



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

**DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A E CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM
SUÍNOS DE ABATE, NO SUL DE MOÇAMBIQUE**

CLÁUDIO JOÃO MOURÃO LAISSE

PORTO ALEGRE

2017

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

**DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A E CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM
SUÍNOS DE ABATE, NO SUL DE MOÇAMBIQUE**

Autor: Cláudio João Mourão Laisse

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Patologia.

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

PORTO ALEGRE

2017

L189d Laisse, Cláudio João Mourão

Detecção do vírus Influenza A e Circovirus suíno tipo 2 em suínos de abate, no sul de Moçambique. / Cláudio João Mourão Laisse. – Porto Alegre: UFRGS, 2017.

97 f. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2017. David Driemeier, Orient.

1. Doenças dos suínos: virologia 2. Doenças dos suínos: patologia
3. PCR: veterinária 4. Cidade da Matola I. Driemeier, David, Orient.
II. Título

CDD 619.6026

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

CLÁUDIO JOÃO MOURÃO LAISSE

**DETECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A E CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 EM
SUÍNOS DE ABATE, NO SUL DE MOÇAMBIQUE**

Aprovado em 03 de fevereiro de 2017

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da comissão

Prof. Dr. Cláudio Severo Lombardo de Barros

Prof. Dra. Laura Lopes de Almeida

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas que sempre me apoiam e incentivam a seguir em frente:

À minha filha *Naira*

À minha esposa *Delta*

Aos meus pais *Teresa e Joaquim*

Aos meus irmãos *Sheila, Gerdes, Gercia e Edson*

AGRADECIMENTOS

Louvor a DEUS por me conceder saúde e fazer acreditar que com vontade e dedicação, é possível alcançar metas.

Ao longo dos quatro anos do doutorado, várias pessoas, de diferentes maneiras, deram o seu apoio. Gostaria de agradecer a todos que direta ou diretamente, tornaram possível esta etapa:

As minhas meninas, Naira Teresa Laisse (minha filha) e Delta Chongola (minha esposa) pelo apoio incondicional e motivação para que estivesse sempre firme durante esta etapa acadêmica. Foi um período em que tivemos muita paciência e coragem para enfrentar os desafios impostos pela ausência, distância, tempo e saudade. Obrigado por tudo!

Aos meus pais, Teresa Sarmiento e Joaquim Laisse, pela atenção, incentivo, apoio e por sempre, me ensinarem que vale a pena ser educado e alfabetizado. Aos meus irmãos, Edson, Gércia, Gerdes e Sheila, pela amizade, apoio e atenção. Aos meus primos Albertina, Carolina e Zefanias, pela amizade e incentivo desde a infância.

Ao meu orientador, o Professor David Driemeier, por ter me dado à oportunidade de ser seu orientado. O Professor conseguiu me inspirar e ensinar atributos fundamentais para ser um patologista.

Aos Professores Luciana Sonne e Saulo Pavarini, por todos os segundos terem se mostrado disponíveis para orientar e ensinar. Ao Prof. David Barcellos, pelo fato de, os conhecimentos transmitidos durante as aulas de clínica de suínos, terem me inspirado a desenvolver o projeto de pesquisa do doutorado.

Aos estagiários, residentes, mestrandos, doutorandos, pós-doutorados, técnicos e funcionários do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, pela amizade e disponibilidade para compartilhar conhecimento. Todos os colegas com quem convivi entre março de 2013 e fevereiro de 2017 foram amigáveis.

Agradecimento particular para os colegas Cíntia de Lorenzo, Matheus Bianchi e Paula Reis, por sua colaboração ativa no projeto da tese. Lauren de Melo e Andrei Vielmo, muito obrigado pelo apoio na revisão linguística da tese.

Agradecimento especial para a colega Verônica Rolim e sua família, por terem me proporcionado um ambiente familiar e inesquecível, no dia da minha chegada a Porto

Alegre. Tenho muito apreço pela amizade que vossa família me dedicou, durante a estadia em terra Gaúcha.

Aos Professores Alberto Pondja, Custódio Bila e Mário Elias, pelas palavras de incentivo e recomendação na fase de concurso para a bolsa de estudos.

Aos colegas da Secção de Patologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da UEM, pela atenção e apoio, em particular, ao Dércio Nhambir, Gabriel Chaúque e Leonardo Ngoca, pela colaboração no processamento histológico das amostras.

A direção do Matadouro Bom Suíno por ter autorizado a coleta de amostras, e aos colaboradores do matadouro, e em especial ao Neto Bernardo (inspetor) e Bilda Maibaze (estagiária) pela amizade e disponibilidade em ajudar, durante a coleta de amostras.

Aos colegas Lourenço Mapaco e Iolanda Monjane, do Laboratório Central de Veterinária de Moçambique, pela colaboração na extração do DNA das amostras.

A Carine Kunzler Souza e Professor Cláudio Canal, do Laboratório de Virologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pela colaboração na execução das técnicas de biologia molecular.

A comunidade moçambicana em Porto Alegre, pela amizade e companheirismo. Os minutos de convívio acadêmico, social e desportivo foram fundamentais para sentir Moçambique mais próximo. Um especial agradecimento ao amigo Eufrásio Nhongo pelo apoio no esboço do mapa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil e The World Academy of Sciences (TWAS) – pela bolsa de estudos concedida, no âmbito do edital “CNPq-TWAS Fellowships Programme 2012”.

EPIGRAFE

“A vida é feita de etapas e para alcançarmos cada meta, temos que planificar e nos dedicar. Chegar ao fim de uma etapa é motivo para comemorar, mas também, deve servir para refletir e perspectivar os desafios do futuro”.

C. J. M. Laisse

RESUMO

Os vírus influenza A (VIA) e circovírus suíno tipo 2 (PCV2) são os agentes etiológicos da influenza suína (IS) e da circovirose suína (CS), respectivamente. Estas doenças têm um impacto econômico significativo na suinocultura mundial. Adicionalmente, o VIA pode ser transmitido entre animais e humanos, sendo por isso, importante para a saúde pública. O presente trabalho teve o objetivo de pesquisar a ocorrência desses vírus em suínos de abate no sul de Moçambique. As amostras foram coletadas em um abatedouro na cidade da Matola, nos períodos de dezembro de 2014 a fevereiro de 2015 e dezembro de 2015 a fevereiro de 2016. Os materiais e métodos aplicados e resultados obtidos estão apresentados em dois artigos científicos. O primeiro relata a infecção pelo VIA associada à caracterização anatomopatológica e imuno-histoquímica (IHQ) das lesões pulmonares. Foram avaliados 457 pulmões de suínos, e amostras de 38 (8.3%) pulmões, que apresentaram áreas de consolidação, foram coletadas e submetidas ao exame histopatológico e IHQ para a detecção de antígenos do VIA, PCV2 e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Antígenos do VIA foram detectados em 32/38 (84.3%) dos pulmões com pneumonia através da IHQ, e os suínos positivos eram provenientes dos distritos de Matutuine (5/32), Moamba (2/32), Namaacha (21/32), Boane (3/32) e Cidade da Matola (1/32). Todos os pulmões com pneumonia foram negativos no exame de IHQ para PCV2 e *M. hyopneumoniae*. O segundo artigo teve o objetivo de detectar lesões histológicas, antígenos e DNA de PCV2 em linfonodos mesentéricos de suínos e realizar a caracterização filogenética de isolados de PCV2 circulantes no sul de Moçambique. Foram coletados aleatoriamente 111 linfonodos mesentéricos de suínos de abate provenientes de nove distritos do sul de Moçambique. As amostras foram submetidas ao exame histopatológico, IHQ e reação em cadeia da polimerase (PCR). Uma amostra positiva para PCV2 na PCR de cada distrito (n=9) foi selecionada aleatoriamente e submetida ao sequenciamento da região aberta de leitura ORF2. DNA de PCV2 foi detectado em 53.8% (62/111) das amostras e em 73.8% de granjas dos nove distritos. No exame de IHQ, linfonodos mesentéricos de seis suínos positivos para PCV2 na PCR apresentaram antígenos desse vírus associados à depleção linfoide e infiltrado de histiócitos e células gigantes multinucleadas. Na análise filogenética, sequências dos isolados dos distritos de Namaacha, Moamba e Maputo ficaram agrupadas no genótipo PCV2d-2; as sequências de isolados dos distritos de Manhiça e Matola, no genótipo PCV2d-1; enquanto os isolados dos distritos de Boane, Matutuine, Chibuto e Xai-Xai, no genótipo PCV2b-1A/B. Os resultados do trabalho permitem concluir que o VIA e PCV2 circulam na população suína em vários distritos da região sul de Moçambique.

Palavras-chave: Cidade da Matola, doenças dos suínos, diagnóstico, PCR.

ABSTRACT

Influenza A virus (IAV) and porcine circovirus type 2 (PCV2) are the etiological agents of swine influenza (SI) and porcine circovirus associated diseases (PCVAD) respectively. These diseases represent a significant economic impact on pig production worldwide. In addition, IAV can be transmitted between animals and humans with consequences for public health. The objective of this study was to investigate the occurrence of these viruses in slaughter pigs in Southern Mozambique. Samples were collected in a slaughterhouse in Matola city, from December 2014 to February 2015 and December 2015 to February 2016. The materials and methods applied and the results obtained are presented in two manuscripts. The first article reports IAV infection in pigs and characterize the anatomopathological and immunohistochemical features of the associated lung lesions. Lungs from 457 slaughtered pigs were evaluated grossly, and samples from 38 (8.3%) of these that presented pulmonary consolidation were collected and examined for histopathology and immunohistochemistry (IHC) for the presence of IAV, PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens. IAV antigens were detected in 32/38 (84.3%) of pneumonic lungs, and positive pigs were from Matutuine district (5/32), Moamba district (2/32), Namaacha district (21/32), Boane district (3/32) and Matola City (1/32). All lung samples were immunohistochemically negative for PCV2 and *M. hyopneumoniae*. The second article aimed to detect histological lesions, PCV2 antigens and DNA and perform phylogenetic analysis of PCV2 strains circulating in Southern Mozambique. At slaughter, mesenteric lymph nodes were collected from 111 randomly selected pigs from nine districts of Southern Mozambique. Samples were submitted to histopathological examination, IHC and polymerase chain reaction (PCR). One PCV2 PCR positive sample from each district (n=9) was randomly selected in order to obtain sequences covering the ORF2 region. PCV2 DNA was detected in 53.8% (62/111) of the samples and 73.8% of the farms from all nine districts. PCV2 antigen was detected by IHC in six lymph nodes that were positive for PCV2 by PCR and antigens were associated with lymphoid depletion and infiltrate of histiocytes and multinucleated giant cells. Phylogenetic analysis demonstrated that three sequences from Maputo, Namaacha and Moamba were grouped with PCV2d-2, two sequences from Manhiça and Matola were grouped as PCV2d-1, and four sequences from Boane, Matutuine, Chibuto, and Xai-Xai were closely related to PCV2b-1A/B genotypes. The results of this study indicate that IAV and PCV2 circulate in the swine population in several districts of the southern region of Mozambique.

Key words: Matola City, diseases of swine, diagnostic, PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Evolução do rebanho suíno em Moçambique, entre 2002 e 2012.....	17
Figura 2.	Mapa de Moçambique com a localização da cidade da Matola.....	19
Figura 3.	Diagrama da estrutura do VIA, ilustrando o envelope viral e os oito segmentos de RNA.....	22
Figura 4.	Amostras (a), resultados (b) e técnicas laboratoriais (c) para o diagnóstico de influenza em suínos.....	30
Figura 5.	Países onde a SMDS já foi diagnosticada.....	36
Figura 6.	Cofatores que influenciam a progressão da infecção por PCV2 em doença clínica.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Segmentos gênicos do VIA, proteínas codificadas e respectivas funções.....	23
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Ácido siálico
CAP	Censo Agropecuário
CDRS	Complexo de doença respiratória dos suínos
cH1N1	Vírus H1N1 clássico
CS	Circovirose suína
DAPCV2	Doenças associadas ao PCV2
DCA	Direção de Ciências Animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
HA	Hemaglutinina
HI	Hemaglutinação
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IS	Influenza suína
LCV	Laboratório Central de Veterinária
NA	Neuramidase
nm	Nanômetros
NP	Nucleoproteína
OFFLU	Rede de especialistas em influenza animal
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	Região aberta de leitura
PB	Polimerase básica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCV1	Circovírus suíno tipo 1
PCV2	Circovírus suíno tipo 2
PRRS	Síndrome respiratória e reprodutiva suína
PRRSV	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína
PSA	Peste suína africana
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína

RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
SDNS	Síndrome da dermatite e nefropatia suína
SMDS	Síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos
SPV	Setor de Patologia Veterinária
TIA	Trabalho de inquérito agrícola
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIG	Gene interno de rearranjo triplo
UEM	Universidade Eduardo Mondlane
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VI	Vírus influenza
VIA	Vírus influenza A

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.	Suinocultura em Moçambique.....	17
1.2.	Locais onde foi realizada a pesquisa.....	19
2.	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	20
2.1	Hipótese.....	20
2.2	Objetivos.....	20
2.2.1	Geral.....	20
2.2.2	Específicos.....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1.	Influenza suína.....	21
3.1.1.	Histórico.....	21
3.1.2.	Etiologia.....	21
3.1.3.	Distribuição geográfica dos subtipos do VIA em suínos.....	24
3.1.4.	Influenza suína e saúde pública.....	26
3.1.5.	Transmissão.....	27
3.1.6.	Patogenia.....	27
3.1.7.	Sinais clínicos.....	28
3.1.8.	Patologia.....	29
3.1.9.	Diagnóstico.....	30
3.1.10.	Prevenção e controle.....	32
3.2.	Circovirose suína.....	34
3.2.1.	Histórico.....	34
3.2.2.	Taxonomia e características morfológicas.....	34
3.2.3.	Variação genética de PCV2.....	35
3.2.4.	Doenças associadas ao PCV2.....	36
3.2.5.	Transmissão.....	37
3.2.6.	Patogenia.....	37
3.2.7.	Fatores que influenciam a progressão da infecção por PCV2 em doença clínica.....	39
3.2.7.1.	Coinfecção.....	40
3.2.7.2.	Imunomodulação.....	40
3.2.7.3.	Estirpes vírais.....	40
3.2.7.4.	Hospedeiro.....	41
3.2.7.5.	Manejo.....	41
3.2.8.	Sinais clínicos.....	42
3.2.9.	Patologia.....	43
3.2.9.1.	Lesões macroscópicas.....	43

3.2.9.2.	Lesões microscópicas.....	44
3.2.10.	Diagnóstico.....	45
3.2.11	Prevenção e controle.....	47
4.	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	49
4.1.	Artigo 1. Infecção pelo vírus influenza A em suínos de Moçambique...	50
4.2.	Artigo 2. Detection and phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs in Mozambique.....	61
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6.	REFERÊNCIAS.....	79
7.	ANEXOS.....	93

1. INTRODUÇÃO

A tecnificação da suinocultura, implica o confinamento e aumento da densidade de suínos por metro quadrado, o que favorece a transmissão de agentes patogênicos como vírus e bactérias (OPRIESSNIG *et al.*, 2011). As doenças respiratórias se destacam como uma das principais causas de perdas econômicas, relacionadas à sanidade dentro de uma unidade de produção de suínos (VAN ALSTINE, 2012). Alguns dos agentes etiológicos do complexo de doença respiratória dos suínos (CDRS) são o vírus influenza A (VIA) e o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (CHOI; GOYAL; JOO, 2003; HANSEN *et al.*, 2010a; OPRIESSNIG *et al.*, 2011).

O VIA e PCV2 apresentam distribuição mundial, sendo que, o primeiro é o agente etiológico da influenza suína (IS), também denominada gripe suína (BROWN, 2000; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012), enquanto o PCV2 é o agente etiológico da circovirose suína (CS) (OPRIESSNIG *et al.*, 2007). Essas doenças causam perdas econômicas significativas na suinocultura, reduzindo a conversão alimentar, o ganho de peso, o incremento de custos com o tratamento e a morte de suínos (ALARCON; RUSHTON; WIELAND, 2013; CHIEK *et al.*, 2014). Adicionalmente, o VIA pode ser transmitido entre animais e humanos, e por isso, é importante na saúde pública (MYERS; OLSEN; GRAY, 2007; SONG *et al.*, 2010).

O VIA é um vírus RNA, da Família Orthomyxoviridae e os subtipos de VIA considerados enzoóticos para suínos são o H1N1, H1N2 e H3N2 (VAN REETH *et al.*, 2008; VINCENT *et al.*, 2008; JANKE, 2014). Contudo, o suíno também pode infectar-se com subtipos de VIA originários de diferentes hospedeiros, como o homem e aves, sendo por isso, um hospedeiro importante na epidemiologia da infecção pelo vírus (ITO *et al.*, 1998). A partir de 2009, vários estudos descrevem a infecção de suínos pelo VIA pandêmico (H1N1) 2009 (H1N1pdm2009) (WELSH *et al.*, 2010; VALHEIM *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2011; ADEOLA; OLUGASA; EMIKPE, 2015). A IS é diagnosticada em suínos de diferentes faixas etárias e causa um quadro respiratório agudo com alta morbidade, porém baixa mortalidade (WELSH *et al.*, 2010; CASWELL; WILLIAMS, 2016). Suínos infectados pelo VIA apresentam lesão pulmonar caracterizada por áreas de consolidação cranioventral (JANKE, 2014; LYOO *et al.*, 2014).

Por outro lado, a CS é uma doença multifatorial associada à infecção por PCV2 (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007), um vírus DNA de cadeia simples e circular,

membro da família Circoviridae (SEGALÉS *et al.*, 2005). PCV2 é classificado nos genótipos PCV2a, PCV2b, PCV2c e PCV2d (XIAO *et al.*, 2015) e, atualmente, o PCV2b tem sido mais envolvido em doenças associadas ao PCV2 (DAPCV2) (DUPONT *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2014).

A maioria dos suínos infectados por PCV2 apresentam manifestação subclínica (SEGALÉS, 2012), contudo, o vírus está associado a diversas manifestações clínicas, que incluem a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS), doença respiratória, enterite, falhas reprodutivas e síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS) (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2012). A SMDS é a que representa maiores perdas econômicas a nível mundial e foi pela primeira vez associada à infecção por PCV2 em 1991, no Canadá e posteriormente, amplamente descrita na Europa, Ásia, América do sul, Estados Unidos da América e Oceania (SEO *et al.*, 2014).

A SMDS é uma doença sistêmica que afeta, principalmente, leitões desmamados, mas é também diagnosticada em suínos na fase de terminação (HANSEN *et al.*, 2010b; VALLI *et al.*, 2016). As lesões características são observadas, principalmente, nos órgãos linfoides (ROSELL *et al.*, 1999; HANSEN *et al.*, 2010b). Suínos acometidos pela SMDS apresentam imunodepressão e são mais susceptíveis à infecção por outros agentes (NUNEZ *et al.*, 2003).

Lesões características de IS e CS podem ser detectadas em suínos no abate (HANSEN *et al.*, 2010b; VALHEIM *et al.*, 2011). A monitoria de abate permite quantificar o efeito de enfermidades que são observadas clinicamente ou que se suspeita estarem presentes na forma subclínica ou crônica. Ainda, os dados da monitoria de abate, associadas a resultados de exames laboratoriais possibilitam a elaboração de medidas sanitárias e avaliação de resultados de programas de controle de doenças (SOBESTIANSKY *et al.*, 2012).

O diagnóstico presuntivo da IS e CS pode ser obtido com base na epidemiologia, sinais clínicos e lesões macroscópicas observadas em suínos de abate ou na necropsia. Contudo, o diagnóstico definitivo é obtido após isolamento viral e detecção de antígenos ou material genético dos vírus, através de imuno-histoquímica (IHQ) e técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) (SEGALÉS; DOMINGO, 2002; KIM; CHAE, 2004; SCHAEFER *et al.*, 2013). O objetivo geral deste trabalho foi pesquisar a ocorrência do VIA e PCV2, em suínos de abate, em Moçambique.

1.1. Suinocultura em Moçambique

Em Moçambique, a atividade pecuária desempenha um papel importante para a população rural, onde 65% das famílias rurais criam galinhas, 25% possuem pequenos ruminantes (sobretudo caprinos), 12% tem suínos e 6% criam bovinos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DE MOÇAMBIQUE, 2011). Entre os anos de 2002 e 2012, o efetivo de suínos em Moçambique oscilou, mas com tendência a aumentar entre os anos de 2006 e 2012 (figura 1) (MACHEL e MASSINGUE, 2013). Em 2015, a população suína moçambicana era estimada em 1.588,325 animais (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, 2016). Uma das principais limitantes para a produção de suínos no país é a peste suína africana (PSA) (MATOS *et al.*, 2011). Surto desta doença já foram reportados em todas as províncias do país (PENRITH *et al.*, 2007) e são responsáveis pelo fraco crescimento do efetivo suíno em Moçambique. Outro fator limitante da produção suína em Moçambique é a fraca produção de cereais que torna deficiente a disponibilidade de insumos para a produção de rações.

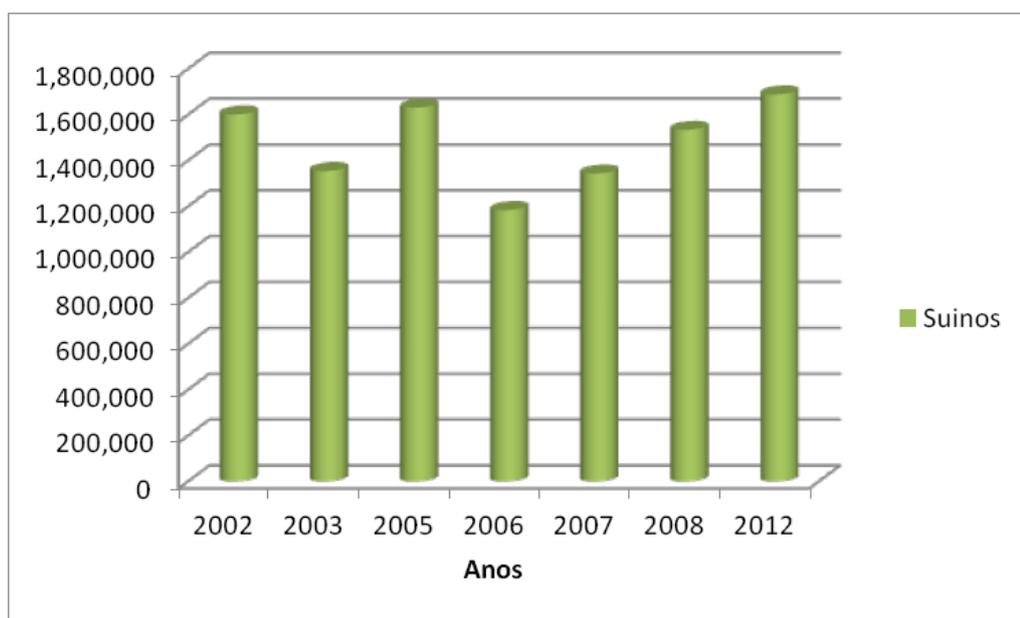


Figura 1. Evolução do rebanho suíno em Moçambique, entre 2002 e 2012. Fonte: MACHEL e MASSINGUE (2013).

Em Moçambique, as granjas produtoras de suínos são classificadas de acordo com o número de animais que possuem. São consideradas pequenas (com ≤ 50 suínos), médias (com 50 a 500 suínos) e grandes quando possuem mais de 500 suínos) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E SEGURANÇA ALIMENTAR, 2015). Segundo

o Censo Agropecuário (CAP) 1999-2000, a porcentagem de suínos em granjas pequenas, médias e grandes era, respectivamente de 98,95%, 0,98% e 0,16% do efetivo nacional (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, 2001), enquanto que, no CAP 2009-2010, a porcentagem de suínos em granjas médias registrou um ligeiro aumento, tendo representado 1,71% do efetivo suíno (INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA, 2011).

As granjas pequenas estão associadas ao setor familiar e se caracterizam por aplicar um sistema de criação extensivo, em que os suínos, geralmente de raças locais (raça landim) pastam ou são confinados em instalações precárias (PONDJA *et al.*, 2010; PHENGSAVANH *et al.*, 2011). Por outro lado, as médias e grandes explorações são comerciais e investem no alojamento, alimentação, raças melhoradas e sanidade dos rebanhos. Em vários países africanos, incluindo Moçambique, os suínos de pequenas explorações, geralmente são abatidos de forma doméstica, ou em abatedouros sem inspeção veterinária (PONDJA *et al.*, 2010), enquanto que, as médias e grandes explorações, geralmente, fazem o abate dos suínos em abatedouros com inspeção veterinária.

