRINGER, J. Pneumocystis. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 292, p. 391-404, 2002a.

STRINGER, J. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for Pneumocystis from humans. **Emerging Infectious Diseases**, n. 8, v. 9, p. 891-896, 2002b.

TOPLAK, I. *et al.* Phylogenetic analysis of type 2 porcine circoviruses identified in wild boar in Slovenia. **Veterinary Record**, n. 155, v. 6, p. 178-180, 2004.

VICENTE, J. *et al.* Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Research**, n. 35, p. 243-253, 2004.

WAKEFIELD, A. E. *Pneumocystis carinii*. **British Medical Bulletin**, n. 61, p. 175-188, 2002.

YUEZHONG, Y.; ZENG, L.; BAOPING, T. Pneumonia in cats caused by *Pneumocystis carinii* purified from mouse lungs. **Veterinary Parasitology**, n. 61, p. 171-175, 1996.

ZLOTOWSKI, P. *et al.* Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **British Veterinary Journal**, n. 171, v. 3, p. 566-569, 2006.

**ANEXOS**

## ANEXO 1

Protocolo de teste imuno-histoquímico para detecção de *Pneumocystis* sp.:

- Xilol I por vinte minutos e xilol II por vinte minutos;
- Álcool 100% por dois minutos;
- Álcool 96% por dois minutos;
- Álcool 80% por dois minutos;
- Álcool 70% por dois minutos;
- Água destilada por dois minutos;
- Peróxido de hidrogênio 3% por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada sob agitação;
- Recuperação antigênica com tripsina 0,1% à 37°C por quinze minutos;
- Tampão citrato aquecido em água à 100°C por quinze minutos;
- Resfriamento em banho maria por cinco minutos;
- Bloqueio de reações inespecíficas com leite desnatado 5% diluído em água destilada por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Anticorpo primário diluído em Tampão Fosfato Salino (PBS) (1:100);
- Aquecimento à 37°C por doze horas;
- Lavagem com água destilada;
- Anticorpo secundário (DAKO) à temperatura ambiente por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Streptavidina (DAKO) à temperatura ambiente por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Cobrir as lâminas com cromógeno Nova Red (Vector Labs) por dez minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Contra corar as lâminas com hematoxilina por um minuto;
- Desidratação em álcool 80% por dois minutos;
- Desidratação em álcool 96% por dois minutos;
- Desidratação em álcool 100% por dois minutos;
- Xilol III por dez minutos e xilol IV por dez minutos;
- Colocação da lamínula; e,
- Leitura da técnica em microscópio.

## ANEXO 2

Protocolo de teste imuno-histoquímico para detecção de PCV2:

- Xilol I por vinte minutos e xilol II por vinte minutos;
- Álcool 100% por dois minutos;
- Álcool 96% por dois minutos;
- Álcool 80% por dois minutos;
- Álcool 70% por dois minutos;
- Água destilada por dois minutos;
- Peróxido de hidrogênio 3% por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada sob agitação;
- Recuperação antigênica com Protease XIV (Sigma) em temperatura ambiente por quinze minutos;
- Bloqueio de reações inespecíficas com leite desnatado 5% diluído em água destilada por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Anticorpo primário diluído em PBS (1:1000);
- Aquecimento à 37°C por quarenta e cinco minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Anticorpo secundário (DAKO) à temperatura ambiente por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Streptavidina (DAKO) à temperatura ambiente por vinte minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Cobrir as lâminas com cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB-DAKO) por dez minutos;
- Lavagem com água destilada;
- Contra corar as lâminas com hematoxilina por um minuto;
- Desidratação em álcool 80% por dois minutos;
- Desidratação em álcool 96% por dois minutos;
- Desidratação em álcool 100% por dois minutos;
- Xilol III por dez minutos e xilol IV por dez minutos;
- Colocação da lamínula; e,
- Leitura da técnica em microscópio.