Contrariamente ao observado na Europa, Estados Unidos da América, América do Sul e Ásia, dados sobre a ocorrência do VIA e PCV2 em países da África, são escassos ou inexistentes (MESEKO *et al.*, 2013; SORIA, 2014). Na África, a IS foi descrita na Nigéria, Camarões, Togo e Gana (AIKI-RAJI *et al.*, 2004; NJABO *et al.*, 2010; DUCATEZ; AWOUME; WEBBY, 2015; ADEOLA; OLUGASA; EMIKPE, 2015). Por outro lado, a detecção de PCV2 na população suína foi apenas descrita na África do Sul (DREW *et al.*, 2004) e Uganda (OJOK *et al.*, 2013). Em Moçambique não há dados publicados sobre a ocorrência do VIA e PCV2 na população suína, pelo que, o presente trabalho teve o objetivo de pesquisar a ocorrência desses vírus em suínos de abate, na região sul de Moçambique. A pesquisa foi desenvolvida em suínos de abate devido à escassa casuística de necropsias de suínos, nos laboratórios de Patologia Veterinária em Moçambique. A detecção do VIA foi realizada em amostras de pulmão de suínos com pneumonia (Artigo 1; Anexo 1: planilha 1) e a detecção de PCV2 em linfonodos mesentéricos (Artigo 2; Anexo 1: planilha 2; Anexo 2). Os resultados do trabalho fornecerão dados preliminares que vão impulsionar o desenvolvimento de pesquisas sobre a prevalência, ocorrência de casos clínicos e aspectos moleculares do VIA e PCV2 na população suína em Moçambique.

1.2. Locais onde foi realizada a pesquisa

As amostras foram coletadas em um abatedouro de suínos localizado na Cidade da Matola (25° 55' 26" S, 32° 27' 57" E), Província de Maputo, na região Sul de Moçambique (figura 2). O processamento histológico, até a inclusão das amostras em blocos de parafina e a extração de DNA das amostras foram realizados, respectivamente, na Secção de Anatomia Patológica da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane (UEM) e no Laboratório Central de Veterinária (LCV) da Direção de Ciências Animais (DCA), Maputo, Moçambique. Amostras de tecidos emblocados em parafina e DNA extraído foram transportados de Moçambique para o Brasil (Anexos 3: Certificados sanitários). A coloração das lâminas histológicas, técnicas de IHQ e PCR foram realizadas nos Setores de Patologia Veterinária (SPV) e Setor de Virologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.



Figura 2. Mapa de Moçambique com a localização da cidade da Matola (★). Fonte:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Mo%C3%A7ambique>

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1. Hipótese

1. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar a hipótese de que, o VIA e PCV2 ocorrem no rebanho suíno moçambicano.

2.2. Objetivos

2.2.1. Geral

1. Caracterizar as lesões anatomopatológicas e, através das técnicas de imunohistoquímica e PCR, detectar antígenos do VIA e PCV2 e DNA de PCV2, em suínos de abate, no Sul de Moçambique.

2.2.2. Específicos

1. Determinar a frequência e severidade de casos de pneumonias em suínos de abate.
2. Caracterizar as lesões histológicas e detectar antígenos do VIA em pulmões com pneumonia.
3. Pesquisar a ocorrência de lesões histopatológicas, antígenos e DNA de PCV2 em linfonodos mesentéricos, de suínos de abate.
4. Caracterizar filogeneticamente os PCV2 detectados em suínos de alguns distritos do Sul de Moçambique.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Influenza suína

3.1.1. Histórico

A manifestação clínica de IS foi reconhecida pela primeira vez nos Estados Unidos da América, durante a pandemia de “Gripe Espanhola” de 1918-1919 (BROWN, 2000). O veterinário J. S. Koen foi o primeiro a descrever a doença, ao observar que, os sinais clínicos apresentados por suínos, eram similares aos apresentados por humanos. O vírus foi isolado e identificado pela primeira vez em 1930 e pertencia ao subtipo H1N1 (REID *et al.*, 1999). O vírus influenza de suínos foi isolado pela primeira vez em humanos em 1974, confirmando uma antiga especulação de que este vírus poderia infectar humanos (MYERS; OLSEN; GRAY, 2007).

3.1.2. Etiologia

Os agentes etiológicos da influenza são os vírus influenza (VI), membros da Família Orthomyxoviridae (do grego *orthos*: padrão, ordenado; e *myxo*: muco), a qual abriga patógenos humanos e animais, associados com infecções respiratórias (FLORES *et al.*, 2007). A família compreende cinco gêneros: influenza A, influenza B, influenza C, Thogotovirus e Isavirus (KING *et al.*, 2011). Os vírus dos gêneros influenza A, B e C são distinguidos com base nas diferenças antigênicas encontradas nas proteínas do nucleocapsídeo e da matriz. Influenza A abriga vírus que causam influenza em suínos, equinos, humanos, e outras espécies e tem sido responsável pelas grandes pandemias. O gênero influenza B é representado apenas por isolados humanos, enquanto o gênero influenza C abriga vírus que tradicionalmente só eram isolados em humanos, porém a infecção natural também já foi demonstrada em suínos. Esses vírus causam infecções respiratórias brandas e não possuem impacto na saúde pública (FLORES *et al.*, 2007; CASWELL; WILLIAMS, 2016).

O VIA tem forma esférica, com 80-120 nm de diâmetro, envelopado, com genoma viral RNA de fita simples e orientação negativa e segmentado. Seu genoma é constituído por oito segmentos que apresentam entre 890 e 2341 nucleotídeos e codificam 11 proteínas (figura 3 e tabela 1) (WEBSTER *et al.*, 1992; KNIPE *et al.*, 2007).

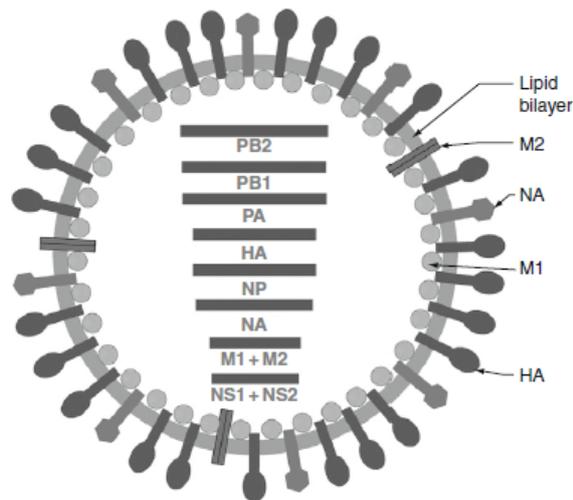


Figura 3. Diagrama da estrutura do VIA, ilustrando o envelope viral e os oito segmentos de RNA. Fonte: VINCENT *et al.* (2008).

O envelope lipídico viral deriva da membrana plasmática da célula hospedeira e logo abaixo dele, encontra-se a proteína da matriz 1 (M1), que é a proteína viral mais abundante. As glicoproteínas de superfície, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) projetam-se do envelope lipídico e são os principais alvos da resposta imune do hospedeiro (VINCENT *et al.*, 2008). O terceiro componente do complexo glicoproteico da partícula do VI é a proteína da matriz 2 (M2), que serve como canal de cálcio (KNIPE *et al.*, 2007). Moléculas de nucleoproteína (NP) envolvem e protegem o RNA viral formando o complexo ribonucleoproteína (RNP). Associado ao RNP está o complexo RNA polimerase, que consiste em três polimerases (polimerase básica 1 - PB1, polimerase básica 2 - PB2 e polimerase ácida - PA) (KLUMPP; RUIGROK; BAUDIN, 1997). Os segmentos gênicos dos vírus Influenza A, respectivas proteínas virais e suas funções estão descritos na tabela 1.

A estrutura segmentada do genoma do VI permite que dois vírus que infectam a mesma célula de um hospedeiro possam trocar segmentos de RNA, durante a replicação do vírus, um processo denominado rearranjo/ressortimento ou “*antigenic shift*” (ZANELLA; BRENTANO, 2012; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). O genoma do VI também pode sofrer recombinação gênica, a qual é um processo que consiste na troca de informação genética que ocorre quando a polimerase muda o molde ou, quando segmentos de ácido nucléico são quebrados e reunidos. A baixa fidelidade da RNA polimerase e sua inabilidade de correção de erros resulta do acúmulo de mutações pontuais, dando origem à mutação ou “*antigenic drift*” (HAMPSON, 2002). O

rearranjo, recombinação genética e mutação pontual garantem a constante evolução e ampla diversidade genética do VI (WEBSTER *et al.*, 1992).

Tabela 1. Segmentos gênicos do VIA, proteínas codificadas e respectivas funções.

Segmento	Proteína viral e sua função
1	PB2: Componente do complexo da polimerase viral; participa do processo de transcrição e replicação.
2	PB1: Componente do complexo da polimerase viral possui atividade de endonuclease e alongamento
	PB1-F2: Fator de virulência; indução de apoptose
3	PA: Componente do complexo da polimerase viral e participa no processo de transcrição e replicação
4	HA: importante fator de tropismo viral; receptor de ligação; atividade de fusão
5	NP: Ligação e síntese de RNA viral
6	NA: Glicoproteína de superfície; atividade de sialidase
7	M1: Proteína da matriz; interação com as RNPs virais e glicoproteínas
	M2: Proteína de membrana; forma o canal iônico
8	NS1: Proteína não-estrutural multifuncional, antagonista de interferon
	NS2: Proteína não-estrutural de exportação nuclear dos RNPs virais

Fonte: Adaptado de FLORES *et al.* (2007); VINCENT *et al.* (2008) e PLESCHKA (2013).

Existem 16 subtipos de HA e nove subtipos de NA, antigenicamente e geneticamente distinguíveis. A combinação entre estas proteínas de superfície, definem o subtipo do vírus, por exemplo, H1N1 ou H2N3 (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). O sistema atual de nomenclatura dos isolados do VIA é dado na seguinte ordem: tipo/ espécie de origem (omite-se no caso dos humanos); local de isolamento; número do isolado/ano de isolamento; seguido pela descrição entre parênteses do subtipo de HA e NA (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Como exemplo, pode-se citar o isolado A/swine/Minnesota/226128/2010(H1N1): vírus influenza tipo A, subtipo H1N1, isolado de um suíno em Minnesota (Estados Unidos da América) no ano de 1998 (DUCATEZ *et al.*, 2011).

As glicoproteínas virais HA intermedeiam a ligação entre o vírion e os receptores de ácido siálico (AS) associados às células do hospedeiro e são o principal alvo da indução de anticorpos neutralizantes (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Os dois tipos de ligação química que mantém o AS associado às glicoproteínas são: α 2,3 e α 2,6. O intestino de aves contém AS predominantemente com ligação do tipo α 2,3, enquanto que, a traqueia humana contém ligações do tipo α 2,6. Por outro lado,

suínos possuem em seu trato respiratório moléculas de AS tanto com receptores $\alpha 2,3$ como $\alpha 2,6$, e, por isso, podem ser infectados pelo VIA de origem humana e aviária. Esta particularidade dos suínos, torna esta espécie um “recipiente de ressortimento” entre vírus aviários e de mamíferos (BROWN, 2000; FLORES *et al.*, 2007).

3.1.3. Distribuição geográfica dos subtipos do VIA em suínos

O VIA apresenta distribuição mundial e a IS é considerada endêmica na maioria dos países produtores de suínos, contudo, a distribuição dos subtipos e genótipos do vírus varia em diferentes regiões geográficas (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Os suínos são considerados portadores dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 (VINCENT *et al.*, 2008; ZANELLA; BRENTANO, 2012; JANKE, 2014). Adicionalmente, a partir do ano 2009 o vírus H1N1pdm2009 foi detectado na população suína, pela primeira vez no Canadá (HOWDEN *et al.*, 2009) e subsequentemente nos Estados Unidos da América (DUCATEZ *et al.*, 2011), Europa (WELSH *et al.*, 2010; VALHEIM *et al.*, 2011), América do sul (PEREDA *et al.*, 2010; SCHAEFER *et al.*, 2011a; RAJÃO *et al.*, 2013a), Ásia (ZHOU *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012) e África (DUCATEZ; AWOUME; WEBBY, 2015; ADEOLA; OLUGASA; EMIKPE, 2015).

Na Europa, os subtipos H1N1 e H3N2 do VIA foram amplamente descritos associados a doença respiratória e incluem o H1N1 suíno, H1N1 aviário “(avian like)” e H3N2 humano “(human like)”. Um estudo desenvolvido em suínos com doença respiratória aguda na Bélgica, Reino Unido, Itália, França e Espanha entre 2006 e 2008, constatou que em um total de 167 isolados, 81 foram classificados como influenza H1N1 aviário, 36 como H3N2 humano e 47 como H1N2 humano (KYRIAKIS *et al.*, 2011). Em outra pesquisa, a soroprevalência dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 era alta ($\geq 30\%$) ou muito alta ($\geq 50\%$) na Bélgica, Alemanha, Itália e Espanha e vários suínos apresentaram, concomitantemente, anticorpos específicos para dois ou três subtipos do VIA. Por outro lado, em países europeus com suinocultura menos tecnificada, como a Irlanda, República Tcheca e Polônia, o H1N1 foi o subtipo viral dominante (8.0-11.7% de soropositividade) enquanto que, anticorpos para os subtipos H1N2 e H3N2 foram raros (0-4.2% de soropositividade) (VAN REETH *et al.*, 2008). Na Europa, o vírus H1N1pdm2009 foi identificado em países como Noruega (VALHEIM *et al.*, 2011) e Irlanda do Norte (WELSH *et al.*, 2010).

Nos EUA, o vírus H1N1 clássico (cH1N1) foi a principal causa de IS até 1998. Desde o surgimento do VIA H3N2 triplo-recombinante contendo uma combinação única de genes internos, conhecida como “gene interno de rearranjo triplo” ou TRIG (triple reassortment gene cassette), houve um aumento na taxa de mudanças genéticas em isolados de VIA da América do Norte (ZANELLA; BRENTANO, 2012). Outro vírus do subtipo H3N2, porém com rearranjo duplo, também surgiu no final da década de 90, mas somente o vírus de rearranjo triplo se estabeleceu na população de suínos (WEBBY *et al.*, 2000). Em uma pesquisa realizada com um total de 360 amostras positivas para o VIA, os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 foram identificados em 200, 13 e 139 amostras, respectivamente, enquanto que oito amostras apresentaram coinfeção entre os subtipos H1N1 e H3N2 (CHOI *et al.*, 2002).

A China é um país chave na epidemiologia do VIA na Ásia, devido à elevada densidade populacional de humanos de suínos e também, às práticas de manejo aplicadas (ZANELLA; BRENTANO, 2012). Isolados do VIA na China, incluem, cH1N1, H1N1pdm2009, H3N2 da Eurásia, H3N2 de origem humana, H1N1 da Eurásia, entre outros (ZHOU *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2014). Os subtipos do VIA predominantes na Coreia do sul são o H1N1, H1N2 e H3N2 (LYOO *et al.*, 2014), contudo, neste país, o vírus H1N1pdm2009 também já foi detectado na população suína (HAN *et al.*, 2012). Na Tailândia, circulam os vírus H3N2 e H1N1 e esses são relacionados a linhagens do H3N2 e H1N1 encontrados na Europa (VINCENT *et al.*, 2014).

Na América do Sul, linhagens humanas dos subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 foram detectados na Argentina (CAPPUCIO *et al.*, 2011; PEREDA *et al.*, 2011). Em 2009 e 2010, vírus com genes internos do H1N1pdm09 e genes de superfície do vírus humano da América do Norte também foram isolados em rebanhos suínos na Argentina (PEREDA *et al.*, 2010). Estudos sorológicos realizados em suínos de 10 estados brasileiros, identificaram anticorpos contra os vírus H3N2 humano e H1N1 humano, sendo que, o primeiro apresentou uma prevalência maior (BRENTANO *et al.*, 2002). Neste país, o vírus H1N1pdm09 foi isolado em suínos de vários estados (SCHAEFER *et al.*, 2011; RAJÃO *et al.*, 2013a).

Na África, dados sobre a ocorrência do VIA em suínos são escassos ou inexistentes em vários países (MESEKO *et al.*, 2013). O vírus H1N1 humano foi detectado em suínos na Nigéria (AIKI-RAJI *et al.*, 2004) enquanto o vírus H1N1pdm2009 foi pela primeira vez detectado em Camarões (NJABO *et al.*, 2010) e,

posteriormente, no Togo (DUCATEZ; AWOUME; WEBBY, 2015), Nigéria e Gana (ADEOLA; OLUGASA; EMIKPE, 2015).

Alguns subtipos distintos do VIA também foram isolados em suínos, como o H3N8, H5N8, H5N1, H6N6, H9N2 e H5N1 isolados na China (LI *et al.*, 2004; KONG *et al.*, 2014), o H3N1 isolado em Taiwan (TSAI; PAN, 2003), o H3N8 isolado no Brasil (SCHAEFER *et al.*, 2011b), e o H2N3 isolado nos EUA (MA *et al.*, 2007).

3.1.4. Influenza suína e saúde pública

O VIA pode ser transmitido de suínos para humanos e vice versa, apresentando assim importância na saúde pública (MYERS; OLSEN; GRAY, 2007; HOWDEN *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2010). O suíno desempenha um papel importante na transmissão interespécies do VIA porque possibilita que ocorra a recombinação viral, na qual, há troca de material genético entre vírus diferentes, resultando em novos tipos de vírus, para os quais os humanos podem não possuir imunidade (BROWN, 2000; MYERS, *et al.*, 2006).

A IS é considerada uma zoonose de caráter ocupacional, visto que, pessoas que apresentam maior contato com suínos, como trabalhadores de granjas, abatedouros e veterinários apresentam maior risco de serem infectadas pelo VIA de suínos (MYERS *et al.*, 2006).

Um estudo de revisão de literatura que incluiu resultados de 24 pesquisas, foram detectados 37 casos clínicos de infecção pelo VIA de suíno em humanos. Estes casos foram reportados em pacientes dos EUA (19 casos), antiga Tchecoslováquia (6 casos), Holanda (4 casos), Rússia (3 casos), Suíça (3 casos), Canada (1 caso) e China (1 caso). Trinta e três pacientes tinham sido infectados pelo vírus H1N1 e quatro pelo subtipo H3N2. Entre estes pacientes, seis foram a óbito enquanto 31 recuperaram do quadro clínico (MYERS; OLSEN; GRAY, 2007).

Após a pandemia de 2009, análises genéticas e filogenéticas de segmentos virais de vírus detectados em suínos, em vários países, demonstraram similaridade com o vírus H1N1pdm2009 circulante na população humana, sugerindo a transmissão deste vírus de humanos para suínos (HOWDEN *et al.*, 2009; WELSH *et al.*, 2010; PEREDA *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2010; DUCATEZ *et al.*, 2011; DUCATEZ; AWOUME; WEBBY, 2015).

3.1.5. Transmissão

A transmissão do VIA entre suínos ocorre através da inalação de gotículas e aerossóis que atingem a nasofaringe ou pelo contato direto com secreções ou fômites contaminados (TELLIER, 2006). Suínos com infecção clínica ou subclínica desempenham papel importante na transmissão do VIA intra e entre rebanhos. Dessa forma, deve ser controlado o movimento de suínos a fim de reduzir a propagação do vírus entre granjas (TORREMORELL *et al.*, 2012).

O VIA já foi detectado em amostras de ar de exaustor de granjas infectadas, o que explica a possibilidade de transmissão entre granjas vizinhas (TORREMORELL *et al.*, 2012). A transmissão por aerossóis tem maior impacto em áreas com grande quantidade de granjas e elevada densidade de suínos (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Ainda, suínos podem ser infectados pelo vírus da influenza aviária (H3N3) a partir da ingestão de água contaminada por fezes de pássaros (KARASIN *et al.*, 2004). A infecção experimental do VI em suínos é feita por via intranasal (JUNG; HA; CHAE, 2005) e intratraqueal (SRETA *et al.*, 2009; LYOO *et al.*, 2014).

3.1.6. Patogenia

A infecção pelo VIA é limitada ao trato respiratório e viremia é raramente detectada. A replicação do vírus pode ocorrer na mucosa nasal, tonsilas, traqueia, linfonodos traqueobrônquicos e pulmões (FLORES *et al.*, 2007). O vírus é excretado nas secreções nasais 24 h após a infecção, e o pico de excreção ocorre 48 h e diminui seis a oito dias após a infecção (PEREDA *et al.*, 2010; DETMER *et al.*, 2012). O VIA tem maior predileção pelo trato respiratório inferior e o pulmão é o principal órgão onde ocorre a replicação viral. Através da técnica de IHQ, na fase aguda da infecção o vírus é detectado no epitélio de brônquios e bronquíolos, enquanto que, na fase subaguda, antígenos do VIA são, principalmente, detectados em macrófagos e pneumócitos no interstício ou espaço alveolar (JUNG; HA; CHAE, 2005).

As espécies mais virulentas do VIA se caracterizam por apresentar prolongada replicação viral, intensa indução da produção de citocinas e capacidade de se replicar no trato respiratório inferior do hospedeiro. A infecção pelo VIA causa morte de células epiteliais que resulta da ação direta do vírus e da ação de leucócitos e de citocinas produzidas pelo sistema imunitário inato (JANKE, 2014). O VIA também causa citólise das células infectadas, através da supressão da expressão gênica e da síntese de

proteínas celulares (JANKE, 2014), assim como, através da morte celular por apoptose (HEROLD *et al.*, 2012).

Citocinas iniciais como o interferon- α (IFN- α), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6 têm sido associadas à ocorrência de febre, prostração e anorexia, em suínos infectados pelo VIA (FLORES *et al.*, 2007; JANKE, 2014). TNF- α e IL-1 estimulam moléculas quimiotáticas de neutrófilos e macrófagos, levando à rápida infiltração dessas células fagocíticas no trato respiratório (ULICH *et al.*, 1991). As citocinas são produzidas, principalmente, pelos linfócitos T após reconhecimento de antígenos e são moduladoras importantes da resposta imune específica (LA GRUTA *et al.*, 2007). Adicionalmente, as citocinas também exacerbam a lesão pulmonar causando aumento da permeabilidade vascular, hemorragia e edema (ULICH *et al.*, 1991).

3.1.7. Sinais clínicos

A influenza suína é uma forma importante de doença respiratória que pode se manifestar em forma de um surto não fatal ou como doença endêmica (CASWELL; WILLIAMS, 2016). A doença clínica geralmente é restrita a suínos suscetíveis, sem proteção imune contra o vírus, e pode afetar suínos das fases de creche, recria e terminação (PEREDA *et al.*, 2010; WATANABE *et al.*, 2012). A IS se caracteriza por apresentar taxa de morbidade elevada, podendo chegar a 100% e baixa taxa de mortalidade (WELSH *et al.*, 2010; KONG *et al.*, 2014).

Suínos infectados pelo VIA manifestam sinais clínicos após um período de incubação de um a três dias, e estes consistem em febre alta (40.5-41.5°C), anorexia, inatividade, taquipneia, respiração abdominal laboriosa, dispneia, espirro, conjuntivite, descarga nasal e tosse (JUNG; HA; CHAE, 2005; ROMAGOSA *et al.*, 2011; RAJÃO *et al.*, 2013b). Os sinais clínicos melhoram quatro a sete dias após a infecção. A severidade dos sinais clínicos é determinada pela virulência da cepa, idade, pressão de infecção, condições climáticas, tipo de instalações e ocorrência de coinfeção. Infecção bacteriana secundária por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis*, podem agravar os sinais clínicos (CHOI; GOYAL; JOO, 2003; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). A coinfeção com vírus respiratórios, como PCV2, vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) ou coronavírus respiratório suíno, também

podem exacerbar a gravidade da doença (CHOI; GOYAL; JOO, 2003; HANSEN *et al.*, 2010a). A infecção pelo VIA também já foi associada a sinais reprodutivos como abortos, natimortos, infertilidade e leitegadas pequenas e fracas (PEJSAK *et al.*, 2005).

Na infecção subclínica, suínos infectados possuem anticorpos específicos para o VIA, contudo, não apresentam manifestação clínica. Granjas com número elevado de suínos são mais propensas a apresentarem casos de infecção subclínica, e esta, ocorre, principalmente, em leitões com quatro a 12 semanas, período que coincide com o declínio dos anticorpos maternos específicos para o VIA (TAKEMAE *et al.*, 2016). A infecção pelo VIA acarreta perdas econômicas, principalmente, associadas à baixa conversão alimentar e baixo ganho de peso (VINCENT *et al.*, 2008).

3.1.8. Patologia

A infecção pelo VIA em suínos é restrita ao trato respiratório e o pulmão é o principal órgão acometido pela lesão induzida pelo vírus. Macroscopicamente, a lesão pulmonar se caracteriza por áreas multifocais a coalescentes de consolidação cranioventral localizadas, principalmente, nos lobos craniais, mediais e acessório (JANKE, 2014; LYOO *et al.*, 2014). As áreas de consolidação são vermelhas a acinzentadas, bem demarcadas e firmes em relação ao parênquima pulmonar não afetado (VINCENT, 2008; ROMAGOSA *et al.*, 2011). O pulmão pode apresentar ainda, edema, exsudado fibrinosanguinolento nas vias aéreas e aumento e hiperemia dos linfonodos mediastinais e traqueobrônquicos (VALHEIM *et al.*, 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). As mucosas da traqueia e dos brônquios geralmente apresentam hiperemia e edema. Infecção bacteriana secundária pode complicar a lesão pulmonar (CHOI; GOYAL; JOO, 2003; CASWELL; WILLIAMS, 2016).

Microscopicamente, as lesões consistem em necrose e redução do epitélio de brônquios e bronquíolos, com debris necróticos e neutrófilos no lúmen, além de atelectasia e infiltrado intersticial peribronquial e perivascular de linfócitos e plasmócitos (VINCENT *et al.*, 2008; CASWELL; WILLIAMS, 2016).

A severidade das lesões macroscópicas e microscópicas pode variar quando os suínos são infectados com diferentes subtipos do VIA. Suínos infectados experimentalmente com o subtipo H1N1 apresentaram lesões mais acentuadas e maior distribuição de antígenos no pulmão, em relação aos infectados pelos vírus H2N3 e H1N2 (SRETA *et al.*, 2009; LYOO *et al.*, 2014). O diagnóstico diferencial de bronquiolite necrotizante inclui a infecção por PCV2, pneumonia proliferativa e

necrotizante, doença de Aujeszky (pseudorraiva), infecção pelo vírus Nipah e lesão causada pela inalação de gases tóxicos (CASWELL; WILLIAMS, 2016).

3.1.9. Diagnóstico

A suspeita da ocorrência de influenza suína deve ser considerada quando existir um surto de doença respiratória aguda, com elevada taxa de morbidade, contudo, o diagnóstico definitivo é obtido através da detecção de anticorpos específicos para o vírus, detecção de lesões associadas a antígenos ou RNA viral em amostras de suínos infectados (WELSH *et al.*, 2010; DETMER *et al.*, 2012; SCHAEFER *et al.*, 2013). A seleção correta dos suínos para a coleta das amostras é fundamental para a obtenção do diagnóstico de forma que recomenda-se a coleta de suínos na fase aguda da doença, período em que os animais infectados apresentam febre (SCHAEFER *et al.*, 2013). As amostras a serem coletadas, principais exames laboratoriais para o diagnóstico de IS e seus respectivos resultados, estão ilustrados na figura 4.

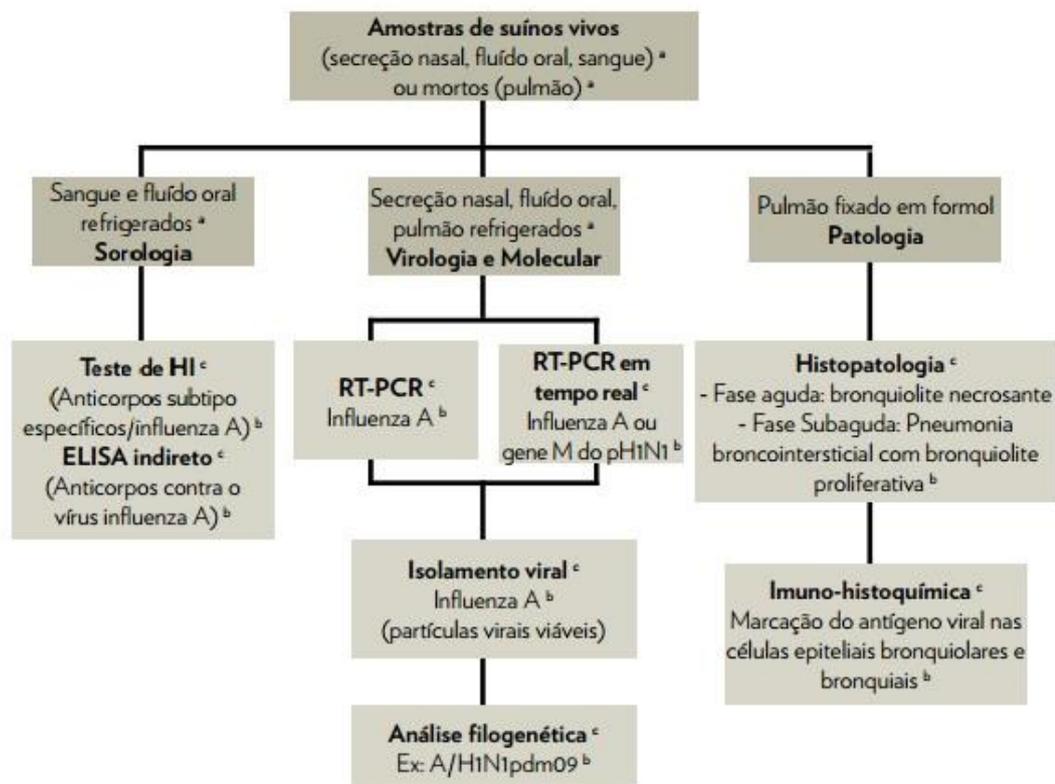


Figura 4. Amostras (a), resultados (b) e técnicas laboratoriais (c) para o diagnóstico de influenza em suínos. Fonte: SCHAEFER *et al.* (2013).

O isolamento viral pode ser obtido a partir de secreção nasal, laríngea, lavado bronquial e de amostra de pulmão com consolidação (SRETA *et al.*, 2009; SCHAEFER *et al.*, 2011; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2013). O cultivo do vírus faz-se em ovos embrionados (WELSH *et al.*, 2010) ou em cultivo de células Madin-Darby de rim canino (SRETA *et al.*, 2009; ROMAGOSA *et al.*, 2011). A confirmação do vírus no cultivo é obtido através do teste de hemaglutinação ou imunocitoquímica. O cultivo viral também permite que o isolado seja usado na aplicação de técnicas moleculares (RAJÃO *et al.*, 2013b).

Os testes sorológicos são usados para determinar a presença de anticorpos específicos para o VI e os mais usados são o teste de inibição da hemaglutinação (HI), e o teste de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Estes testes são usados, principalmente, para determinar o estado imunológico de um grupo de suínos, o nível e cinética de anticorpos maternos em leitões e o título de anticorpos no período pós-vacinal (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). O teste de ELISA indireto identifica anticorpos contra a nucleoproteína viral, tanto no soro, como em fluido oral. A produção de anticorpos (predominantemente IgG) em suínos infectados pelo VI é detectável a partir dos sete dias pós-infecção, com pico de produção entre 2-3 semanas pós-infecção, e o declínio ocorre 8-10 semanas pós-infecção (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). A detecção de anticorpos não indica necessariamente infecção atual, uma vez que, estes podem ser detectados dias após a infecção. Outra limitante dos testes sorológicos é o fato de não poderem diferenciar anticorpos vacinais de anticorpos induzidos pela infecção (SCHAEFER *et al.*, 2013).

A técnica da PCR via transcriptase reversa (RT-PCR) tem sido amplamente empregada para a detecção de RNA do vírus da influenza e os diferentes subtipos podem ser identificados através do uso de primers específicos (CHOI *et al.*, 2002; VALHEIM *et al.*, 2011). A RT-PCR pode ser realizada após a extração do material genético do VIA em amostras de swabs nasais, pulmão e isolados do vírus em cultura celular (SCHAEFER *et al.*, 2013). Para entender a epidemiologia e a evolução do VIA, não só é pertinente a classificação dos subtipos, mas também a genotipagem do vírus (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012).

O exame histopatológico é realizado em amostras de pulmão fixadas em formalina e emblocadas em parafina. Esta técnica permite visualizar a lesão microscópica característica, mas não confirmatória de IS. Assim, para confirmar o diagnóstico, deve-se aplicar a técnica de IHQ, a qual permite a detecção de antígenos

(nesse caso, proteínas virais) associados à lesão microscópica. Antígenos do vírus são evidenciados em células epiteliais de brônquios e bronquíolos assim como em macrófagos alveolares (VALHEIM *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2012; RAJÃO *et al.*, 2013b; LYOO *et al.*, 2014) e células epiteliais de glândulas bronquiais (RAJÃO *et al.*, 2013b). Antígenos do VIA também podem ser detectados em amostras de pulmão através da técnica de imunofluorescência (SRETA *et al.*, 2009; DETMER *et al.*, 2012).

3.1.10. Prevenção e controle

A vacinação e a aplicação de práticas de biossegurança são as principais medidas implementadas para prevenir ou minimizar a transmissão do VIA entre suínos ou entre o suíno e outras espécies (THACKER; JANKE, 2008). A vacinação contra o VIA em suínos foi introduzida na Europa nos meados da década de 1980 e nos Estados Unidos da América em 1993 (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012).

As vacinas contra a influenza suína podem ser comerciais ou autógenas. As vacinas comerciais geralmente incluem um ou mais isolados representativos de estirpes que circulam em uma determinada região, contudo, podem não conferir proteção contra determinados isolados que circulam numa granja ou população suína específica (VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). As vacinas são geralmente aplicadas em matrizes, com o objetivo de induzir a produção de anticorpos maternos, conferindo imunidade aos leitões via colostro. A vacinação induz altos títulos de IgG pulmonar e sistêmica (THACKER; JANKE, 2008), minimiza os sinais clínicos induzidos pelo vírus, reduz a quantidade do vírus no pulmão, secreção nasal e orofaríngea; reduz a severidade das lesões e a probabilidade de transmissão do VIA (LEE; GRAMER; JOO, 2007; ROMAGOSA *et al.*, 2011).

Por outro lado, as vacinas autógenas são produzidas com estirpes que afetam uma granja específica e seu uso é restrito para essa mesma granja (LEE, GRAMER; JOO, 2007; VAN REETH; BROWN; OLSEN, 2012). Suínos vacinados com vacina homóloga contra o VIA, apresentam melhor proteção em relação aos vacinados com vacina heteróloga (LEE; GRAMER; JOO, 2007; ROMAGOSA *et al.*, 2011).

A vacinação contra o VIA pode ter sua eficácia afetada por fatores como, as rápidas variações genômicas virais, quando comparada à atualização das vacinas; a necessidade de vacinas que induzam melhor proteção cruzada entre diferentes isolados do VIA, e a interferência de anticorpos maternos (KITIKOON *et al.*, 2006; VINCENT

et al., 2008). Adicionalmente, pode-se fazer um tratamento de suporte com expectorantes e antimicrobianos que previnem infecções bacterianas, que podem agravar o quadro clínico causado pela infecção pelo VIA (FLORES *et al.*, 2007). O uso de anti-inflamatórios reduz a febre e as mortalidades (ZANELLA; BRENTANO, 2012).

A aplicação de medidas de biossegurança é fundamental para a prevenção da influenza no rebanho e para redução de seu impacto econômico na produção de suínos. Em granjas livres, a introdução do VIA pode ser prevenida através da prática de quarentena antes da introdução de suínos na granja. Depopulação parcial, segregação de suínos recém-desmamados, sistema “todos dentro, todos fora”, associadas à higiene e ventilação adequada das instalações, são importantes para evitar a disseminação do vírus. Uma vez a doença estabelecida em um plantel torna-se difícil a erradicação sem a depopulação completa (TORREMORELL *et al.*, 2009; FAO, 2010).

Devido ao carácter zoonótico do VIA, as granjas devem ter um plano de prevenção, o qual limita a entrada de visitantes, restringe a entrada de pessoas com sintomas clínicos similares aos da influenza; estimula a lavagem das mãos e o uso de pedilúvio com substâncias desinfetantes, e preveja a vacinação dos funcionários da granja contra o VIA (TORREMORELL *et al.*, 2012).

O controle do vírus influenza em aves e suínos é de extrema importância para a redução da potencial disseminação e adaptação do vírus entre espécies, o que minimiza o risco de animais serem a fonte do vírus que pode dar origem a pandemias em humanos (THACKER; JANKE, 2008). No âmbito do controle da IS, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) criaram uma rede de especialistas em influenza animal, denominada OFFLU (<http://www.offlu.net/>). Esta rede tem o objetivo de dar suporte aos serviços veterinários, com vista a reduzir o risco e impacto da influenza animal na saúde animal e interface humana-animal.

3.2. Circovirose suína

3.2.1. Histórico

O circovírus suíno (PCV) foi descoberto pela primeira vez em cultura celular de rim suíno, linhagem PK15, como um contaminante, morfológicamente semelhante ao picornavírus (TISCHER; RASCH; TOCHTERMANN, 1974). Mais tarde, foi descrito como um vírus DNA de cadeia simples, com um genoma circular e, conseqüentemente, foi atribuído à Família Circoviridae (TISCHER *et al.*, 1982). Uma vez que o vírus não causava doença ou efeito citopático, acreditava-se que era apatogênico (TISCHER *et al.*, 1986). Em 1996, contudo, o PCV esteve associado a surtos de uma doença devastadora, posteriormente referida como SMDS em porcos no Canadá (ELLIS *et al.*, 1998). Este vírus era semelhante ao PCV previamente descrito, contudo, a identidade da sequência de nucleotídeos entre os vírus era inferior a 80%. Mais tarde, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus reconheceu as duas espécies virais como membros da Família circoviridae, designado circovírus suíno tipo 1 (PCV1) o contaminante das células PK15 e circovírus suíno tipo 2 (PCV2), o vírus associado com doença clínica (<http://www.ictvonline.org/>). Posteriormente, PCV2 foi detectado em suínos selvagens (*Sus scrofa*) (CSAGOLA *et al.*, 2006).

3.2.2. Taxonomia e características morfológicas

Ambos, PCV1 e PCV2 são membros da Família Circoviridae, a qual é dividida em dois gêneros: *Circovirus* (genoma viral com forma circular) e *Gyrovirus* (genoma viral com forma de anel). O gênero *Circovirus* contém várias espécies como: PCV1, PCV2, vírus do bico e das penas, circovírus dos canários, circovírus dos gansos, circovírus dos pombos e circovírus dos patos. Por sua vez, o gênero *Gyrovirus* contém apenas o vírus da anemia da galinha (TODD *et al.*, 2005; ZANELLA, 2007).

O PCV apresenta um vírion pequeno com 15 a 17 nm de diâmetro, não envelopado e com simetria icosaédrica. Seu genoma apresenta uma molécula de DNA de fita simples, com aproximadamente 1.760 nucleotídeos, ambisenso, circular, fechada por uma ligação covalente (TISCHER *et al.*, 1982). A replicação do vírus acontece durante a fase S da mitose celular (STUDDERT *et al.*, 1993).

O genoma do PCV2 é composto por várias regiões abertas de leitura (ORFs - open reading frames), entre as quais, a ORF1, ORF2 e ORF3 são as mais estudadas. A

ORF1 também chamada gene REP codifica duas proteínas associadas à replicação viral, a Rep e Rep', com 314 e 178 aminoácidos, respectivamente (CHEUNG *et al.*, 2003). A ORF2 ou gene CAP codifica uma proteína do capsídeo viral, a Cap, que possui 23-234 aminoácidos e é o principal determinante antigênico do vírus (MANKERTZ *et al.*, 2000). A ORF3 codifica uma proteína não estrutural, com 108 aminoácidos, que *in vitro*, induz a apoptose (LIU; CHEN; KWANG, 2005). Recentemente, foi descrito que a ORF4 codifica uma proteína com atividade antiapoptótica que suprime a atividade das caspases 3 e 8 e, também está envolvida na modulação do sistema imunitário do hospedeiro, através da regulação dos linfócitos T CD4 + e CD8 + (HE *et al.*, 2013).

3.2.3. Variação genética de PCV2

Por meio de análise filogenética de sequências dos nucleotídeos, o PCV2 foi dividido em dois genótipos, “a” (PCV2a, Grupo II ou genótipo 2), e “b” (PCV2b, Grupo I ou genótipo 1). PCV2a é o mais antigo, do ponto de vista evolutivo (OLVERA; CORTEY; SEGALÉS, 2007; GRAU-ROMA *et al.*, 2008; SEGALÈS *et al.*, 2008). Este genótipo foi comumente detectado no período anterior ao ano 2003 (DUPONT *et al.*, 2008; GRAU-ROMA *et al.*, 2008), ano em que PCV2b começou a ser detectado com frequência, associado a SMDS (DUPONT *et al.*, 2008; SORIA; SEGALÉS, 2012). PCV2a apresenta cinco grupos (2A a 2E) enquanto que, o PCV2b é subdividido em três grupos (1A a 1C) (OLVERA; CORTEY; SEGALÉS, 2007). Um terceiro genótipo (PCV2c) foi detectado em amostras de suínos com infecção subclínica, na Dinamarca (DUPONT *et al.*, 2008). Adicionalmente, mais recentemente foi descrito um genótipo que apresenta relação com o genótipo PCV2b subtipo 1C designado PCV2b mutante (mPCV2b), atualmente denominado PCV2d, que por sua vez, se divide nos grupos PCV2d-1 e PCV2d-2 (XIAO; HALBUR; OPRIESSNIG, 2015).

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* evidenciaram o surgimento de novos genótipos resultantes da recombinação de genótipos de PCV2, quando infectam concomitantemente células do mesmo hospedeiro (GRAU-ROMA *et al.*, 2008). O surgimento de novos genótipos e a divergência genética gradual dentro do mesmo genótipo, também pode ser consequência da pressão de vacinação e seleção natural (XIAO; HALBUR; OPRIESSNIG, 2015).

3.2.5. Transmissão

O PCV2 pode ser excretado através de secreções oral, nasal e ocular, fezes, urina, leite, sêmen e colostro, o que torna fácil a transmissão e disseminação do vírus (SEGALÉS *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2012; SORIA; SEGALÉS, 2012). O vírus pode ser transmitido de forma horizontal ou vertical (DVORAK *et al.*, 2013) e a principal via de infecção natural entre suínos é o contato direto oro-nasal (SORIA; SEGALÉS, 2012). A infecção também pode ocorrer através do contato com secreções ou ainda, através de instalações, equipamentos e pessoal contaminado (ZANELLA, 2007). Leitões recém-nascidos se infectam através do contato direto com a fêmea, ingestão de colostro ou, a partir do ambiente da maternidade (DVORAK *et al.*, 2013).

A transmissão do PCV2 também pode ocorrer por via transplacentária (GAVA *et al.*, 2008; SARLI *et al.*, 2012; DVORAK *et al.*, 2013). Porcas negativas para PCV2, quando inseminadas com sêmen de machos positivos, soroconvertem em até 30 dias de gestação e antígenos e DNA de PCV2 podem ser detectados no sangue e múltiplos órgãos da progênie (GAVA *et al.*, 2008). Adicionalmente, DNA de PCV2 já foi detectado também em fetos abortados e natimortos (KIM; JUNG; CHAE, 2004).

Experimentalmente, PCV2 pode ser inoculado por via intranasal (YU *et al.*, 2007; PATTERSON *et al.*, 2015) oral (OPRIESSNIG, 2009a; OPRIESSNIG *et al.*, 2011), intrauterina (SARLI *et al.*, 2012) e intralinfoide (OPRIESSNIG *et al.*, 2003). PCV2 é extremamente estável sob condições ambientais. O vírus conserva a sua capacidade de infecção em cultivo celular após incubação a 56 ou 70°C, em meio ácido (pH3) ou em clorofórmio, por 15 minutos. Essa resistência à inativação é importante na epidemiologia do agente e, possui implicações para o controle das infecções por PCV2 no rebanho e instalações (ZANELLA, 2007).

3.2.6. Patogenia

PCV2 não codifica sua própria DNA polimerase de forma que, para sua replicação precisa infectar células que se encontram na fase S do ciclo celular (TISCHER *et al.*, 1986). Dessa forma, a replicação do vírus ocorre em células com elevado índice mitótico, como macrófagos, células epiteliais e células endoteliais (YU *et al.*, 2007). No sangue periférico, a replicação do PCV2 ocorre, principalmente, em linfócitos T circulantes (CD4+ e CD8+) e em menor proporção em linfócitos B (YU *et*

al., 2007). Após a infecção e replicação viral que acontece em células do sistema imunológico, ocorre viremia sete dias após a infecção (OPRIESSNIG *et al.*, 2003; OPRIESSNIG *et al.*, 2008), e atinge o pico entre 14 e 21 dias após a infecção, período que ocorre a disseminação do vírus para vários órgãos (OPRIESSNIG *et al.*, 2008). PCV2 já foi detectado em linfócitos, células epiteliais renais e do trato respiratório, células endoteliais, enterócitos, hepatócitos, músculo esquelético, medula óssea e células acinares do pâncreas (CORRÊA *et al.*, 2006; OPRIESSNIG *et al.*, 2009a; HANSEN *et al.*, 2010b; OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012). Todavia, o vírus é, principalmente, detectado em órgãos linfoides, onde causa depleção linfoide e perda da arquitetura nodal (OPRIESSNIG *et al.*, 2007; SEGALÉS, 2012). A depleção linfoide é consequência da redução do número de células dendríticas interfoliculares, linfócitos B, células NK, linfócitos T $\gamma\delta$ e linfócitos T CD4+ e CD8+ (DARWICH; MATEU, 2012). A lesão nos linfonodos causa imunodepressão, tornando os suínos afetados mais susceptíveis à infecção por outros patógenos (NUNEZ *et al.*, 2003; MENG *et al.*, 2013).

PCV2 também pode induzir depleção linfoide através da indução de apoptose, contudo, vários estudos apresentaram resultados controversos. Uma proteína codificada pela ORF 3 foi identificada em células PK-15 infectadas com PCV2 e esta induzia a apoptose, através da ativação da caspase-3 e caspase-8 (LIU; CHEN; KWANG, 2005). Contrariamente, Juhan *et al.* (2010) não detectaram diferenças significativas na severidade de lesões e quantidade de antígenos de PCV2 em tecidos de suínos inoculados com PCV2 de campo, ou com um PCV2 mutante, sem a ORF3.

A patogênese da linfadenite necrotizante pode estar associada à apoptose causada pelo PCV2 no tecido linfoide (KIM; CHAE, 2005) ou ser consequência de lesão vascular que leva à trombose e subsequente necrose de folículos linfoides (GALINDO-CARDIEL *et al.*, 2011). As lesões vasculares e glomerulares observadas na SDNS resultam da deposição de imunocomplexos nos capilares vasculares e glomerulares (SEGALÉS *et al.*, 1998).

A SMDS geralmente não é observada em leitões com menos de quatro semanas, o que sugere que anticorpos maternos reduzem a suscetibilidade de os leitões manifestarem a síndrome (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). Suínos infectados pelo PCV2 desenvolvem imunidade específica para o vírus, 2 a 3 semanas após a infecção (MEERTS *et al.*, 2005). A soroconversão ocorre quer na infecção subclínica, assim como na infecção clínica. Baixos títulos de anticorpos neutralizantes contra PCV2 estão

associados à maior replicação de PCV2 e, conseqüente desenvolvimento da SMDS (FORT *et al.*, 2007).

3.2.7. Fatores que influenciam a progressão da infecção por PCV2 em doença clínica

Em vários países, PCV2 foi detectado em suínos antes da ocorrência de casos clínicos associados à infecção pelo vírus, o que pressupõe que, a epidemiologia de PCV2 depende de cofatores infecciosos e não infecciosos que contribuem para a ocorrência das DAPCV2 (ROSE *et al.*, 2012; PATTERSON *et al.*, 2015). Os principais fatores que podem determinar a progressão da infecção por PCV2 em doença clínica são: coinfeção, imunomodulação, estirpe do vírus, suscetibilidade do hospedeiro e fatores relacionados ao manejo (figura 6) (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; SEGALÉS, 2009).