### ANEXO 3

Protocolo Qiagen (*NucleoSpin Tissue Kit Macherey Nagel*) para extração de DNA:

- Colocar uma pequena amostra (25 mg) de tecido animal em um tubo tipo *Eppendorf* 1,5 ml;
- Adicionar 180 µl de tampão T1 e 25 µl de proteinase K;
- Misturar o conteúdo;
- Banho-maria à 56°C por aproximadamente dezesseis horas;
- Adicionar 200 µl de tampão B3;
- Misturar o conteúdo;
- Aquecer à 70°C por dez minutos;
- Misturar o conteúdo;
- Adicionar 210 µl de etanol;
- Misturar o conteúdo;
- Depositar a amostra em uma coluna Nucleospin colocada sobre um tubo tipo *Eppendorf*;
- Centrifugar à 11000 g por um minuto;
- Eliminar o líquido presente no tubo tipo *Eppendorf*;
- Adicionar 500 µl de tampão de lavagem BW;
- Centrifugar à 11000 g por um minuto;
- Eliminar o líquido presente no tubo tipo *Eppendorf*;
- Adicionar 600 µl de tampão de lavagem B5;
- Centrifugar à 11000 g por um minuto;
- Eliminar o líquido presente no tubo tipo *Eppendorf*;
- Centrifugar à 11000 g por um minuto;
- Colocar a coluna Nucleospin colocada sobre um tubo tipo *Eppendorf* 1,5 ml e adicionar 50 µl de tampão de eluição BE (pré-aquecido à 70°C);
- Incubar a temperatura ambiente por um minuto; e,
- Centrifugar à 11000 g por um minuto.



**ANEXO 4**

Protocolo de *nested*-PCR para amplificação do gene mtLSU rRNA:

*Primers* PCR I: pAZ 102-H GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA  
pAZ 102-E GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC

*Primers* PCR II: pAZ102-X GGG AAT TCG TGA AAT ACA AAT CGG ACT AGG  
pAZ102-Y GGG AAT TCT CAC TTA ATA TTA ATT GGG GAG

PCR I:

94°C por dois minutos

94°C por trinta segundos  
50°C por um minuto  
72°C por um minuto

} trinta ciclos

72°C por dez minutos

12°C

PCR II:

94°C por dois minutos

94°C por trinta segundos  
55°C por um minuto  
72°C por um minuto

} trinta ciclos

72°C por dez minutos

12°C

## ANEXO 5

Protocolo de *nested*-PCR para amplificação do gene mtSSU rRNA:

*Primers* PCR I: 10F-RI: GGG AAT TCT AGA CGG TCA CAG AGA TCA G

10R-RI: GGG AAT TCG AAC GAT TAC TAG CAA TTC C

*Primers* PCR II: 13RI: GGG AAT TCG AAG CAT GTT GTT TAA TTC G

14RI: GGG AAT TCT TCA AAG AAT/c CGA GTT T/cCA G

PCR I:

94°C por dois minutos

94°C por um minuto e trinta segundos	}	quarenta ciclos
55°C por um minuto e trinta segundos		
72°C por dois minutos		

72°C por dez minutos

12°C

PCR II:

94°C por dois minutos

94°C por um minuto e trinta segundos	}	dez ciclos
52°C por um minuto e trinta segundos		
72°C por dois minutos		

94°C por um minuto e trinta segundos	}	trinta ciclos
63°C por um minuto e trinta segundos		
72°C por dois minutos		

72°C por dez minutos

12°C

## ANEXO 6

Protocolo Qiagen (*Qiaquick Gel Extraction Kit*) para purificação de DNA para seqüenciamento:

- Depositar 40 µl de produto de PCR em um tubo tipo *Eppendorf* 1,5ml;
- Adicionar 100µl de tampão QG;
- Incubar à 50°C por dez minutos;
- Misturar o conteúdo;
- Adicionar 100 µl de isopropanol 100%;
- Depositar a amostra em uma coluna *Qiaquick*;
- Centrifugar à 13000 g por um minuto;
- Eliminar o líquido sobrenadante;
- Adicionar 500 µl de tampão QG;
- Centrifugar à 13000 g por um minuto;
- Eliminar o líquido sobrenadante;
- Adicionar 750 µl de tampão PE;
- Incubar por dois à cinco minutos;
- Centrifugar à 13000 g por um minuto;
- Eliminar o líquido sobrenadante;
- Centrifugar à 13000 g por um minuto para eliminar totalmente o etanol presente no tampão PE;
- Eliminar o líquido sobrenadante;
- Colocar a coluna *Qiaquick* sobre um tubo tipo *Eppendorf* 1,5 ml;
- Adicionar 50µl de tampão EB ;
- Incubar por um minuto;
- Centrifugar à 13000 g por um minuto; e,
- Conservar à 20°C negativos até o envio para sequenciamento.