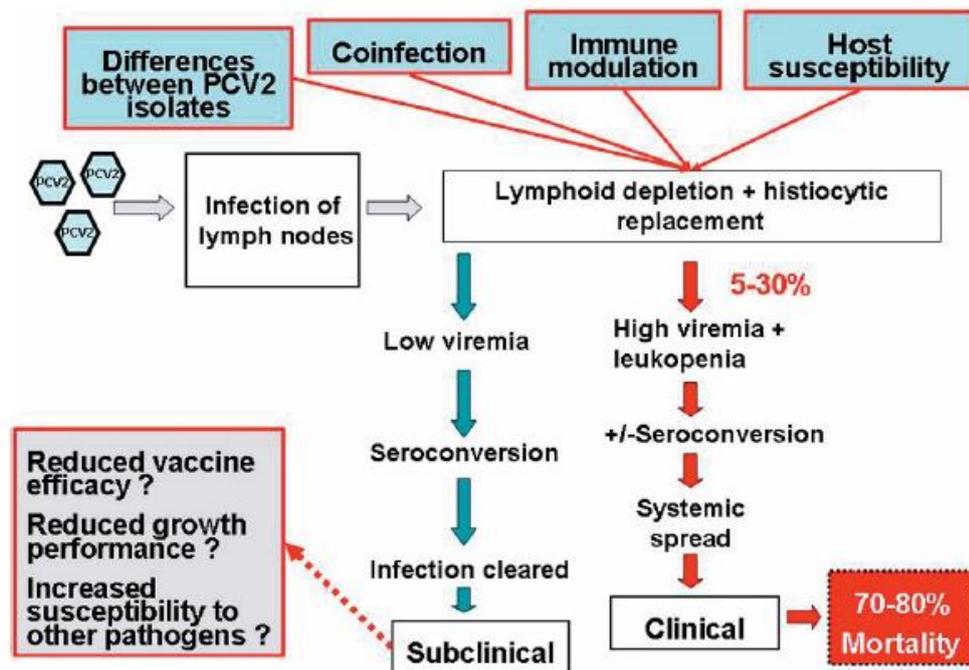


Figura 6. Cofatores que influenciam a progressão da infecção por PCV2 em doença clínica. Fonte: OPRIESSNIG; MENG; HALBUR (2007).

3.2.7.1. Coinfecção

A coinfecção de PCV2 com outros agentes, como o PRRSV, parvovírus suíno e *Mycoplasma hyopneumoniae*, resultam em sinais clínicos e lesões mais acentuadas, quando comparadas às observadas em suínos infectados apenas por PCV2 (KENNEDY *et al.*, 2000; OPRIESSNIG *et al.*, 2004; KIM; CHAE, 2004; TOMAS *et al.*, 2008; SEGALÉS, 2009). Especula-se que os mecanismos através dos quais os patógenos concorrentes influenciam na infecção por PCV2 são: 1) promovem o aumento da replicação de PCV2 através do aumento de células de linhagem linfocitária nos tecidos afetados do hospedeiro, que podem ser alvo para a replicação desse vírus; 2) alteração da produção e perfil de citocinas nos tecidos, o que interfere com a depuração de PCV2 (OPRIESSNIG *et al.*, 2012).

3.2.7.2. Imunomodulação

A estimulação da replicação de PCV2 e o desenvolvimento da SMDS podem ser induzidas após estimulação do sistema imunitário, quer através da vacinação (KYRIAKIS *et al.*, 2002; OPREISSNING *et al.*, 2003; MENG *et al.*, 2013) ou aplicação de produtos imunoestimulantes (KYRIAKIS *et al.*, 2002). Suínos acometidos pela SMDS quando vacinados contra *Mycoplasma hyopneumoniae* ou submetidos à injeção intramuscular com uma substância imunomoduladora (Baypamun®, Bayer, Leverkusen, Germany), apresentaram sinais clínicos, lesões e quantidade de antígenos nos tecidos mais acentuados, em relação aos suínos do grupo controle (KYRIAKIS *et al.*, 2002). Suínos infectados com PCV2 e vacinados contra *Mycoplasma hyopneumoniae* ou *Actinobacillus pleuropneumoniae* apresentaram viremia por um período mais longo, maior número de cópias de DNA no soro e, depleção linfóide acentuada, em relação aos suínos não vacinados (OPREISSNING *et al.*, 2003).

3.2.7.3. Estirpes vírais

Estudos epidemiológicos demonstraram que, atualmente, a SMDS está mais associada a isolados de PCV2b do que ao genótipo PCV2a, sugerindo haver diferença na virulência entre os dois genótipos (GRAU-ROMA *et al.*, 2008). Adicionalmente, suínos infectados com um isolado de PCV2, previamente atenuado por múltiplas

passagens em cultivo celular, apresentaram menor viremia e lesões mais discretas, em relação aos suínos inoculados com um isolado de campo. Essa diferença foi atribuída à mutação de dois aminoácidos na proteína Cap, sugerindo que, alterações mínimas no genoma de PCV2 podem resultar em diferenças na virulência e severidade de lesões associadas à infecção pelo vírus (FENAUX *et al.*, 2004).

3.2.7.4. Hospedeiro

A raça do suíno pode determinar a suscetibilidade em relação à infecção por PCV2. Suínos da raça Landrace são mais suscetíveis à infecção por PCV2 em relação às raças Duroc, Large White (OPRIESSNIG *et al.* 2006) e Pietrain (OPRIESSNIG *et al.*, 2009b). A inoculação de PCV2 a leitões das raças Landrace e Pietrain, submetidos às mesmas condições de manejo, concluiu-se que os suínos de raça Landrace apresentavam depleção linfóide acentuada quando comparada aos suínos de raça Pietrain (OPRIESSNIG *et al.*, 2009b).

A imunidade materna também influencia na suscetibilidade da infecção por PCV2. Leitões que não ingeriram colostro são mais suscetíveis a desenvolver a SMDS (TOMAS *et al.*, 2008). Ainda, leitões nascidos de porcas com baixo título de anticorpos contra PCV2 apresentam maior taxa de mortalidade em relação aos nascidos de matrizes com título maior de anticorpos (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007).

3.2.7.5. Manejo

Vários fatores não infecciosos relacionados com instalações, manejo e biossegurança favorecem a ocorrência de DAPCV2 (ALARCON *et al.*, 2011; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2012). Esses fatores causam estresse, e incluem densidade elevada, ambiente inadequado, baixa qualidade do ar, da água e da ração, mistura de leitões com procedências e idades diferentes, falhas na limpeza/desinfecção e a não realização de vazio sanitário (ZANELLA, 2012). Em um estudo experimental, Patterson *et al.* (2015) concluíram que suínos infectados com PCV2, quando introduzidos em baias com alta densidade e/ou a temperatura ambiente elevada, apresentaram aumento da carga viral no soro e nos tecidos.

3.2.8. Sinais clínicos

Suíños acometidos pela infecção subclínica por PCV2 não apresentam sinais clínicos aparentes (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007), contudo, quando vacinados contra PCV2, melhoram o ganho médio de peso, condição corporal e peso da carcaça (YOUNG; CUNNINGHAM; SANFORD, 2011).

A SMDS afeta, principalmente, leitões desmamados (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2012), mas também foi diagnosticada em suínos na fase de terminação (HANSEN *et al.*, 2010b; VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016). Suínos acometidos apresentam baixo ganho de peso, emagrecimento, apatia, anorexia, pele e mucosas ictéricas, caquexia com evidenciação dos ossos da coluna vertebral, diarreia e dificuldade respiratória (CORRÊA *et al.*, 2006; MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2012; CASWELL; WILLIAMS, 2016). Na fase aguda da SMDS observa-se aumento de linfonodos subcutâneos (SEGALÉS, ALLAN; DOMINGO, 2012). Quando a infecção por PCV2 afeta o sistema nervoso central causa apatia, ataxia, movimentos de pedalagem e opistótono (CORRÊA *et al.*, 2007). Granjas afetadas pela SMDS podem apresentar morbidade de 4-30% (ocasionalmente 50-60%) e a mortalidade pode variar de 4 a 20% (SEGALÉS; DOMINGO, 2002), podendo ser superior a 50% (VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016).

Suíños com doença respiratória associada à infecção por PCV2 apresentam sinais clínicos similares aos causados por outros agentes do CDRS, tais como febre, descarga nasal, anorexia, tosse e dispneia, que podem causar redução do ritmo de crescimento (OPRIESSNIG *et al.*, 2003; OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012).

Enterite associada a PCV2 acomete, principalmente, suínos na fase de crescimento e terminação. Os suínos acometidos apresentam diarreia e retardo de crescimento (OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012; BARÓ; SEGALÉS; MARTÍNEZ, 2015) e não respondem a tratamento com antibióticos (KIM; CHAE, 2005).

A SDNS afeta suínos em torno de 12 a 14 semanas de idade, mas também é diagnosticada em suínos de terminação e reposição (DROLET *et al.*, 1999). Suínos acometidos pela SDNS apresentam depressão, anorexia, relutância em se movimentar e febre, associados à presença de máculas e pápulas avermelhadas, principalmente na pele da região perianal e nos membros pélvicos (DROLET *et al.*, 1999; OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012). As desordens reprodutivas associadas à infecção pelo PCV2 se caracterizam por aborto, principalmente, no terço final da gestação, mumificação e

maceração fetal (KIM; JUNG; CHAE, 2004; PITTMAN, 2008; SCHLAFER; FOSTER, 2016).

As manifestações clínicas das DAPCV2 devem ser diferenciadas de outras doenças que causam sinais clínicos similares. O diagnóstico diferencial da SMDS inclui doenças que causam redução do crescimento e aumento de mortalidade, como a síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), doenças respiratórias crônicas e salmonelose. As manifestações clínicas da doença entérica devem ser diferenciadas de ileíte por *Lawsonia intracellularis* e enterite causada por *Salmonella* spp. (OPRIESSNIG *et al.*, 2011; SEGALÉS, 2016). O diagnóstico diferencial da SDNS inclui outras doenças que causam lesões cutâneas e renais em suínos, como a peste suína clássica, PSA, erisipela suína, septicemia por *Salmonella* sp. e etc. A síndrome reprodutiva associada ao PCV2 apresenta sinais clínicos similares aos da PRRS, parvovirose suína, doença de Aujeszky e leptospirose (SEGALÉS, 2016).

3.2.9. Patologia

3.2.9.1. Lesões macroscópicas

Suínos com infecção subclínica por PCV2 não apresentam lesões macroscópicas (SEGALÉS, 2012). Na doença sistêmica, as lesões se distribuem por diferentes órgãos e sistemas, com maior acometimento de órgãos linfoides (OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012; MORÉS *et al.*, 2012). Linfonodos de suínos afetados apresentam aumento de volume e superfície de corte pálida, enquanto o baço pode apresentar áreas de infarto (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2012; VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016). Suínos acometidos também podem apresentar atrofia do timo, redução de tamanho das tonsilas e fígado atrófico, com áreas de coloração brancocenta (VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016). O cerebelo pode apresentar múltiplas hemorragias e edema em leptomeninges (CORRÊA *et al.*, 2007) e o rim apresenta pontos brancos na região cortical (SEGALÉS, 2012). A infecção por PCV2 também pode causar úlceras gástricas (ROSELL *et al.*, 1999; KYRIAKIS *et al.*, 2002; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004).

Suínos com doença respiratória associada à infecção por PCV2 apresentam pneumonia intersticial, a qual se caracteriza por falha no colapso pulmonar após abertura da cavidade torácica, áreas de consolidação cranioventral e edema interlobular

(CORRÊA *et al.*, 2006; CASWELL; WILLIAMS, 2016). Na doença entérica, ocorre aumento do tamanho dos linfonodos mesentéricos, enterite necrotizante, edema de mesentério, linfangiectasia e espessamento da mucosa do íleo (OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007; ZLOTOWSKI *et al.*, 2008).

A SDNS se caracteriza por presença de máculas e pápulas avermelhadas, com distribuição multifocal a coalescente, localizadas, principalmente, nos membros pélvicos e região perianal (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2012; SEGALÉS, 2012; OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012), podendo em casos graves, se disseminar a região torácica, abdominal, membros torácicos e cabeça (DROLET *et al.*, 1999). A nefropatia se caracteriza por rins aumentados de volume, pálidos e edematosos, com hemorragias petequiais na região cortical e medular (IMAI *et al.*, 2006).

Na síndrome reprodutiva, a replicação de PCV2 ocorre no coração do feto. Fetos infectados pelo vírus apresentam hipertrofia cardíaca com áreas pálidas no miocárdio, além de hepatomegalia, ascite, hidrotórax e hidropericárdio (SEGALÉS, 2012; SCHLAFER; FOSTER, 2016). Porcas prenhes infectadas por PCV2 podem apresentar necrose no epitélio da placenta (SARLI *et al.*, 2012).

3.2.9.2. Lesões microscópicas

Suínos com infecção subclínica geralmente não apresentam lesões histológicas ou quando estas ocorrem, são discretas e localizadas em ocasionais linfonodos (HANSEN *et al.*, 2010b; SEGALÉS, 2012). Na infecção sistêmica por PCV2, as lesões histológicas ocorrem, principalmente, em órgãos linfoides (linfonodos, baço, timo, tonsilas e placas de Peyer), pulmões e rins (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2012; OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012). No tecido linfoide, a lesão se caracteriza por depleção linfoide, necrose celular em centros foliculares e infiltrado de histiócitos e células gigantes multinucleadas que ocasionalmente, podem apresentar corpúsculos de inclusão basofílicos intracitoplasmáticos, com forma de cacho de uva (ROSELL *et al.*, 1999; SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; GALINDO-CARDIEL *et al.*, 2011; VALLI; KIUPEL; BIENZLE, 2016). O infiltrado de histiócitos geralmente é observado nos seios subcapsulares, seios medulares e em folículos linfoides (HANSEN *et al.*, 2010b). Além do infiltrado granulomatoso, os linfonodos também podem apresentar áreas de necrose (linfadenite necrotizante) (KIM; CHAE, 2005; GALINDO-CARDIEL *et al.*, 2011) e em casos de doença crônica, apresentam edema e fibrose (HANSEN *et*

al., 2010b). O fígado apresenta infiltrado de linfócitos periportal, necrose individual de hepatócitos e áreas extensas de necrose hepatocelular (CASWELL; WILLIAMS, 2016). No cerebelo, observam-se hemorragias múltiplas em leptomeninges, associada à vasculite linfoplasmocítica, degeneração fibrinoide em vasos e edema perivascular (CORRÊA *et al.*, 2007).

O pulmão apresenta espessamento de septos alveolares devido à hiperplasia de pneumócitos tipo II e infiltrado intersticial de células inflamatórias mononucleares, além de fibroplasia peribronquiolar, bronquiolite ulcerativa e pneumonia necrotizante proliferativa (KIM; CHUNG; CHAE, 2003; OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012; SEGALÉS, 2012; CASWELL; WILLIAMS, 2016). Quando ocorre coinfeção com *Mycoplasma hyopneumoniae* ou outros agentes bacterianos, observam-se hiperplasia de tecido linfoide peribronquiolar ou infiltrado inflamatório purulento (OPRIESSNIG; LANGOHR, 2012).

As principais lesões observadas no intestino são depleção linfoide e infiltrado de histiócitos em placas de Peyer, infiltrado linfohistiocítico na mucosa, depleção de células caliciformes, atrofia de vilosidades e dilatação de vasos linfáticos (ZLOTOWSKI *et al.*, 2008; SEGALÉS, 2012). Histologicamente, as máculas e pápulas observadas em suínos com SDNS, se caracterizam por necrose e hemorragias cutâneas, associadas à vasculite necrotizante. Por sua vez, a lesão renal consiste em glomerulonefrite fibrinonecrótica e nefrite intersticial linfohistiocítica (SEGALÉS; ROSELL; DOMINGO, 2004; IMAI *et al.*, 2006). Em fetos infectados por PCV2, o miocárdio apresenta áreas extensas de degeneração, edema, e necrose, com fibrose moderada e infiltrado difuso de linfócitos e macrófagos (PITTMAN, 2008; SCHLAFER; FOSTER, 2016).

3.2.10. Diagnóstico

PCV2 pode ser detectado em suínos com infecção subclínica ou com sinais clínicos característicos de DAPCV2. O diagnóstico de doença clínica deve ser obtido com base na combinação entre os sinais clínicos, lesões macroscópicas, lesões histológicas características associadas à demonstração de antígenos e/ou ácido nucléico de PCV2 nos tecidos (ROSELL *et al.*, 1999; SEGALÉS; DOMINGO, 2002; KIM; CHAE, 2004; CASWELL; WILLIAMS, 2016). As principais técnicas usadas para detectar a infecção por PCV2 são testes sorológicos, isolamento viral, IHQ, hibridização *in situ* e a PCR (SORDEN *et al.*, 1999; CALSAMIGLIA *et al.*, 2002; KIM; CHAE,

2004; GALINDO-CARDIEL *et al.*, 2011; GALINDO-CARDIEL *et al.*, 2011; MONROY *et al.*, 2014; BARÓ; SEGALÉS; MARTÍNEZ, 2015).

A detecção de anticorpos contra PCV2 no soro de suínos, pode ser feita através das técnicas de imunofluorescência indireta, imunoperoxidase e ELISA (ZANELLA, 2007; OPRIESSNIG; MENG; HALBUR, 2007). A sorologia não pode ser utilizada para o diagnóstico da infecção clínica por PCV2, uma vez que, suínos com infecção subclínica podem ser soropositivos (GILLESPIE *et al.*, 2009).

O isolamento viral é frequentemente feito em células de rim suíno das linhagens PK15 não infectadas por PCV1 a partir de amostras de soro, fluido de lavagem bronquial e tecido macerado (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2012). O PCV2 não apresenta efeito citopático nos cultivos celulares, por isso, a confirmação do isolamento viral é obtida através das técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase (ALLAN; ELLIS, 2000).

A técnica de hibridização *in situ* permite identificar o genoma de PCV2 em cortes histológicos e tem sido usada no diagnóstico de doenças associadas à infecção por PCV2 (KIM; CHAE, 2004; GALINDO-CARDIEL *et al.*, 2011). Esta técnica tem a desvantagem de empregar reagentes de custo elevado e o tempo necessário para a obtenção dos resultados é demorado (SORDEN *et al.*, 1999).

O exame de IHQ permite visualizar antígenos de PCV2 associados à lesão histológica (OPRIESSNIG *et al.*, 2009a; HANSEN *et al.*, 2010b). Para que antígenos de PCV2 sejam detectáveis através desta técnica, é necessário que a amostra apresente no mínimo, 10^8 cópias de genomas de PCV2 por 500 ng de DNA (BRUNBORG; MOLDAL; JONASSEN, 2004). A imunomarcagem é evidenciada em histiócitos e células gigantes, principalmente, nos centros foliculares dos linfonodos, macrófagos alveolares, epitélio das glândulas peri-bronquiolares, e no epitélio tubular das alças de Henle e dos túbulos coletores renais (CORRÊA *et al.*, 2006; OPRIESSNIG *et al.*, 2009a; HANSEN *et al.*, 2010b). Em fetos abortados, antígenos de PCV2 são detectados nos cardiomiócitos (PITTMAN, 2008). Lesões histológicas acentuadas associadas à grande quantidade de antígenos de PCV2 nos tecidos, sugerem a ocorrência de SMDS. Por sua vez, a detecção de lesões histológicas discretas, associadas à baixa quantidade de antígenos é característica de infecção subclínica por PCV2, ou, de estágio inicial ou convalescente da SMDS (SEGALES; DOMINGO, 2002; SEGALÉS, 2012).

A detecção de DNA de PCV2, a partir de amostras de soro, tecidos frescos, fezes, sêmen e fetos abortados é feita através de vários tipos de PCR (OPRIESSNIG *et*

al., 2003; KIM; JUNG; CHAE, 2004; FORT *et al.*, 2007; OPRIESSNIG *et al.* 2008; ZLOTOWSKI *et al.*, 2008; SARLI *et al.*, 2012); assim como é possível através de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (OJOK *et al.*, 2013). A detecção de material genético de PCV2 em amostras de soro permite a realização de estudos epidemiológicos em suínos vivos (CALSAMIGLIA *et al.*, 2002). A PCR quantitativa pode detectar quantidades mínimas de DNA de PCV2 contidos numa determinada amostra (CALSAMIGLIA *et al.*, 2002). Suínos que apresentam cópias de genoma de PCV2, iguais ou superiores a 10^7 /mL de soro, têm maior probabilidade de apresentar lesões e sinais clínicos associados à infecção por PCV2 (BRUNBORG; MOLDAL; JONASSEN, 2004; SEGALÉS *et al.* 2005). Contudo, um resultado positivo na PCR não é conclusivo para o diagnóstico da infecção clínica por PCV2, visto que, suínos com infecção subclínica, também podem ser positivos no exame de PCR (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2012). Sendo assim, o resultado da PCR deve ser associado à visualização de lesões histológicas associadas à presença de antígenos do vírus.

3.2.11. Prevenção e controle

A prevenção e controle da infecção por PCV2 é realizada através da correção de fatores de manejo que podem favorecer a infecção e através da vacinação (ALARCON *et al.*, 2011; MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2012). As principais medidas de manejo incluem a aplicação de antibióticos para a prevenção de infecções bacterianas, otimização de medidas de biossegurança, limpeza e desinfecção de instalações, redução de fatores de estresse (densidade das baias, ventilação inadequada e controle de temperatura), isolamento de suínos afetados e controle de doenças virais concomitantes (MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2012; PATTERSON *et al.*, 2015).

Atualmente, várias vacinas comerciais para PCV2 estão disponíveis, o que reduziu significativamente o impacto negativo causado pela infecção por esse vírus (OPRIESSNIG *et al.*, 2009c; KRISTENSEN; BAADSGAARD; TOFT, 2011). As principais vacinas comerciais disponíveis para PCV2 são: Circovac® (Merial S.A.S., Lyon, France), Ingelvac® CircoFLEX (Boehringer Ingelheim, Ingelheim/Rhein, Germany), Suvaxyn® PCV2 (Fort Dodge Animal Health Limited, Southampton, United Kingdom), Porcilis® PCV (Intervet International BV, Boxmeer Netherlands), e Circumvent® PCV (Intervet/ScheringPlough Animal Health, Millsboro, USA)

(KRISTENSEN; BAADSGAARD; TOFT, 2011; MORÉS; BARCELLOS; ZANELLA, 2012; CHAE, 2012). As vacinas comerciais são inativadas, baseadas no genótipo PCV2a e fornecem imunidade cruzada à infecção por PCV2b (FORT *et al.*, 2008).

As vacinas estimulam resposta imunológica humoral e celular (MENG, 2013; SEGALÉS, 2014; SEO *et al.*, 2014) e podem ser aplicadas a porcas ou leitões (CHAE *et al.*, 2012). O protocolo de vacinação de porcas consiste em duas doses com intervalo de 3-4 semanas, sendo que, a segunda, é administrada pelo menos duas semanas antes do parto, visando o aumento de imunoglobulina G anti-PCV2 no colostro. O grau de imunidade anti-PCV2 no leitão depende da quantidade de colostro que este ingerir nas primeiras 24 a 48 horas após o nascimento, e do tempo médio de vida dos anticorpos maternos (CHAE, 2012). Por outro lado, o protocolo de vacinação de leitões, consiste em aplicar a vacina a partir da terceira semana de idade (MENG *et al.*, 2013), quando o nível de anticorpos maternos residuais é mínimo (CHAE, 2012).

As vacinas contra PCV2 reduzem a viremia e a quantidade de DNA viral em órgãos linfoides, mesmo quando a vacina é aplicada em suínos com viremia de PCV2 e com anticorpos maternos (FORT *et al.*, 2008; SEO *et al.*, 2014). A aplicação da vacina contra PCV2 em leitões com infecção subclínica melhora o ganho de peso diário e reduz a taxa de mortalidade (YOUNG; CUNNINGHAM; SANFORD, 2011). A eficácia da vacina contra PCV2 é avaliada pela sua capacidade de prevenir infecção, de reduzir a severidade de lesões, e induzir uma resposta imunológica capaz de reduzir significativamente a viremia, excreção e probabilidade de transmissão do PCV2 (FORT *et al.*, 2008; OPRIESSNIG *et al.*, 2009c). Falhas vacinais associadas à vacina contra PCV2 podem ocorrer devido à aplicação da vacina em suínos doentes ou imunodeprimidos e o não respeito das indicações do produtor da vacina (OPRIESSNIG *et al.*, 2009c). Falhas vacinais relacionadas a vacina contra PCV2 também tem sido associadas a emergência de PCV2d (OPRIESSNIG *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2014).

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os materiais e métodos aplicados, os resultados e as discussões da pesquisa serão a seguir apresentados em dois artigos científicos.

Artigo 1:

Infecção pelo vírus influenza A em suínos de Moçambique

Cláudio J. M. Laisse, Matheus V. Bianchi, Paula R. Pereira, Cintia De Lorenzo, Saulo P. Pavarini e David Driemeier

O artigo foi submetido para publicação no periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

Artigo 2:

Detection and phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs in Mozambique

Cláudio João Mourão Laisse, Carine Kunzler Souza, Paula Reis Pereira, Cíntia De Lorenzo, Matheus Viezzer Bianchi, Lourenço P. Mapaco, Saulo Petinatti Pavarini, Cláudio Wageck Canal, David Driemeier.

O artigo será submetido para publicação a um periódico por identificar.

4.1. Artigo 1.

Infecção pelo vírus influenza A em suínos de Moçambique¹

Cláudio J. M. Laisse^{2,3*}, Matheus V. Bianchi², Paula R. Pereira², Cintia De Lorenzo², Saulo P. Pavarini² e David Driemeier²

ABSTRACT. - Laisse C.J.M., Bianchi M.V., Pereira P.R., De Lorenzo C., Pavarini S.P. & Driemeier D. 2017. [**Influenza A virus infection in pigs from Mozambique.**] Infecção pelo vírus influenza A em suínos de Moçambique. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: claudiolaisse@yahoo.com.br

Swine influenza (SI) is an acute and highly contagious disease of the respiratory tract of pigs caused by influenza A virus (IAV). The disease causes economic losses in swine production and is of great public importance for its *zoonotic potential*. The aim of the present study was to report IAV infection in pigs from Mozambique and characterize the anatomopathological and immunohistochemical features of associated lung lesions. Lungs from 457 slaughtered pigs were subjected to gross evaluation and 38 (8.3%) lungs with cranioventral consolidation were collected from a slaughterhouse in Matola City, southern Mozambique. Areas of consolidation in each lung lobe were classified in 4 grades according to the lesion extension. Samples with consolidated lung tissue were examined for histopathology and *immunohistochemistry* for the presence of IAV, Porcine circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens. The lungs had multifocal to coalescing areas of consolidation lesions observed most frequently in the cranial, middle, and accessory lobes. The lesions involved mainly one or three pulmonary lobes and grade 1 and 2 lesions were the most frequent. The main histopathological findings were necrotizing bronchiolitis (23/38), alveolar neutrophil infiltration (24/38), type II pneumocytes hyperplasia (26/38), peribronchiolar lymphoid tissue hyperplasia (28/38) and interstitial mononuclear cells infiltrate (29/38). Immunohistochemistry (IHQ) revealed positive staining in 84.3% (32/38) of the samples and IAV nucleoprotein was present in the nucleus of bronchial and bronchiolar epithelial cells and alveolar macrophages. Positive IHQ pigs were from Matutuine district (5/32), Moamba district (2/32), Namaacha district (21/32), Boane district (3/32) and Matola city (1/32). All lung samples were immunohistochemically negative for PCV2 and *Mycoplasma hyopneumoniae*. These results demonstrate that IAV is a cause of pneumonia in pigs in Mozambique.

INDEX TERMS: Swine diseases, Influenza A virus, immunohistochemistry, pulmonary consolidation, Mozambique.

¹Recebido em

Aceito para publicação em.....

² Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: claudiolaisse@yahoo.com.br

³ Secção de Anatomia Patológica, Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane (UEM), Av. de Moçambique, Km 15, Maputo, Moçambique.

RESUMO.-A influenza suína (IS) é uma doença aguda e altamente contagiosa do trato respiratório de suínos, causada pelo vírus influenza A (VIA). A doença provoca perdas econômicas na suinocultura e também, tem importância na saúde pública devido ao seu potencial zoonótico. O objetivo deste trabalho foi relatar a infecção pelo VIA em suínos de Moçambique e realizar a caracterização anatomopatológica e imuno-histoquímica (IHQ) das lesões pulmonares associadas. Pulmões de 457 suínos abatidos foram avaliados e coletados 38 (8.3%) pulmões de suínos com áreas de consolidação pulmonar em um abatedouro na cidade da Matola, no Sul de Moçambique. As áreas de consolidação em cada lobo pulmonar foram classificadas em 4 graus de acordo com a extensão da lesão. Amostras de pulmões com consolidação foram submetidas ao exame histopatológico e IHQ para a detecção de antígenos do VIA, Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Os pulmões coletados apresentaram áreas multifocais ou coalescentes de consolidação pulmonar, frequentemente, observadas nos lobos craniais, mediais e acessório. Estas lesões acometiam principalmente um ou três lobos pulmonares e as lesões de grau 1 e 2 foram as mais frequentes. As principais lesões histopatológicas observadas foram bronquiolite necrotizante (23/38), infiltrado de neutrófilos nos alvéolos (24/38), hiperplasia de pneumócitos tipo II (26/38), hiperplasia de tecido linfóide peribronquiolar (28/38), e pneumonia intersticial mononuclear (29/38). No exame de IHQ, antígenos do VIA foram detectados em 84.3% (32/38) dos pulmões com pneumonia, e a nucleoproteína do vírus foi visualizada, no núcleo de células epiteliais de brônquios e bronquíolos e em macrófagos alveolares. Suínos positivos para o VIA na IHQ eram provenientes do distrito de Matutuine (5/32), distrito da Moamba (2/32), distrito de Namaacha (21/32), distrito de Boane (3/32) e Cidade da Matola (1/32). Todas as amostras foram negativas para PCV2 e *Mycoplasma hyopneumoniae* pelo exame de IHQ. Os resultados demonstram que o VIA está presente e é causa de pneumonia em suínos em Moçambique.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de suínos, Vírus influenza A, imuno-histoquímica, consolidação pulmonar, Moçambique.

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas respiratórias de suínos são um dos principais problemas sanitários na suinocultura tecnificada e são causadas por agentes virais e bacterianos que fazem parte do complexo de doenças respiratórias dos suínos (CDRS) (Van Alstine 2012). Um dos agentes envolvidos no CDRS é o vírus influenza A (VIA), um vírus RNA de cadeia simples negativa, da Família Orthomyxoviridae (Harms et al. 2002, Kothalawala et al. 2006, Van Alstine 2012, Van Reeth et al. 2012). O VIA pode infectar vários hospedeiros, incluindo suínos e humanos (Dandagi & Byahatti 2011). A influenza suína (IS) é uma doença aguda e altamente contagiosa, de distribuição mundial, que causa importante impacto econômico na suinocultura (Kothalawala et al. 2006).

Os principais subtipos do VIA que infectam suínos são H1N1, H1N2 e H3N2 (Choi et al. 2003, Lyoo et al. 2014, Vincent et al. 2014, Janke 2014). Contudo, os suínos também podem se infectar com outros subtipos do VIA, originários de humanos e aves, o que os torna um hospedeiro importante na epidemiologia da infecção pelo vírus (Ito et al. 1998). A transmissão natural do VIA entre suínos ocorre através do contato direto com secreções de animais infectados ou por aerossóis, e provoca um quadro clínico agudo caracterizado por febre, respiração abdominal, descarga nasal, tosse e depressão (Jung et al. 2005, Rajão et al. 2013, Vincent et al. 2014, Caswell & Williams 2016). A doença acomete suínos de qualquer idade, causa alta morbidade, porém, baixa taxa de mortalidade (Van Reeth et al. 2012). O diagnóstico presuntivo de IS pode ser obtido com base nos sinais clínicos e lesões macroscópicas e histológicas características da infecção pelo vírus, contudo, o diagnóstico definitivo é baseado no isolamento viral, detecção de antígenos e/ou material genético do vírus (Van Reeth et al. 2012, Schaefer et al. 2013).

Em Moçambique, a população suína é estimada em 1.588,325 (INE 2016) e as produções em sua maior parte são pequenas (com menos de 50 suínos) (INE 2001, INE

2011) e fazem criação em sistema extensivo. Contudo, há uma tendência em aumentar o número de médias propriedades (INE 2001, INE 2011), que criam os suínos em confinamento, o que favorece a ocorrência de doenças respiratórias (Mastin et al. 2011). Contrariamente ao verificado na Europa, Ásia e Américas, em países da África, pesquisas sobre a infecção pelo VIA em suínos são escassas ou inexistentes (Meseko et al. 2013). Em Moçambique, não há trabalhos publicados que descrevam a ocorrência deste vírus na população suína. O objetivo desse trabalho é relatar a ocorrência de infecção pelo VIA em suínos de Moçambique e realizar uma caracterização anatomopatológica e imuno-histoquímica das lesões pulmonares.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Pulmões com alterações macroscópicas de consolidação pulmonar foram coletadas de suínos, durante o abate, em um abatedouro localizado na cidade da Matola, Província de Maputo, no sul de Moçambique (25° 55' 26" S, 32° 27' 57" E), no período de dezembro de 2014 a fevereiro de 2015 e dezembro de 2015 a fevereiro de 2016. Este abatedouro de suínos é o maior na região sul de Moçambique e abate suínos provenientes de vários distritos desta região, principalmente, de granjas comerciais que fazem a criação de suínos em confinamento.

Exame macroscópico

Os suínos abatidos não foram submetidos à avaliação clínica para detectar sinais clínicos de doença respiratória. Pulmões de todos os suínos abatidos nos dias em que foram feitas as coletas foram submetidos a avaliação visual e palpação para detectar alteração de cor e consistência nos sete lobos pulmonares: cranial esquerdo (CRE) e direito (CRD), medial esquerdo (ME) e direito (MD), acessório (A), caudal esquerdo (CAE) e direito (CAD) (Van Alstine 2012).

Os pulmões que apresentaram consolidação pulmonar, a porcentagem da área da lesão em cada lobo foi estimada com base na divisão imaginária dos lobos em quatro partes iguais e classificada segundo o método de Madec e Kobisch (Lyo et al. 2014). A porcentagem da área com consolidação em cada lobo foi expressa nos seguintes graus: grau 0, sem lesão; grau 1, pneumonia discreta (1 a 25% do lobo pulmonar); grau 2, pneumonia moderada (26 a 50% do lobo pulmonar); grau 3, pneumonia acentuada (51 a 75 % do lobo pulmonar); e grau 4, pneumonia muito acentuada (76 a 100 % do lobo pulmonar).

A porcentagem da área de consolidação por lobo pulmonar, origem e peso vivo do suíno foram registrados. A idade dos suínos abatidos não estava disponível nos registros do abatedouro.

Histopatologia e exame de imuno-histoquímica.

As amostras de pulmões com consolidação foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas, processadas rotineiramente para histologia, incluídas em blocos de parafina, cortadas a 3µm e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Para detectar antígenos do VIA, todas as amostras de pulmão com pneumonia foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica (IHQ). A recuperação antigênica foi obtida com protease XIV por 25 minutos a 37°C. A inibição de ligações não específicas foi realizada com leite desnatado 5%, durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). As lâminas foram incubadas overnight em anticorpo primário policlonal anti-IA na diluição de 1:500 (Millipore, Billerica, MA, USA). Foi utilizado como anticorpo secundário o polímero MACH 4 Universal HRP-Polymer (Biocare Medical, Concord, CA). A reação foi revelada com o cromógeno 3´3-diaminobenzidina (DAB, Dako). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, cortes de pulmão foram

incubados com solução tampão salina (PBS), ao invés de anticorpo primário e para controle positivo foram empregados cortes de pulmão positivos para o VIA (Watanabe et al. 2012).

As amostras de pulmão foram igualmente submetidas a exame de IHQ para Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) empregando um anticorpo policlonal anti-PCV2 (Iowa State University, USA) na diluição de 1:1000 (Zlotowski et al. 2008) e para *Mycoplasma hyopneumoniae* usando um antisoro autoimune anti-*Mycoplasma hyopneumoniae*, gentilmente cedido por Nelson Morés (CNPSA/Embrapa), na diluição de 1:200 (Almeida et al. 2012).

RESULTADOS

Exame macroscópico

No período em que foram realizadas as coletas de amostras, foram abatidos e avaliados 457 suínos, (mínimo de seis e máximo de 47 suínos abatidos/dia) provenientes da Cidade de Maputo e Províncias de Maputo (distritos de Boane, Matola, Manhiça, Matutuine, Moamba e Namaacha,) e Gaza (distritos de Chibuto e Xai-Xai). Os suínos abatidos eram de raças exóticas, principalmente, Large White e Landrace e raças locais (raça landim), principalmente, de granjas comerciais.

Trinta e oito (8.3%) suínos apresentaram áreas de consolidação, em pelo menos um lobo pulmonar, e estas, eram multifocais ou coalescentes, bem delimitadas, avermelhadas a acinzentadas e com consistência aumentada em relação ao parênquima pulmonar normal (Fig.1). Consolidação pulmonar foi detectada afetando um (31.6%), dois (7.9%), três (26.3%), quatro (7.9%), cinco (5.3%), seis (10.5%) e sete (10.5%) lobos. Os lobos MD (76.3%) e ME (57,9%) foram os mais acometidos e apresentaram maior porcentagem de lesões de graus 2, 3 e 4, enquanto os lobos CAD (26.3%) e CAE (26.3%) foram os menos afetados, e, quando acometidos, apresentaram lesões de graus 1 e 2 (Quadro 1). Os pulmões com consolidação geralmente apresentavam-se não colapsados e alguns tinham secreção mucopurulenta no interior de brônquios e bronquíolos e edema.

O peso vivo dos suínos que apresentaram consolidação pulmonar (n = 38) variava de 5 a 120 Kg (média de 64.3 Kg). Em relação à origem, 13.2% (5/38) eram do distrito de Matutuine, 5.3% (2/38) do distrito de Moamba, 68.4% (26/38) do distrito de Namaacha, 2.6% (1/38) do distrito de Chibuto, 7.9% (3/38) do distrito de Boane e 2.6% (1/38) da cidade da Matola. Todos os suínos com pneumonia, provenientes do distrito de Namaacha (n=26) eram de uma granja comercial e foram abatidos entre os meses de dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. Durante visita técnica a esta granja, constatou-se que aplicava um sistema de criação semi-intensivo.

Quadro 1: Distribuição percentual dos diferentes graus de lesão nos lobos dos 38 pulmões de suínos que apresentaram consolidação.

Grau	% de casos por grau de pneumonia em cada lobo pulmonar						
	CRD	CRE	MD	ME	A	CDE	CDD
0	54.1	56.8	24.3	40.5	51.4	73	73
1	13.5	18.9	21.6	8.1	18.9	24.3	24.3
2	18,9	10.8	18.9	27	8.1	2.7	2.7
3	2.7	2.7	18.9	8.1	10.8	0.0	0.0
4	10.8	10.8	16.2	16.2	10.8	0.0	0.0
Total	100	100	100	100	100	100	100

Lobos pulmonares - CRD: cranial direito, CRE: cranial esquerdo, MD: medial direito, ME: medial esquerdo, A: acessório, CAD: caudal direito e CAE: caudal esquerdo.

Histopatologia

Foram observadas lesões microscópicas com graus de severidade distintos, sendo que, as lesões mais frequentes foram bronquiolite necrotizante (23/38) (Fig.2A) infiltrado de neutrófilos nos alvéolos (24/38), hiperplasia de pneumócitos tipo II (26/38), hiperplasia de tecido linfóide peribronquiolar (BALT) (28/38), e pneumonia intersticial mononuclear (29/38). O infiltrado intersticial era constituído, principalmente, por linfócitos e plasmócitos, que eram, frequentemente, observados no espaço perivascular e peribronquiolar. Alguns pulmões apresentaram ainda bronquiolite obliterante (Fig.2B), edema alveolar e intersticial, pleurite, hiperemia, áreas de atelectasia e enfisema.

Imuno-histoquímica

Antígenos do VIA foram detectados em 32/38 dos pulmões de suínos com pneumonia. Os suínos positivos eram de granjas dos distritos de Matutuine (5/32), distrito de Moamba (2/32), distrito de Namaacha (21/32), distrito de Boane (3/32) e Cidade da Matola (1/32). A imunomarcagem foi visualizada no núcleo de células epiteliais de bronquíolos (Fig.2C) e/ou brônquios (25/32, 78%) (Fig.2D), ou em macrófagos localizados nos septos alveolares ou na luz dos alvéolos (27/32, 84.4%). Em 20/32 (62.5%) amostras, a imunomarcagem foi concomitante em células epiteliais de bronquíolos e/ou brônquios e nos macrófagos alveolares (Fig.2D). Onze amostras também apresentaram imunomarcagem no epitélio de glândulas bronquiais. Todos os pulmões que apresentaram pneumonia (n=38) foram negativos no exame de IHQ para PCV2 e *M. hyopneumoniae*.

DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a frequência e severidade de pneumonias, achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos associados à infecção pelo VIA em pulmões de suínos em Moçambique. A pneumonia é a lesão pulmonar mais frequente em suínos ao abate (Fraile et al. 2010, Fablet et al. 2011, Van Alstine 2012). A frequência de pneumonias observada nesse estudo (8.3%) é menor em relação à registada em países como França (50.8%) (Fablet et al. 2011), Espanha (55.7%) (Fraile et al. 2010) e Nova Zelândia (63.4%) (Stark et al. 1998). Isso, possivelmente, se deve ao fato de que em Moçambique, a suinocultura ser, principalmente, extensiva e semi-intensiva, com suínos criados livres ou em baias não totalmente fechadas e com pouca densidade animal. No presente estudo, a maior frequência de pneumonias foi observada em uma granja do distrito de Namaacha 68% (26/38) que faz a criação de suínos em confinamento, num sistema de criação semi-intensivo. A ocorrência de pneumonias associada ao sistema de criação aplicado nessa granja corrobora o fato de que granjas que criam os suínos em confinamento e com maior número de suínos por baía são mais suscetíveis de registar doenças respiratórias (Mastin et al. 2011).

As áreas de consolidação pulmonar geralmente apresentavam padrão cranioventral e envolveram, principalmente, os lobos craniais, mediais e acessório. Os principais diagnósticos diferenciais para este padrão de lesão incluem a infecção pelo VIA, *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 associado à *Pasteurella multocida* (Fraile et al. 2010, Gauger et al. 2012). O aspecto macroscópico típico de pneumonia por influenza em suínos é de áreas vermelhas, ligeiramente deprimidas (atelectasia) e firmes (consolidação), afetando áreas extensas da região cranioventral do pulmão, podendo se estender às áreas caudais em lóbulos isolados, dando o aspecto de “tabuleiro de xadrez” (Pereda et al. 2010, Schaefer et al. 2013). No presente trabalho, este padrão de lesão foi observado em vários pulmões, pelo que, a confirmação da infecção pelo VIA foi feito através da visualização de antígenos virais associados a lesão pulmonar (Van Reeth et al. 2012, Schaefer et al. 2013).

Uma das principais lesões histológicas observadas nos suínos desse estudo foi a bronquiolite necrotizante. Esse tipo de lesão histopatológica é característica da infecção aguda pelos subtipos do VIA adaptados a suínos (H1N1, H1N2 e H3N2) e pelo VIA

H1N1pdm2009 (Sreta et al. 2009, Pereda et al. 2010, Lyoo et al. 2014). Assim como descrito em outros estudos (Sreta et al. 2009, Watanabe et al. 2012, Rajão et al. 2013), no exame de IHQ, antígenos de VIA foram visualizados no núcleo de células epiteliais de brônquios e bronquíolos e/ou em macrófagos alveolares. Em 11 amostras de pulmão, imunomarcagem para a nucleoproteína do VIA, também foi observada no epitélio de glândulas bronquiais, achado também descrito em suínos (Rajão et al. 2013) e em humanos (Nakajima et al. 2012) infectados pelo VIA H1N1pdm2009. O fato de a imunomarcagem ter sido frequente nos macrófagos alveolares e alguns pulmões terem apresentado número reduzido de células positivas, associado à alta frequência de pneumonia intersticial linfoplasmocitária, hiperplasia de BALT e hiperplasia de pneumócitos tipo II, sugere que a maioria dos suínos avaliados no presente estudo apresentavam infecção subaguda pelo VIA (Valheim et al. 2011, Caswell & Williams 2016). Adicionalmente, três suínos com resultado negativo na IHQ para o VIA apresentaram lesões histopatológicas sugestivas de infecção por este vírus. A marcação do VIA na IHQ ocorre, principalmente, na fase aguda da doença (um a cinco dias após a infecção) e a quantidade de antígenos no pulmão está reduzida a partir do sétimo dia após a infecção (Jung et al. 2005, Gauger et al. 2012, Lyoo et al. 2014). Antígenos do VIA foram detectados em suínos com peso vivo entre 5 e 120 kg, o que demonstra que este vírus pode infectar suínos de diferentes faixas etárias, assim como descrito por Watanabe et al. (2012) e Rajão et al. (2013).

Suínos infectados pelo VIA geralmente apresentam coinfeção com outros patógenos do CDRS (Harms et al. 2002, Choi et al. 2003, Valheim et al. 2011, Rajão et al. 2013). Choi et al. (2003) detectaram o VIA em 636 (22.2%) amostras de pulmões de suínos, sendo que, a infecção simples pelo VIA foi observada em 89 (3.1%) amostras, enquanto que, coinfeção entre o VIA e *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) e PCV2 ocorreu, respectivamente, em 148 (5.2%), 122 (4.3%), 109 (3.8%) e 54 (1.9%) amostras. No presente estudo, todos os pulmões com pneumonia foram negativos no exame de IHQ para *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2. As amostras não foram submetidas ao cultivo bacteriano nem a pesquisa para o PRRSV, contudo, não se descarta a possibilidade de ter havido coinfeção entre o VIA e agentes bacterianos, já que, vários pulmões apresentaram broncopneumonia supurativa sugestiva de infecção bacteriana. Todavia, histologicamente, na infecção por PRRSV não há envolvimento do epitélio de bronquíolos (Caswell & Williams 2016), o que pode auxiliar na diferenciação da infecção pelo VIA. O PRRSV ainda não foi descrito em Moçambique.

Antígenos do VIA foram detectados em suínos provenientes de vários distritos, o que sugere que este vírus está disseminado na população suína em Moçambique. O fato de os suínos da granja de Namaacha que apresentaram pneumonia e imunomarcagem para o VIA terem sido abatidos num período de dois meses, sugere que o abate ocorreu num período em que o lote abatido tinha sido afetado por um surto de IS. Portanto, devem ser tomadas medidas de controle da influenza suína, principalmente, nas granjas comerciais. O VIA pode infectar humanos, e as pessoas que trabalham com suínos são o grupo mais suscetível (Dandagi & Byahatti 2011). Em Moçambique, foram confirmados casos clínicos e óbitos humanos associados à infecção pelo vírus da influenza A H1N12009 pandêmico (WHO 2009), contudo, não há dados que confirmam a transmissão do vírus entre humanos e suínos.

Os resultados deste trabalho demonstram que o VIA é importante causa de pneumonia em suínos em Moçambique. Recomenda-se a realização de estudos com o objetivo de caracterizar os subtipos do VIA circulantes, seu impacto na suinocultura e na saúde pública nesse país.

Agradecimentos.-Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil e The World Academy of Sciences (TWAS) - a bolsa de doutorado do primeiro autor foi financiada no âmbito do edital "CNPq-TWAS Fellowships Programme

2012". A direção e funcionários do abatedouro por terem tornado possível à coleta de amostras. Aos técnicos do sector de Anatomia Patológica da Faculdade de Veterinária da Universidade Eduardo Mondlane pelo apoio no processamento histopatológico das amostras.

REFERÊNCIAS

- Almeida P.R., Andrade C.P., Almeida L.L., Oliveira L.G.S., Castro L.A., Zlotowski P., Silva S.C. & Driemeier D. 2012. Nested-PCR for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial alveolar swabs, frozen tissues and formalin-fixed paraffin-embedded swine lung samples: Comparative evaluation with immunohistochemical findings and histological features. *Pesq. Vet. Bras.* 32:715-720.
- Caswell J.L. & Williams, K.J. 2016. Respiratory system, p. 526-527. In: Maxie. M. G. (Ed). Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 6th ed. v. 2. Elsevier. St. Louis.
- Choi Y.K., Goyal S.M. & Joo H.S. 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pig. *Can. Vet. J.* 44:735-737.
- Dandagi G.L. & Byahatti S.M. 2011. An insight into the swine-influenza A (H1N1) virus infection in humans. *Lung India.* 28:34-38.
- Fablet C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Madec F. & Rose N. 2011. Prevalence of macroscopic lung lesions in slaughter pigs in France. Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, p. 47-49. (Resumo)
- Fraile L., Alegre A., López-Jiménez R., Nofrarias M. & Segalés J. 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* 184:326-333.
- Gauger P.C., Vincent A.L., Loving C.L., Henningson J.N., Lager K.M., Janke B.H., Kehrlir M.E. & Roth J.A. 2012. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus. *Vet. Pathol.* 49:900-912.
- Harms P.A., Halbur P.G. & Sorden S.D. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.* 10:27-30.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). 2001. Censo Agro-Pecuário 1999-2000: apresentação sumária dos resultados, quadros e gráficos – Moçambique. p. 83-89.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). 2011. Censo Agro-Pecuário 2009-2010: resultados preliminares - Moçambique. Moçambique. p. 85-89.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). 2016. Anuário Estatístico. Moçambique. p. 54. Disponível em www.ine.gov.mz/estatisticas/publicacoes/anuario/nacionais/anuario-estatistico-2015>. Acesso em 20 out. 2016.
- Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G. & Kawaoka Y. 1998: Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72:7367-7373.

- Janke B.H. 2014. Influenza A Virus Infections in Swine: Pathogenesis and Diagnosis. *Vet. Pathol.* 51:410-426.
- Jung K., Ha Y. & Chae C. 2005. Pathogenesis of swine influenza virus subtype H1N2 infection in pigs. *J. Comp. Pathol.* 132:179-184.
- Kothalawala H., Toussaint M.J. & Gruys E. 2006. An overview of swine influenza. *Vet. Q.* 28:46-53.
- Lyou K.S., Kim J.K., Jung K., Kang B.K. & Song D. 2014. Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. *Virol. J.* 11:1-6.
- Mastin A., Alarcon P., Pfeiffer D., Wood J., Williamson S., Brown, I., COSI Consortium & Wieland B. 2011. Prevalence and risk factors for swine influenza virus infection in the English pig population. *PLoS Currents*, 3. RRN1209.
- Meseko C., Olaleye D., I. Capua I. & Cattoli G. 2013. Swine Influenza in Sub-Saharan Africa – Current Knowledge and Emerging Insights. *Zoonoses Public Health.* 61:229-37.
- Nakajima N., Sato Y., Katano H., Hasegawa H., Kumasaka T., Hata S., Tanaka S., Amano T., Kasai T., Chong J.M., Iiduka T., Nakazato I., Hino Y., Hamamatsu A., Horiguchi H., Tanaka T., Hasagawa A., Kanaya Y., Oku R., Oya T. & Sata T. 2012. Histopathological and immunohistochemical findings of 20 autopsy cases with 2009 H1N1 virus infection. *Mod. Pathol.* 25:1-13.
- Pereda A., Cappuccio J., Quiroga M.A., Baumeister E., Insarralde L., Ibar M., Sanguinetti R., Cannilla M.L., Franzese D., Escobar Cabrera O.E., Craig M.I., Rimondi A., Machuca M., Debenedetti R.T., Zenobi C., Barral L., Balzano R., Capalbo S., Risso A. & Perfumo C.J. 2010. Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on pig farm, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 16:304-307.
- Rajão D.S., Couto D.H., Gasparini M.R., Costa A.T.R., Reis J.K.P., Lobato Z.I.P., Guedes R.M.C. & Leite R.C. 2013. Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. *Pesq. Vet. Bras.* 33:30-36.
- Schaefer R., Rech R.R., Silva M.C., Gava D. & Ciacci-Zanella J.R. 2013. Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. *Pesq. Vet. Bras.* 33:61-73.
- Sreta D., Kedkovid R., Tuamsang S., Kitikoon P. & Thanawongnuwech R. 2009. Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: An experimental trial. *Virol. J.* 6:1-11.
- Stark K.D.C., Pfeiffer D.U. & Morris, R.S. 1998. Risk factors for respiratory diseases in New Zealand pig herds. *New Zealand Vet. J.* 46:3-10.
- Valheim M., Gamlem H., Gjerset B., Germundsson A. & Lium B. 2011. Pathological findings and distribution of pandemic Influenza A (H1N1) 2009 virus in lungs from naturally infected fattening pigs in Norway. **Influenza Res. Treat.** doi:10.1155/2011/565787.
- Van Alstine W.G. 2012. Respiratory System, p.348-362. In: Zimmerman J., Karriker L., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W (Eds). *Disease of Swine*. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.

- Van Reeth K., Brown I.H. & Olsen C.W. 2012. Influenza virus, p.557-571. In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J. & Stevenson G.W. (Eds), Diseases of Swine. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Vincent A., Awada L., Brown I., Chen H., Claes F., Dauphin G., Donis R., Culhane M., Hamilton K., Lewis N., Mumford E., Nguyen T., Parchariyanon S., Pasick J., Pavade G., Pereda A., Peiris M., Saito T., Swenson S., Van Reeth K., Webby R., Wong F. & Ciacci-Zanella J. 2014. Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public Health*, 61:4–17.
- Watanabe T.T.N., Almeida L.L., Wouters F., Wouters A.T.B., Zlotowski P. & Driemeier D. 2012. Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza A infection in Brazil, 2009-2010. *Pesq. Vet. Bras.* 32:1148-1154.
- World Health Organization (WHO). 2009. Pandemic (H1N1) 2009 in the African region: Update 49. Disponível em <<http://reliefweb.int/report/algeria/pandemic-h1n1-2009-african-region-update-49>>. Acesso em 14 nov. 2016.
- Zlotowski P., Corrêa A.M.R., Barcellos D.E.S.N., Cruz C.E. F., Asanome W., Barry A.F., Alfieri A.A. & Driemeier D. 2008. Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Pesq. Vet. Bras.* 28:313-318.

Figuras e legendas

Fig. 1: Pneumonia pelo vírus influenza A em suínos de abate. Pulmão não colabado, com áreas de consolidação cranioventral nos lobos CRE (grau 1), CRD (grau 2), ME (grau 1) e MD (grau 2).

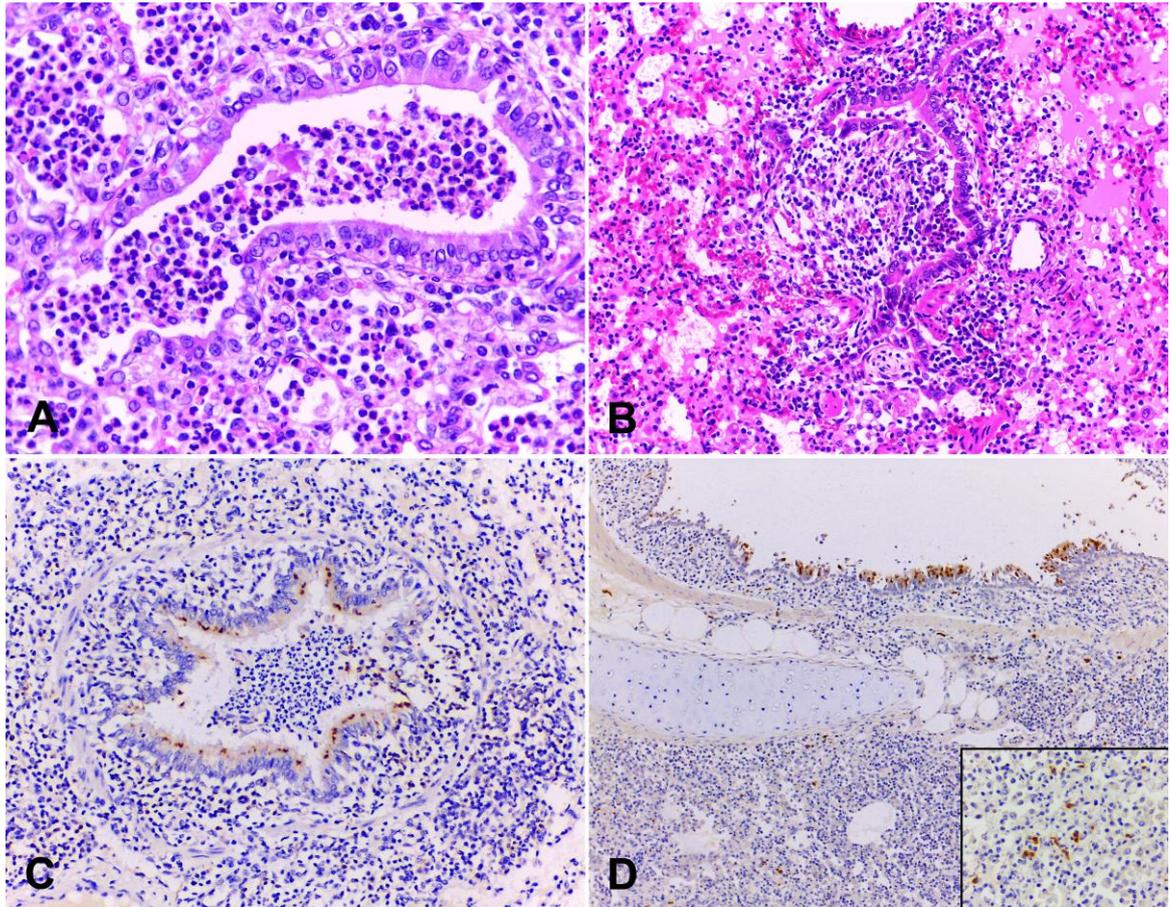


Fig. 2: Pneumonia pelo vírus influenza A em suínos de abate. **(A).** Bronquiolite necrotizante, com infiltrado de neutrófilos no lúmen de bronquíolo e nos espaços alveolares. HE. Obj. 40x. **(B)** Bronquiolite obliterante, infiltrado de linfócitos peribronquiolar e edema alveolar difuso. HE. Obj. 20x. **(C)** Imunomarcção para o VIA em células epiteliais de bronquíolo. IHQ. Obj. 20x **(D)** Imunomarcção para o VIA em células epiteliais de brônquio e marcação multifocal em macrófagos no interstício. A figura menor mostra em detalhe a imunomarcção nos macrófagos alveolares. IHQ. Obj. 10x, detalhe: 40x.

4.2. Artigo 2

Detection and phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 from pigs in Mozambique

Cláudio João Mourão Laisse^{I,II*}, Carine Kunzler Souza^{III}, Paula Reis Pereira^I, Cíntia De Lorenzo^I, Matheus Viezzer Bianchi^I, Lourenço P. Mapaco^{IV}, Saulo Petinatti Pavarini^I, Cláudio Wageck Canal^{III}, David Driemeier^{II}

^ISetor de Patologia Veterinária (SPV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. ^{II}Secção de Anatomia Patológica, Faculdade de Veterinária, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Moçambique. ^{III}Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. ^{IV} Laboratório Central de Veterinária (LCV), Direção de Ciências Animais (DCA), Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), Maputo, Moçambique. *Correspondence: claudiolaisse@yahoo.com.br

Summary

Porcine circovirus-associated diseases (PCVAD) have a significant economic impact on the swine industry worldwide. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is known to be the primary etiological agent and has been detected in many countries. In Africa, *there* is currently little information regarding the occurrence of PCV2 and it has never been reported in Mozambique's swine population. This study aims to detect and phylogenetically analyze PCV2 from pigs in Mozambique. Mesenteric lymph nodes (n=111) were randomly collected from slaughtered pigs from nine districts of Southern Mozambique. PCV2 DNA was detected in 53.8% (62/111) of the samples and 78.3% (23/31) of the farms from all districts. PCV2 antigen was detected by immunohistochemistry in (6/62; 9.7%) lymph nodes that were positive for PCV2 by PCR. The primary histopathological changes observed in these lymph nodes were lymphoid depletion, multifocal nodal necrosis, infiltrate of histiocytes and multinucleated giant cells. One positive sample from each district (total of 9) was selected in order to obtain sequences covering the ORF2 region. Five sequences clustered with PCV2d, of which three sequences from Maputo, Namaacha and Moamba were grouped with PCV2d-2, two sequences from Manhiça and Matola were grouped as

PCV2d-1, and four sequences from Boane, Matutuine, Chibuto, and Xai-Xai were closely related to PCV2b-1A/B genotypes. Our study indicates that a diversity of PCV2 viruses are circulating in the Mozambican swine population and may be adversely affecting pig production.

Key words: Porcine circovirus type 2; Matola City, immunohistochemistry; PCR; pig.

Introduction

Porcine circovirus type 2 (PCV2), a member of the *Circoviridae* family, is a small non-enveloped virus containing a single-stranded circular DNA genome (Allan and Ellis, 2000). The genome of PCV2 contains 1766–1768 nt with at least four open reading frames (ORFs). ORF1 encodes two proteins associated with replication, designated Rep and Rep', ORF2 encodes the capsid protein (Olvera et al., 2007), ORF3 encodes a protein which is thought to play a role in apoptosis (Liu et al., 2005), and ORF4 encodes a newly discovered protein that aids in the suppression of caspase activity and in the regulation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (He et al., 2013). PCV2 is subdivided into four genotypes: PCV2a, PCV2b, PCV2c, and PCV2d (previously named mPCV2b) (Franzo et al., 2015; Xiao et al., 2015). Since 2000, PCV2b caused several outbreaks in many parts of the world (Allan and Ellis, 2000) and became the most prevalent genotype within domestic pig populations worldwide (Dupont et al., 2008; Chiou et al., 2012; Seo et al., 2014).

PCV2a is subdivided into five clusters (2A-2E) and *PCV2b* into three clusters (1A-1C) (Olvera et al., 2007). PCV2c was identified in pigs with subclinical infection in Denmark (Dupont et al., 2008). Recently, PCV2d has been reported in several countries (Seo et al., 2014; Ramos et al., 2015) and can be further divided into PCV2d-1 and PCV2d-2 (Xiao et al., 2015). In addition, natural inter- and intra-genotype recombinations between PCV2 strains have also been reported (Olvera et al., 2007; Cai et al., 2012).

PCV2 is the primary causative agent of porcine circovirus-associated disease (PCVAD) in pigs (Opriessnig et al., 2007). This includes several syndromes, such as postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine respiratory disease complex, porcine dermatitis and nephropathy syndrome, reproductive disease, and enteritis (Segalés et al., 2005; Opriessnig et al., 2007; Kekarainen and Segalés, 2015). PMWS is the most common and economically important clinical syndrome associated

with PCV2 infection and affects pigs between 25 and 120 days *of* age, with the greatest number of cases occurring between 60 and 80 days of age (Chae, 2004). Diagnosis of PCVAD is based on clinical signs, presence of histopathological lesions, and detection of PCV2 antigens or DNA within characteristic lesions (Rosell et al., 1999; Chae, 2004; Segalés, 2012). Both in subclinical and in clinical PCVAD, PCV2 antigens and nucleic acids are primarily detected in lymphoid tissues (Rosell et al., 1999; Hansen et al., 2010).

PCV2 has been widely documented in the pig population of several countries in Europe (Dupont et al., 2008; Hansen et al., 2010; Eddicks et al., 2015), South America (Oliveira-Filho et al., 2009; Ramos et al., 2015), Asia (Guo et al., 2010; Jantafong et al., 2011; Chiou et al., 2012; Seo et al., 2014), and in the United States (Cheung et al., 2007; Opriessnig et al., 2013); there is currently little information concerning the occurrence of PCV2 in Africa as data is limited to South Africa (Drew et al., 2004) and Uganda (Ojok et al., 2013). PCV2 has not yet been studied in the swine population in Mozambique; thus, our aim was to detect the occurrence of PCVAD microscopic lesions as well as PCV2 antigens and DNA in mesenteric lymph nodes from abattoir-slaughter pigs from Mozambique. In addition, we characterized phylogenetically the PCV2 strains circulating in pigs from Mozambique.

Methods

Samples

The study was conducted from December 2014 to February 2015 (1st period) and December 2015 to February 2016 (2nd period), in a slaughterhouse in Matola City, Maputo Province, Mozambique (25° 55' 26" S, 32° 27' 57" E). This slaughterhouse was selected because it is the largest pig abattoir in Southern Mozambique and receives animals from different districts in the region.

A total of 111 mesenteric lymph nodes were randomly collected from slaughtered pigs. To avoid cross-contamination between herds, pigs from the same owner and the same district were slaughtered in sequence. The knives and gloves used for sampling were changed and decontaminated between sampling different pigs. Duplicate samples from each mesenteric lymph node were collected from each pig. One fragment from each sample was stored at -4°C until DNA extraction and the other

fragment was fixed in 10% buffered formalin for 24-48h for routine histological procedures. The origin (district and owner or farm) of the slaughtered pigs provided by the slaughterhouse was recorded. We also recorded the pigs live weight, but the age of pigs was not available.

DNA extraction

Total DNA was extracted from 40 to 50 g tissue homogenate using a commercial kit (Qiagen QIAamp DNA Mini Kit, USA) according to the manufacturer's recommendations. To avoid cross contamination samples were processed individually. DNA was eluted in 200 μ L elution buffer, quantified using a NanoDrop™ Spectrophotometer 2000c and stored at -20°C.

PCV2 DNA detection

Total DNA from mesenteric lymph nodes was used in PCR with pairs of primers previously described (Larochelle et al., 1999). PCR mix conditions were the following: 2.5 μ L of 10 \times buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 200 mM of dNTPs, 10 pmol of each primer, 1 U DNA polymerase enzyme (Ludwig Biotecnologia, Brazil), 1 μ L of DNA sample, and water up to 25 μ L. PCR was performed with an initial cycle of 95°C for 2 min, 35 cycles at 95°C for 30 s, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min, which amplified a 250 base pair product (bp). The PCR products were electrophoresed in agarose gel using 1 μ L of Blue Green dye, according to the manufacturer's protocol (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil).

Histopathology

Mesenteric lymph node samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated, embedded in paraffin wax, and sectioned at 3-5 μ m. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). Only the samples that were found to be PCV2 positive by PCR were examined under an optical microscope and subsequently analyzed with immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHQ) was performed in all mesenteric lymph node samples that were PCV2 positive by PCR. Antigen retrieval was obtained with 0.5% XIV protease (Sigma Chemical Company, Poole, UK) at room temperature for 15 min. Endogenous

peroxidase activity in tissue sections was inhibited by incubation in 10% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 15 minutes; nonspecific reactions were blocked with 5% skim milk for 15 minutes. Sections were incubated with an anti-PCV2 polyclonal antibody (Iowa State University, USA) at 1:1000 dilution overnight at room temperature. Signal was amplified and visualized using MACH 4 Universal HRP Polymer Detection (Biocare Medical, Concord, CA) and the chromogen 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA), respectively. The sections were counterstained with Harris's hematoxylin for 30 seconds. As positive control, a PCV2 positive pig intestine sample was used (Zlotowski et al., 2008). Negative controls were established by omission of primary antibody. Immunostaining intensity was classified as mild (+), moderate (++) and severe (+++) according to the number of PCV2 positive cells (Haruna et al., 2006).

Viral sequences and phylogenetic analysis

One positive sample from each district (total of 9) was selected in order to obtain sequences covering the ORF2 region, using primers and PCR conditions previously described (Dezen et al., 2010). The amplification products (30-45 ng) were purified with a NucleoSpin® II kit, (Macherey-Nagel, Germany), labeled with 3.2 pmol of each primer and 2 µL of BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, USA) using an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer automatic sequencer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems, USA). The sequences were edited using BioEdit Software version 7.0. The alignment was performed using Clustal W, Mega Software 5.0. The dataset comprised the nine sequences from our study that represented the nine different districts of Mozambique as well as representative PCV2 sequences retrieved from Genbank (Accession numbers are available in the phylogenetic tree). The phylogenetic analysis was performed based on amino acid sequences using the neighbor joining method-p-distance (Nei and Kumar et al., 2000) with 1000 bootstrap, using Mega Software 5.0 (Tamura et al., 2011).

Results

Animals

A total of 457 pigs were slaughtered (average of 22.2 pigs/day) with a body weight ranging from 5 to 120 Kg (mean 64.3 Kg). The sampled pigs included exotic breeds (mainly Large White and Landrace), an indigenous breed (black pigs) and mixed breeds from nine districts of Southern Mozambique, namely: Matola, Matutuíne, Namaacha, Boane, Moamba, Manhiça (Maputo Province), Xai-Xai and Chibuto (Gaza Province), and Maputo (Maputo City) (Fig. 1). Clinical signs were not evaluated and gross lesions on mesenteric lymph nodes were not detected.

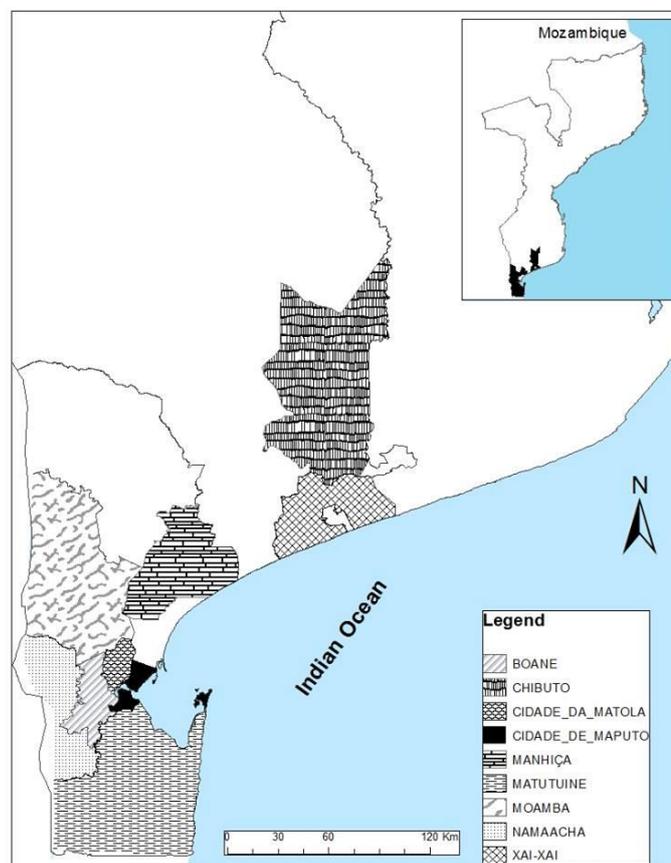


Fig. 1. Map of Mozambique demonstrating the nine districts of origin of the pigs sampled.

PCV2 DNA detection

PCV2 DNA was detected in 53.8% (62/111) of the samples and 78.3% (21/31) of the farms from all nine districts. The number and percentage of farms and pigs found to be PCV2 positive by PCR from each district are shown in Table 1.

Table 1. Number and percentage of PCV2 positive farms and pigs from each Mozambique district.

District	Number		Positive farms		Positive pigs	
	Farms	Pigs	Number	%	Number	%
Maputo	2	4	2	100.0	4	100.0
Matola	6	14	5	83.3	12	85.7
Matutuine	3	22	2	66.7	14	63.6
Namaacha	4	26	4	100.0	17	65.4
Boane	7	17	5	71.4	7	41.2
Moamba	4	9	2	50.0	2	22.2
Manhiça	1	4	1	100.0	1	25.0
Xai-Xai	1	2	1	100.0	1	50.0
Chibuto	3	13	1	33.3	4	30.8
Total	31	111	23	78.3	62	53.8

Histopathology

Histopathological lesions were present in 64.5% (40/62) of the samples that were PCV2 positive for PCR. The main lesions observed were eosinophils infiltration (17/62), lymphoid depletion (16/62), histiocyte infiltration (9/62), lymphoid hyperplasia (9/62), multinucleated giant cells (4/62), and necrotic areas (1/62). The lymphoid depletion, histiocytes infiltration and multinucleated giant cells were frequently observed in the center of the lymphoid follicles (Fig. 2A). One sample with severe microscopic lesions exhibited multifocal to coalescing areas of necrosis associated with areas of diffuse histiocyte infiltration and multifocal areas of giant cell infiltrate (Fig. 2B).

Immunohistochemistry

PCV2 antigens were detected in 6/62 (9.7%) of the samples that were positive by PCR. The immunostaining was mild in 3/6 samples, moderate in 2/6, and severe in 1/6. Positive staining was seen within the cytoplasm of histiocytes and multinucleated giant

cells located primarily in the depleted lymphoid follicles (Fig. 2C and Fig. 2D). PCV2 antigens were detected in all lymph nodes that exhibited multinucleated giant cell infiltrate (4/6).

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed using one sequence from each different district. The sequences from our study covered 213 amino acids of the capsid region (ORF2). The phylogenetic tree construction demonstrated that five sequences from Mozambique clustered with PCV2d, but three sequences were grouped in the PCV2d-2 clade (KY292281, KY292285 and KY292284) from the Maputo, Namaacha, and Moamba districts, respectively. In addition, two sequences were grouped in the PCV2d-1 clade (KY292280 and KY292282) from the Manhiça and Matola districts, respectively. The other four sequences (KY292283, KY292278, KY292279 and KY292286) were from Matutuine, Boane, Chibuto and Xai-Xai districts, grouped with PCV2b-1A/B sequences (Fig. 3).

Discussion

This work is the first to report the detection of PCV2 in the pig population in Mozambique. PCV2 was detected in 78.3% of farms from nine districts of Southern Mozambique, suggesting that the virus is widely distributed throughout the swine population in this country. Serological studies have shown that PCV2 is distributed in swine populations worldwide (Segalés et al., 2005; Kekarainen and Segalés, 2015); however, to date, there are few studies describing the occurrence of PCV2 and its associated diseases in African countries (Drew et al., 2004; Ojok et al., 2013).

Subclinical infection, in which the virus can be detected in clinically healthy slaughtered pigs, is the most common form of PCV2 infection (Segalés, 2012). In Brazil and Denmark, PCV2 was detected in 58.21% (Oliveira-Filho et al., 2009) and 97% (Hansen et al., 2010) of slaughtered pigs, respectively. The Mozambican swine production system is not as technologically developed as it is in other major swine producer countries, such as China, the United States and Brazil. In Mozambique, pig production is primarily practiced by smallholders (<50 pigs) (National Statistic Institute, 2011) under extensive or semi-intensive production systems, yet we found an important prevalence and diversity of PCV2. Epidemiological studies have shown that the size of

the farm is associated with an increased risk of transmission of infectious agents; herds with higher pig density per area have an increased risk of transmission of pathogens (Gardner et al., 2002). The pig production system in Mozambique has an inadequate management and poor feeding regimens leading to reduced growth and high mortality rates. PCV2 is a pathogen known to contribute to poor weight gain and immunosuppression that can lead to secondary infections, which exacerbates the pathology with increased mortality rates in swine herds (Kekarainen and Segalés, 2015). Our study showed that the virus is circulating and may cause a significant economic impact in the pig production from Mozambique. More studies are needed to address the association of PCV2 or PCVAD with retarded growth rate in piglets as well as other conditions normally associated with poor feeding and management.

Histological lesions observed in mesenteric lymph nodes that were positive for PCV2 in the IHQ were consistent with those previously described (Rosell et al., 1999; Kim and Chae, 2005; Haruna et al., 2006; Hansen et al., 2010). The diffuse PCV2 antigen immunostaining in one lymph node with a predominantly necrotic lesion has been described in cases of necrotizing lymphadenitis associated with PCV2 infection (Kim and Chae, 2005). The mild or absent histological lesions and low levels of PCV2 antigens detected by immunostaining observed in this study are consistent with subclinical infection with PCV2 (Segalés, 2012). On the other hand, marked lymphoid depletion and granulomatous infiltrate associated with moderate to severe immunostaining was observed in three samples, indicating that clinical PCVAD may occur in the pig population in Mozambique as well. However, the eosinophils infiltrate and lymphoid hyperplasia detected in this study may be associated with infection with other pathogens rather than PCV2.

In our study, we found that sequences from four different districts clustered in PCV2b-1A/B clades with sequences from the Netherlands, China, France, and Brazil (Fig. 3). PCV2b 1A/B has also been previously identified in Thailand (Jantafong et al., 2011) and Uruguay (Ramos et al., 2013). In China, the PCV2b-1A/B clade was reported as the major subtype from 2001 to 2009 (Li et al., 2010).

A global molecular genetic analysis of PCV2 sequences demonstrated an increased emergence of the PCV2d genotype in swine worldwide (Xiao et al., 2015). Recently, the PCV2d genotype, previously referred to as mPCV2b, has been identified in domestic pigs in China (Guo et al., 2010), the United States (Opriessnig et al., 2013), South Korea (Seo et al., 2014), Uruguay (Ramos et al., 2015), Brazil (Salgado et al.,

2014) and Germany (Eddicks et al., 2015). In some countries, it was first isolated from cases of suspected PCV2 vaccine failures (Opriessnig et al., 2013; Seo et al., 2014; Salgado et al., 2014). In our study, the PCV2d sequences were found separated in two branches of PCV2d-1 and 2d-2 clades. PCV2d-1 sequences mostly indicated a close relationship with sequences from China where PCV2d was found to be an emerging and predominant PCV2 subtype (Cai et al., 2012), while PCV2d-2 grouped with sequences from different countries and even from different continents. Our results corroborate the increased presence of PCV2d worldwide, as suggested previously (Xiao et al., 2015); this is probably a global genotype shift of PCV2b, as occurred with PCV2a to PCV2b more than ten years ago (Patterson and Opriessnig, 2010).

Since the PCV2 genotypes detected in this study have been also detected in many countries in Asia, Europe and South America, it can be hypothesized that this closely phylogenetic relationship of viruses resulted from swine trade between countries. The pig population in Mozambique includes European exotic breeds such as Large White and Landrace (Giuffra et al., 2000). In our study, a PCV2 positive farm from Namaacha imports pigs from South Africa, which previously reported PMWS in the early 2000's caused by an outbreak of PCV2a that was introduced in South Africa via pig semen imported from USA (Drew et al., 2004). More recently, an European-like PCV2b was detected in the lymph nodes of slaughtered pigs in Uganda (Ojok et al., 2013), but the sequences were not available in Genbank to be evaluated.

Our study demonstrates that PCV2b-1A/B and PCV2d genotypes are circulating in the analyzed herds from Mozambique and confirms the emergence of PCV2d in pigs, as found recently in other countries. Our results are preliminary; therefore, studies with a higher and more representative number of sequenced samples are necessary to estimate the true prevalence of PCV2 genotypes of various Mozambican pig populations. In conclusion, our study highlights the importance of future epidemiological studies in order to assess and diminish the impact of the infection in the Mozambican swine industry.

Acknowledgements

The first author's Phd scholarship was co-funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil and The World Academy of Science (TWAS): CNPq-TWAS Fellowships Programme-2012. The authors greatly thank the abattoir staff for their support during sampling. We also thank the staff of the Division of Pathology, Veterinary Faculty, Eduardo Mondlane University for their work on the preparation of histological samples.

References

- Allan, G. M., and J. A. Ellis, 2000: Porcine circovirus: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3-14.
- Cai, L., J. Ni, Y. Xia, Z. Zi, K. Ning, P. Qiu, X. Li, B. Wang, Q. Liu, D. Hu, X. Yu, Z. Zhou, X. Zhai, X. Han, and K. Tian, 2012: Identification of an emerging recombinant cluster in porcine circovirus type 2. *Virus Res.* 165, 95–102.
- Chae, C., 2004: Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168, 41-49.
- Cheung, A. K., K. M. Lager, O. I. Kohutyuk, A. L. Vincent, S. C. Henry, R. B. Baker, R. R. Rowland, and A. G. Dunham, 2007: Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* 152, 1035–1044.
- Chiou, M. T., C. N. Lin, C. Y. Yang, G. S. Su, C. F. Lin, and T. C. Chang, 2012: Genotypic change and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 in taiwanese pig herds. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 1303–1310.
- Dezen, D., F. A. M. Rijsewijk, T. F. Teixeira, C. L. Holz, S. P. Cibulski, A. C. Franco, O. A. Dellagostin, and P. M. Roehe, 2010: Multiply-primed rolling-circle amplification (MPRCA) of PCV2 genomes: applications on detection, sequencing and virus isolation. *Res. Vet. Sci.* 88, 436–440.
- Drew, T.W., S. S. Grierson, D. P. King, D. Hicks, S. Done, J. A. Naser, D. P. B. Evans, P. Grimbeek, and M. Banks, 2004: Genetic similarities between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates. *Vet. Rec.* 155, 149-151.
- Dupont, K., E. O. Nielsen, P. Bakbo, P. Bækbo, and L. E. Larsen, 2008: Genetic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128, 56-64.
- Eddicks, M., R. Fux, F. Szikora, L. Eddicks, M. Majzoub-Altweck, W. Hermanns, G. Sutter, A. Palzer, E. Banholzer, and M. Ritzmann, 2015: Detection of a new cluster

- of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany. *Vet. Microbiol.* 176, 337–343.
- Felsenstein, J., 1985: Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Franzo, G., M. Cortey, A. Olvera, D. Novosel, A. M. M. G. De Castro, P. Biagini, J. Segalés, and M. Drigo, 2015: Revisiting the taxonomical classification of porcine circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. *Virol. J.* 12, 1-8.
- Gardner, I. A., P. Willeberg, and Mousing, J. 2002: Empirical and theoretical evidence for herd size as risk factor for swine diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 3, 43–55.
- Giuffra, E., J. M. H. Kijas, V. Amarger, O. Carlborg, J. T. Jeon, and L. Andersso, 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154, 1785–1791.
- Guo, L. J., Y. H. Lu, Y. W. Wei, L. P. Huang, and C. M. Liu, 2010: Porcine circovirus type 2 (PCV2): Genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol. J.* 7, 272–297.
- Hansen, M. S., S. Pors, V. Bille-Hansen, S. K. J. Kjerulff, and O. L. Nielsen, 2010: Occurrence and tissue distribution of porcine circovirus type 2 identified by immunohistochemistry in Danish finishing pigs at slaughter. *J. Comp. Path.* 142, 109-121.
- Haruna, J., P. Hanna, D. Hurnik, B. Ikede, L. Miller, and C. Yason, 2006: The role of immunostimulation in the development of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs under field conditions. *Can. J. Vet. Res.* 70, 269–276.
- He, J., J. Cao, N. Zhou, Y. Jin, J. Wu, and J. Zhou, 2013. Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. *J. Virol.* 87, 1420–1429.
- Jantafong, T., A. Boonsoongnern, P. Poolperm, K. Urairong, C. Lekcharoensuk, and P. Lekcharoensuk, 2011: Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in piglets from PMWS-affected and -negative farms in Thailand. *Virol. J.* 8, 1-6.
- Kekarainen, T., and J. Segalés, 2015: Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *P. H. M.* 1, 1-6.
- Kim, J., and C. Chae, 2005: Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *Vet. Rec.* 156, 177-178.
- Larochelle, R., M. Antaya, M. Morin, and R. Magar, 1999: Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 80, 69–75.
- Li, W., X. Wang, T. Ma, Z. Feng, Y. Li, and P. Jiang, 2010. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains isolated between 2001 and 2009: genotype PCV2b

- predominate in postweaning multisystemic wasting syndrome occurrences in eastern China. *Virus Genes* 40, 244–251.
- Liu, J., I. Chen, and J. Kwang, 2005. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 79, 8262–8274.
- National Statistic Institute, 2011: Agricultural Census 2009/2010, Mozambique. Available at http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/ess_test_folder/World_Census_Agriculture/Country_info_2010/Reports/Mozambique_2010CAP_VF.pdf (Accessed September 2, 2016).
- Nei M., and S. Kumar, 2000: Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Ojok, L., J. B. Okuni, C. Hohloch, W. Hecht, and M. Reinacher, 2013: Detection and characterisation of porcine circovirus 2 from Ugandan pigs. *Indian J. Vet. Pathol.* 37, 77-80.
- Oliveira Filho, J. F., C. S. Chitarra, D. A. Jesus de Paula, I. Godo, M. C. da Silva, E. M. Colodel, V. Dutra, and L. Nakazato, 2009: Occurrence of porcine circovirus type 2 in slaughtered pigs in state of Mato Grosso. *Acta Sci. Vet.* 37, 363-366.
- Olvera, A., M. Cortey, and J. Segalés, 2007: Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 357, 175–185.
- Opriessnig, T., C. T. Xiao, P. F. Gerber, and P.G. Halbur, 2013: Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet. Microbiol.* 163, 177–183.
- Opriessnig, T., X. J. Meng, and P. G. Halbur, 2007: Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591–615.
- Patterson, A. R., and T. Opriessnig, 2010. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim. Health Res. Rev.* 11, 217–234.
- Ramos, N., S. Mirazo, G. Castro, and J. Arbiza 2015: First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay. *Infect. Genet. Evol.* 33, 320–323.
- Ramos, N., S. Mirazo, G. Castro, and J. Arbiza, 2013: Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination. *Infect. Genet. Evol.* 19, 23–31.
- Rosell, C., J. Segalés, J. Plana-Durán, M. Balasch, G. M. Rodríguez-Arrijoja, S. Kennedy, G. M. Allan, F. McNeilly, K. S. Latimer, and M. Domingo, 1999: Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases

- of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Path. Vol.* 120, 59–78.
- Saitou N., and M. Nei, 1987: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salgado, R. L., P. M. Vidigal, L. F. de Souza, T. S. Onofre, N. F. Gonzaga, M. R. Eller, G. C. Bressan, J. L. Fietto, M. R. Almeida and A. Silva Júnior, 2014: Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak. *Genome Announc.* 2, e00163–e00114.
- Segalés, J., 2012: Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10–19.
- Segalés, J., G. M. Allan, and M. Domingo, 2005: Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 119–142.
- Seo, H. W., C. Park, I. Kang, K. Choi, J. Jeong, S. J. Park, and C. Chae, 2014: Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Arch. Virol.* 159, 3107–3111.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, 2011: MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Xiao, C. T., P. G. Halbur, and T. Opriessnig, 2015: Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J. Gen. Virol.* 96, 1830–1841.
- Zlotowski, P; A. M. R. Corrêa, D. E. S. N. Barcellos, C. E. F Cruz, W. Asanome, A. F. Barry, A. A. Alfieri, and D. Driemeier, 2008: Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Pesq. Vet. Bras.* 28, 313-318.

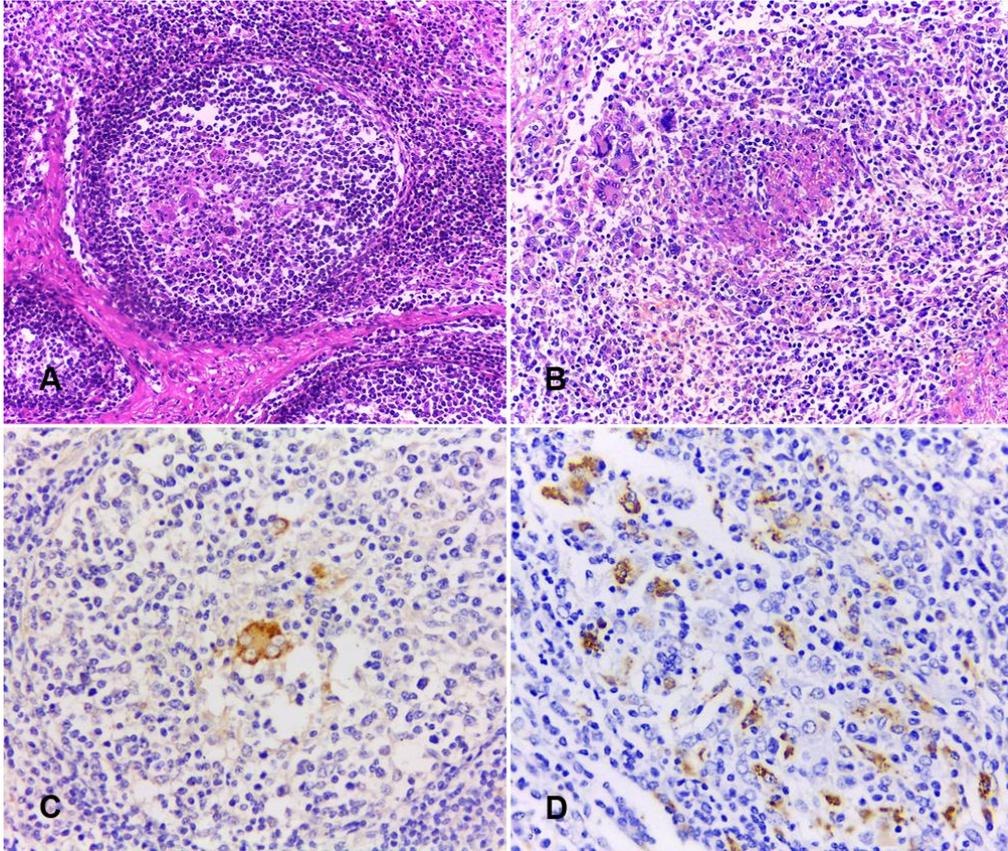


Fig. 2. Histology and anti-PCV2 immunohistochemistry (IHC) of mesenteric lymph nodes from slaughtered pigs. **A.** Depleted lymphoid follicle with histiocytic and multinucleated giant cell infiltrate. HE. 200X. **B.** Lymphoid depletion, multifocal areas of necrosis, and histiocytic and multinucleated giant cell infiltrate. HE. 200X. **C.** Immunostaining for PCV2 in a multinucleated giant cell in the center of a lymphoid follicle. 400X. **D.** Diffuse PCV2 antigens in histiocyte cytoplasm. 400X.

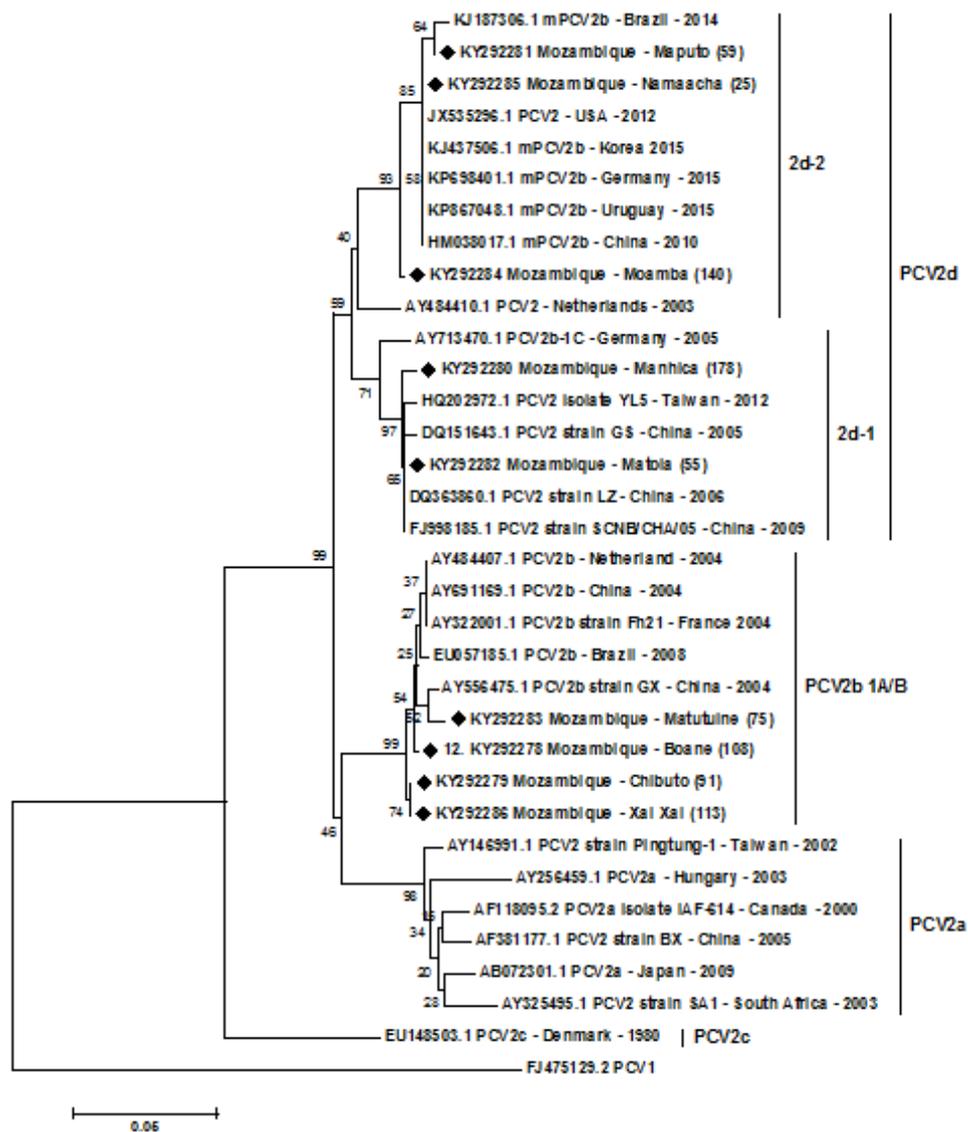


Fig. 3. Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) based on a dataset of 213 amino acid positions of the PCV2 capsid region (ORF2). All 35 sequences are represented by their Genbank accession numbers. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the p-distance method (Nei and Kumar, 2000) and are in units representing the number of amino acid differences per site. The analysis involved 33 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. The optimal tree with the sum of branch length = 0,5963 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The nine sequences from this study are marked with a black diamond. Evolutionary analysis was conducted in MEGA5 (Tamura et al., 2011). A PCV1 sequence (FJ475129.2) was used as an outgroup.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusões

1. A frequência de lesões compatíveis com consolidação pulmonar em suínos de abate foi de 8.3%.
2. Antígenos do VIA foram detectados em 84.2 % (32/38) pulmões que apresentaram consolidação pulmonar ao abate e os suínos positivos eram provenientes dos distritos de Matutuine, Namaacha, Moamba, Boane e Cidade da Matola.
3. DNA de PCV2 foi detectado em 53.8% dos suínos avaliados e estes eram dos distritos de Matutuine, Moamba, Namaacha, Boane, Manhiça, Chibuto e das cidades de Maputo, Matola e Xai-Xai. Adicionalmente, foram detectados antígenos de PCV2 associados a lesões histológicas características da infecção por este vírus.
4. Os grupos genotípicos PCV2d-1, PCV2d-2 e PCV2b-1A/B ocorrem na população suína no Sul de Moçambique.

Limitação do trabalho:

1. As amostras de pulmão com consolidação não foram submetidas ao exame bacteriológico, o que impossibilitou identificar prováveis bactérias que podiam estar associadas à infecção pelo VIA, nas lesões pulmonares.

Proposta de ações futuras:

1. Estabelecer parcerias com veterinários de campo, proprietários de granjas comerciais e abatedouros, com vista ao envio de amostras de suínos, para o exame *post-mortem*.
2. Estabelecer parcerias com grupos de pesquisa que se dedicam ao estudo da influenza e circovirose suína.

Proposta de projetos futuros:

1. Pesquisar os subtipos do VIA circulantes em Moçambique.
2. Investigar a ocorrência de outros vírus e bactérias que afetam o trato respiratório de suínos.
3. Pesquisar a ocorrência de casos clínicos associados à infecção por PCV2.
4. Determinar a prevalência de PCV2 nas granjas do setor familiar e em granjas comerciais moçambicanas.

6. REFERÊNCIAS

- ADEOLA, O. A.; OLUGASA, B. O.; EMIKPE, B. O. Detection of pandemic strain of influenza virus (A/H1N1/pdm09) in pigs, West Africa: implications and considerations for prevention of future influenza pandemics at the source. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 5, p. 1-7, 2015.
- AIKI-RAJI, C. O. *et al.* Detection of haemagglutination inhibition antibody against human H1N1 strains of influenza A viruses in Swine in Ibadan, Nigeria. **African Journal of Clinical and Experimental Microbiology**, v.5, p. 278–279, 2004.
- ALARCON, P. *et al.* Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, n. 3-4, p. 182–191, 2011.
- ALARCON, P.; RUSHTON, J.; WIELAND, B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 110, n. 2, p. 88-102, 2013.
- ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p. 3–14, 2000.
- BARÓ, J.; SEGALÉS J.; MARTÍNEZ, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: An independent condition or part of the systemic disease. **Veterinary Microbiology**, v. 176, n. 1-2, p. 83-87, 2015.
- BRENTANO, L. *et al.* Levantamento Soro epidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. *In*: COMUNICADO TÉCNICO, 306. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, p. 1-6, 2002.
- BROWN, I. H. *et al.* Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 553-562, 1997.
- BROWN, I. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 29-46, 2000.
- BRUNBORG, I. M.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C.M. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. **Journal of Virology Methods**, v. 122, n. 2, p. 171-178, 2004.
- CALSAMIGLIA, M. *et al.* Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1848–1850, 2002.

- CALSAMIGLIA, M. *et al.* Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Research in Veterinary Science**, v.82, p.299-304, 2007.
- CAPPUCCIO, J. A. *et al.* Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 2871–2878, 2011.
- CASWELL, L. C.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. *In*: MAXIE M. G. **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6th ed., v. 2, Saint Louis: Elsevier, 2016, p. 465-591.
- CHAE, C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application. **The Veterinary Journal**, v. 194, p. 151–157, 2012.
- CHEUNG, A. K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. **Virology**, v.313, n.2, p. 452- 459, 2003.
- CHIEK, E. *et al.* Adverse effects of Influenza (H1N1)pdm09 virus infection on growth performance of Norwegian pigs - a longitudinal study at a boar testing station. **BMC Veterinary Research**, v. 10, n. 284, p. 1-14, 2014.
- CHOI, Y. K. *et al.* Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. **Journal of Virological Methods**, v. 102, n. 1-2, p. 53-59. 2002.
- CHOI, Y. K.; GOYAL, S. M.; JOO, H. S. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pig. **Canadian Veterinary Journal**, v, 44, p. 735-737, 2003.
- CORRÊA, A. M. R. *et al.* Brain lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 1, p. 109-112, 2007.
- CORRÊA, A. M. R. *et al.* Clinical and pathological aspects of swine circovirus in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 9-13, 2006.
- CSAGOLA, A. *et al.* Genetic characterization of type 2 porcine circovirus detected in Hungarian wild boar. **Archives of Virology**, v. 151, n. 3, p. 495-507, 2006.
- DARWICH, L.; MATEU, E. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, v. 164, n. 1-2, p. 61–67, 2012.
- DETMER, S. *et al.* Diagnostics and Surveillance for Swine Influenza. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 85-112, 2012.

DREW, T. W. *et al.* Genetic similarities between porcine circovirus type 2 isolated from the first reported case of PMWS in South Africa and North American isolates.

Veterinary Record, v. 155, p. 149-151, 2004.

DROLET, R. *et al.* Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): An overview of the disease. **Swine Health Production**, v. 7, n. 6, p. 283–285, 1999.

DUCATEZ, M. F. *et al.* Multiple reassortment between pandemic (H1N1) 2009 and endemic influenza viruses in pigs, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1624-1629, 2011.

DUCATEZ, M. F.; AWOUME, F.; WEBBY, R. J. Influenza A(H1N1)pdm09 virus in pigs, Togo, 2013. **Veterinary Microbiology**, v. 177, p. 201–205, 2015.

DUPONT, K. *et al.* Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 6-64. 2008.

DVORAK, C. M. *et al.* Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. **Veterinary Microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 365–374, 2013.

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

FAO. Good practices for biosecurity in the pig sector: Issues and options in developing and transition countries. FAO Animal Production and Health Paper no.169, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organization for Animal Health/World Bank, Rome, 2010.

FENAUX, M. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 Porcine Circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 13440–13446, 2004.

FLORES, E. F. *et al.* *Orthomixoviridae*. In. Flores E. F. In. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 721-772,

FORT, M. *et al.* Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v.125, n. 3-4, p.244-255, 2007.

FORT, M. *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. **Vaccine**, v. 26, p. 1063-1071, 2008.

GALINDO-CARDIEL, I. *et al.* Characterization of Necrotizing Lymphadenitis Associated with Porcine Circovirus Type 2 Infection. **Journal of Comparative Pathology**, v.144, n. 1, p. 63-69, 2011.

GAVA, D. *et al.* Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 70-76. 2008.

GILLESPIE, J. *et al.* Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1151-1163, 2009.

GRAU-ROMA, L. *et al.* A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 23–35, 2008.

HA, Y.; JUNG, K.; CHAE, C. Lack of evidence of porcine circovirus type 1 and type 2 infection in piglets with congenital tremors in Korea. **Veterinary Record**, v. 156, n.12, p. 383-384, 2005.

HAMPSON, A. W. Influenza virus antigens and ‘antigenic drift’. *In*: POTTER, C. W. **Influenza**. London: Elsevier, p. 49-85, 2002.

HAN, J. Y. *et al.* Identification of reassortant pandemic H1N1 influenza virus in Korean pigs. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 699–707, 2012.

HANSEN, M. S. *et al.* Occurrence and tissue distribution of Porcine Circovirus Type 2 identified by immunohistochemistry in Danish finishing pigs at slaughter. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2-3, p.109-121, 2010b.

HANSEN, M. S. *et al.* An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, v. 2-3, p. 120-131, 2010a.

HE, J. *et al.* Identification and functional analysis of the novel ORF4 protein encoded by porcine circovirus type 2. **Journal of Virology**, v. 87, n. 3, p. 1420–1429, 2013.

HEROLD, S. *et al.* Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 1, p. 75–82, 2012.

HOWDEN, K. J. *et al.* An investigation into human pandemic influenza virus (H1N1) 2009 on an Alberta swine farm. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 11, p. 1153-1161, 2009.

IMAI, D. M. *et al.* Renal tubular necrosis and interstitial hemorrhage (“turkey-egg kidney”) in a circovirus infected Yorkshire cross pig. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n.5, p. 496–499, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). **Anuário Estatístico**. Moçambique, p. 54, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). Censo Agro-Pecuário 1999-2000, Apresentação sumária dos resultados, quadros e gráficos – Moçambique. 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA (INE). Censo Agro-pecuário 2009-2010: resultados preliminares - Moçambique. Moçambique. 2011.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). <http://www.ictvonline.org/>. Consultado: 12, novembro, 2016.

JANKE, B. H. Influenza A Virus Infections in Swine: Pathogenesis and Diagnosis. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 410-426, 2014.

JUHAN, N. M. *et al.* The open reading frame 3 (ORF3) of porcine circovirus type2 (PCV2) is dispensable for virus infection but evidence of reduced pathogenicity is limited in pigs infected by an ORF3-null PCV2 mutant. **Virus Research**, v, 147, n. 1, p. 60–66, 2010.

JUNG, K.; HA, Y; CHAE, C. Pathogenesis of Swine Influenza Virus Subtype H1N2 Infection in Pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, p. 179–184. 2005.

KARASIN, A. I., *et al.* Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4349–4354. 2004.

KENNEDY, S. *et al.* Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 1, p. 9-24, 2000.

KIM J.; CHAE C. A. Comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, n. 1, p. 45–50, 2004.

KIM, J.; CHAE, C. Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. **Veterinary Record**, v. 156, n. 6, p. 177-178. 2005.

KIM, J.; CHUNG, H. K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **The Veterinary Journal**, v. 166, n. 3, p. 251–256. 2003.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record**, v. 155, n. 16, p. 489–492. 2004.

KING, A. M. Q. *et al.* Virus Taxonomy: **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 1327, San Diego: Elsevier Academic Press, 2011.

- KITIKOON, P. *et al.* The immune response and maternal antibody interference to a heterologous H1N1 swine influenza virus infection following vaccination. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 117-128, 2006.
- KLUMPP, K.; RUIGROK, R. W.; BAUDIN, F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. **EMBO Journal**, v. 16, n. 6, p. 248–1257, 1997.
- KNIPE, D. *et al.* **Fields Virology**, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 3177p.
- KONG, W. Epidemic Status of Swine Influenza Virus in China. **Indian Journal Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 3-11, 2014.
- KRISTENSEN, C. S.; BAADSGAARD, N. P.; TOFT, N. A meta-analysis comparing the effect of PCV2 vaccines on average daily weight gain and mortality rate in pigs from weaning to slaughter. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 98, p. 250-258. 2011.
- KYRIAKIS, C. S. *et al.* Virological surveillance and preliminary antigenic characterization of influenza viruses in pigs in five European countries from 2006 to 2008. **Zoonoses Public Health**, v. 58, n. 2, p. 93–101, 2011.
- KYRIAKIS, S. C. *et al.* The effects of immune-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n.1, p. 38-46, 2002.
- LA GRUTA, N. L. *et al.* A question of self-preservation: Immunopathology in influenza virus infection. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p.85-92, 2007.
- LEE, J. H.; GRAMER, M. R.; JOO, H. S. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 3, p. 207–212, 2007.
- LI, K. S. *et al.* Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. **Nature**, v. 430, p. 209–213, 2004.
- LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8262–8274, 2005.
- LYOO, K. S. *et al.* Comparative pathology of pigs infected with Korean H1N1, H1N2, or H3N2 swine influenza A viruses. **Virology Journal**, v. 11, n. 170, p. 1-6, 2014.
- MA, W. *et al.* Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n. 52, p. 20949–20954, 2007.
- MACHEL, G.; MASSINGUE, J. A evolução do setor da pecuária em Moçambique (2002 – 2012). **Seminário sobre estudos temáticos do TIA**. Moçambique. 2013.

- MANKERTZ, A. *et al.* Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons. **Archives of Virology**, v. 145, p. 2469–2479, 2000.
- MATOS, C. *et al.* A pilot study of common health problems in smallholder pigs in Angónia and Boane districts, Mozambique. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 82, n. 3, p. 166–169, 2011.
- MEERTS, P. *et al.* Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus-replication. **Viral Immunology**, v. 18, n. 2, p. 333-341. 2005.
- MENG, X. J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 43–64, 2013.
- MERIALDI, G. *et al.* Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. **The Veterinary Journal**, v. 193, n. 1, p. 234–239, 2012.
- MESEKO C. *et al.* Swine Influenza in Sub-Saharan Africa – Current Knowledge and Emerging Insights. **Zoonoses Public Health**, v. 61, n. 4, p. 229-237, 2013.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (MINAG). **Plano estratégico para o desenvolvimento do setor agrário (PEDSA) 2011-2020**. República de Moçambique. 2010.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E SEGURANÇA ALIMENTAR (MASA). **Anuário de Estatísticas Agrárias 2012-2014**, Moçambique. 2015.
- MONROY, M. A. R. *et al.* Detection and molecular characterization of porcine circovirus type 2 from piglets with porcine circovirus associated diseases in Colombia. **Virology Journal**, v. 11, n. 143, p. 1-11, 2014.
- MORÉS, N.; BARCELLOS, D.; ZANELLA J. C. Circovirose suína. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D. **Doenças dos Suínos**. 2^a ed, p. 273-287, Cânone editorial. Brasil, 2012.
- MYERS, K. P. *et al.* Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus? **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p. 14-20, 2006.
- MYERS, K. P.; OLSEN, C. W.; GRAY, G. Cases of swine in humans: a review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 8, p. 1084-1088, 2007.
- NJABO, K. Y. *et al.* Pandemic A/H1N1/2009 influenza virus in swine, Cameroon, 2010. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 189–192, 2012.
- NUNEZ, A. *et al.* Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health B**, v. 50, n. 5, p. 255–258. 2003.

OFFLU OIE/FAO Network of expertise on animal influenza. <http://www.offlu.net>. Consultado: 20, outubro, 2016.

OJOK, L. *et al.* Detection and characterization of porcine circovirus 2 from Ugandan pigs. **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 37, n. 1, p. 77-80, 2013.

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

OPRIESSNIG, T. *et al.* Polymicrobial respiratory disease in pigs. **Animal Health Research Reviews**, v.12, n. 2, p. 133-148, 2011.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination. **Vaccine**, v. 27, p. 1002-1007, 2009c.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 5, 1582-1590, 2009b.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 5, p. 521–529, 2003.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 1-2, p. 177–183, 2013.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Evidence of breed-dependent differences in susceptibility to porcine circovirus type-2-associated disease and lesions. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 3, p. 281–293, 2006.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 2-3, p. 261-270, 2011.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 6, p. 624–640, 2004.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 2, p. 397–401, 2008.

OPRIESSNIG, T. *et al.* Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naïve pigs by oral consumption. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 54–64, 2009a.

- OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P. G. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. **Virus Research**, v. 164, p. 20–32, 2012.
- 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**. v. 19, n. 6, p. 591-615, 2007.
- PATTERSON, R. *et al.* Exposure to environmental stressors result in increased viral load and further reduction of production parameters in pigs experimentally infected with PCV2b. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 3-4, p. 261–269, 2015.
- PEJSAK, Z. *et al.* Reproduction disorders connected with swine influenza outbreak in a farm. **Veterinary Medicine Science and Practice**, v. 61, n. 10, p. 1154-1159, 2005.
- PENRITH, M. L. *et al.* African swine fever in Mozambique: review, risk factors and considerations for control. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 74, p.149–160, 2007.
- PEREDA, A. *et al.* Pandemic (H1N1) 2009 outbreak on a pig farm, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n. 2, p.304-307, 2010.
- PHENGSAVANH, P. *et al.* Smallholder pig rearing systems in Northern Lao PDR. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, p. 867–874, 2011.
- PITTMAN, J. S. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, n. 3, p. 144–148, 2008.
- PLESCHKA, S. Overview of Influenza Viruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 370, p. 1–20, 2013.
- PONDJA, A. *et al.* Prevalence and risk factors of porcine cysticercosis in Angónia District, Mozambique. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, e594, p. 1-4, 2010.
- RAJÃO, D. R; *et al.* Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 30-36, 2013b.
- RAJÃO, D. R; *et al.* Genetic characterization of influenza virus circulating in Brazilian pigs during 2009 and 2010 reveals a high prevalence of the pandemic H1N1 subtype. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v.7, n. 5, p. 783-790, 2013a.
- REID, A. H. *et al.* Origin and evolution of the 1918 'Spanish' influenza virus hemagglutinin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, n. 45, p. 1651-1656. 1999.
- ROMAGOSA, A. *et al.* Vaccination of influenza A virus decreases transmission rates in pigs. **Veterinary Research**, v. 42, n. 120, p. 1-15, 2011.

- ROSE, N. *et al.* Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Virus Research**, v. 164, p. 78–89, 2012.
- ROSELL, C. *et al.* Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, n. 1, p. 59–78. 1999.
- SARLI, G. Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 51, p. 1-9, 2012.
- SCHAEFER, R. *et al.* Detection of a horse derived H3N8 influenza virus in pigs in Brazil. In: **Proceedings, international symposium on emerging and re-emerging pig diseases**, Barcelona, p.247, 2011b (Resumo).
- SCHAEFER, R. *et al.* Isolation and characterization of a pandemic H1N1 influenza virus in pigs in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 761-767, 2011a.
- SCHAEFER, R. *et al.* Orientações para o diagnóstico de influenza em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 61-73, 2013.
- SCHLAFER, D. H.; FOSTER, R. A. Female Genital System. In: Maxie M. G. (ed). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 6th ed., v. 3, Saint Louis: Elsevier, 2016, p. 358 – 464.
- SEGALÉS, J. *et al.* Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. **Veterinary Record**, v. 142, n. 18, p. 483–486, 1998.
- SEGALÉS, J. *et al.* Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 223-229. 2005.
- SEGALÉS, J. Overview of Porcine Circovirus Diseases (Postweaning multisystemic wasting syndrome, porcine dermatitis and nephropathy syndrome). 2016. Disponível em <<http://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/porcine-circovirus-diseases/overview-of-porcine-circovirus-diseases>>. Consultado: 10 nov 2016.
- SEGALÉS, J. Porcine circovirus (pcv2). Risk and/or triggering factors of porcine circovirus. 2009. Disponível: https://www.pig333.com/circovirosis/risk-and-or-triggering-factors-of-porcine-circovirus_1207/. Consultado: 12, agosto, 2016.
- SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v. 164, p. 10-19, 2012.
- SEGALÉS, J.; ALLAN, G.; DOMINGO, M. Porcine circoviruses. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.; RAMIREZ, H.; SCHWARTZ, K.J. & STEVENSON, G.W. (eds). **Diseases of Swine**, 10th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012, p. 405–417

- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 3, p. 109–124, 2002.
- SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 137–149. 2004.
- SEO, H. W. *et al.* Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2-viremic piglets after experimental PCV2 challenge. **Veterinary Research**, v. 45, n.1, p. 1-9, 2014.
- SEO, H. W. *et al.* Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. **Archives of Virology**, v. 159, n. 11, p. 3107–3111, 2014.
- SOBESTIANSKY, J. *et al.* Monitoramento de abate. *In*: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (eds.). **Doenças dos suínos**. 2 ed., Goiania: Cânone Editorial, 2012, p. 910-931.
- SONG, M. S. *et al.* Evidence of human-to-swine transmission of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in South Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.9, p. 3204–3211, 2010.
- 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 tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n. 6, p.528-530, 1999.
- SORIA, S. L. Puzzling over the epidemiology of Porcine Circovirus type II. 2014. Tesi doctoral, **Universitat Autònoma de Barcelona**, Barcelona, 2014.
- SORIA, S. L; SEGALÉS, J. Porcine circovirus (PCV2). Updating on the epidemiology of PCV2 and implications, 2012. Disponível em: <https://www.pig333.com/circovirosis/updating-on-the-epidemiology-of-pcv2-and-implications_6619>. Consultado: 23 out. 2016.
- SRETA, D. *et al.* Pathogenesis of swine influenza virus (Thai isolates) in weanling pigs: an experimental trial. **Virology Journal**, v. 6, n. 34, p. 1-11, 2009.
- STEVENSON, G.W. *et al.* Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.57-62, 2001.
- STUDDERT, M. J. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.70, n.4, p.121- 122, 1993.
- TAKEMAE, N. *et al.* Effect of herd size on subclinical infection of swine in Vietnam with influenza A viruses. **BMC Veterinary Research**, v. 2, n. 227, 2016.

TELLIER, R. 2006: Review of aerosol transmission of influenza A virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1657–1662, 2006.

THACKER, E.; JANKE, B. Swine Influenza Virus: Zoonotic Potential and Vaccination Strategies for the Control of Avian and Swine Influenzas. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 19–24. 2008.

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

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralbl Bakteriologie [Orig A]**, v. 226, n. 2, p. 153–167, 1974.

TISCHER, W. *et al.* Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, v. 91, n.3–4, p. 271–276, 1986.

TODD, D. *et al.* Circoviridae. In: FAUQUET, M.A.; MAYO, J.; MANILOFF, U.; DESSELBERGER, L.A. **Ball virus taxonomy, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses**, p. 327–334, San Diego: Elsevier Academic Press, , CA, 2005.

TOMÁS, A. *et al.* A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 260–273, 2008.

TORREMORELL, M. *et al.* Procedures to eliminate H3N2 swine influenza virus from a pig herd. **Veterinary Record**, v. 165, p. 74–77, 2009.

TORREMORELL, M. *et al.* Transmission of influenza A virus in pigs. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 1, p. 68-84, 2012.

TSAI, C. P.; PAN, M. J. New H1N2 and H3N1 influenza viruses in Taiwanese pig herds. **Veterinary Record**, v. 153, n. 13, p. 408, 2003.

ULICH, T. R. *et al.* The intratracheal administration of endotoxin and cytokines. I. Characterization of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA expression and the LPS-, IL-1-, and TNF-induced inflammatory infiltrate. **The American Journal of Pathology**, v. 138, n. 6, p. 1485-1496, 1991.

VALHEIM, M. *et al.* Pathological findings and distribution of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in lungs from naturally infected fattening pigs in Norway. **Influenza Research and Treatment**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

VALLI, V. E. O.; KIUPEL M; BIENZLE, D. 2016. Hematopoietic System. *In*: MAXIE M. G. (ed). **Jubb, Kennedy, and Palmer ´s Pathology of Domestic Animals**. 6th ed., v. 3, p. 102 - 268. Saint Louis: Elsevier, 2016.

VAN ALSTINE, W. G. Respiratory System. *In*: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.; RAMIREZ, H.; SCHWARTZ, K.J. & STEVENSON, G.W. (eds). **Disease of Swine**. 10th ed. Iowa State University Press, Ames, p. 348-362, 2012.

VAN REETH, K. *et al.* Seroprevalence of H1N1, H3N2 and H1N2 influenza viruses in pigs in seven European countries in 2002–2003. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, v. 2, n. 3, p. 99-105, 2008.

VAN REETH, K. V.; BROWN, I. H.; OLSEN, C. W. Influenza Virus. *In*: ZIMMERMAN, J. J.; KARRIKER, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine**, 10th ed., Iowa State University Press, Ames, 2013, p. 557-571.

VINCENT, A. *et al.* Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. **Zoonoses and Public Health**, v. 61, p. 4–17, 2014.

VINCENT, A. L. *et al.* A. Swine Influenza Viruses: A North American Perspective. **Advances in Virus Research**, v. 72, p.127-154, 2008.

WATANABE, T. *et al.* Histopathological and immunohistochemical findings of swine with spontaneous influenza A infection in Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1148-1154.

WEBBY, R. J. *et al.* Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8243-8251, 2000.

WEBSTER, R. G. *et al.* Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiology Reviews**, v. 56, p. 152-179, 1992.

WELSH, M. D. *et al.* Initial incursion of pandemic (H1N1) 2009 influenza A virus into European pigs. **Veterinary Record**, v. 166, p. 642-645, 2010.

XIAO, C-T.; HALBUR, P. G.; OPRIESSNIG, T. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. **Journal of General Virology**, 96, p. 830–1841. 2015.

YOUNG, M. G.; CUNNINGHAM, G. L.; SANFORD, S. E. Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p.175-180, 2011.

YU, S. *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV-2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.115, n. 3-4, p. 261-272, 2007.

ZANELLA, J. C.; BRENTANO, L. Influenza suína. *In*: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D. **Doenças de Suínos**. 2^a ed., Brasil: Cãnone editorial, 2012, p. 355-362.

ZANELLA, J. R. C. *Circoviridae*. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora UFSM, 2007, p. 361-374.

ZHOU, H. *et al.* Pandemic (H1N1) 2009 virus in swine herds, people's Republic of China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1757-1759, 2011.

ZLOTOWSKI, P. *et al.* Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 13-318, 2008.

Anexo 2. Número das amostras de linfonodos mesentéricos e respectiva concentração de DNA.

Nr. Amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	Nr. amostra	Concentração de DNA (ng/µl)	Nr. amostra	Concentração de DNA (ng/µl)
1	63,5	77	32,6	142	392,9
2	57,4	78	417,6	144	655,4
3	68,2	80	59	146	111
4	66,8	81	198,5	150	36,4
5	215,6	83	63,5	151	980,2
6	77	84	259,5	156	1692
9	47,2	87	15,5	158	295,6
11	34,6	88	24,3	160	655,4
12	62,9	89	480,4	162	552,7
13	137,3	90	98,4	165	664,8
15	38	91	51,7	166	698
17	63,3	92	170,9	167	1239,3
18	167,2	93	590	169	539,2
22	17,2	94	60,2	170	795,4
23	78	95	31,7	171	722,4
24	24,6	96	14,9	172	755,8
25	29,7	97	64,2	180	543,1
27	70,9	98	40,3	181	712,6
29	43,6	99	683,3	182	551,1
30	33,2	100	28		
31	77,4	102	164,8		
33	57,9	104	127,4		
34	23,5	108	26,8		
36	17,5	110	34,2		
39	124,9	112	141,7		
43	16,2	113	62,9		
45	107,4	114	157		
46	5705	115	26,7		
47	49,9	116	24,8		
54	28,2	117	57,8		
55	30,7	118	27,6		
56	42,2	120	47,3		
58	67,8	121	52,6		
59	51,2	122	65		
60	51,4	123	38		
61	104,4	129	28,1		
62	209,4	130	24,8		
64	14,6	131	108,1		
65	22,3	133	70,9		
67	29,8	134	354,9		
68	131,8	135	128,6		
69	44,9	136	62		
71	39,6	137	57,8		
72	72,1	138	25,3		
74	78,1	140	33,6		
75	78,8	141	56,9		

Anexo 3. Certificados sanitários



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E SEGURANÇA ALIMENTAR
DIRECÇÃO NACIONAL DE VETERINÁRIA

CERTIFICADO VETERINÁRIO INTERNACIONAL PARA
EXPORTAÇÃO DE PRODUTOS BIOLÓGICOS

INTERNATIONAL VETERINARY CERTIFICATE FOR EXPORTATION OF
BIOLOGICAL PRODUCTS

NÚMERO DO CERTIFICADO (CERTIFICATE NUMBER) : 09AMOS/DEV/2016

País Exportador (Exporting country): **Moçambique (Mozambique)**
Ministério de (Ministry of) : **Ministério da Agricultura e Segurança Alimentar**
(Ministry of Agriculture) - **Direcção Nacional de Veterinária (National**
Directorate of Veterinary) Província ou Distrito (Province or District, etc.):
Maputo

I. IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS (IDENTIFICATION OF THE PRODUCTS)

Tipo de produtos (Type of products): **150 tubos com extrato de ADN de suínos, 45 blocos de parafina com tecidos de suínos e 3 caixas de lâminas histológicas de tecidos de suínos (150 tubes with swine DNA extract, 45 paraffin blocks with swine tissues and 3 histological slides boxes of tissues of pigs)**

Para teste de (Test required) : **INVESTIGAÇÃO (RESEARCH)**

País de destino (Country of destination): **BRASIL (BRAZIL)**

Número de embalagens (number of packaging units): **1**

Master veterinary import permit N^o: **--**

II. ORIGEM DOS PRODUTOS (ORIGIN OF THE PRODUCTS)

Endereço do estabelecimento de origem (Address of the establishment of origin): **UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE – FACULDADE DE VETERINÁRIA –Av. de Moçambique – Maputo, Moçambique – Dr. Cláudio João Maurão Laisse.**

III. DESTINO DOS PRODUTOS (PRODUCTS DESTINATION)

Local de embarque (load port) : Aeroporto Internacional de Maputo – Moçambique (**International Airport – Maputo – Mozambique**)
País e lugar de destino (Country and place of destination): BRASIL(**BRAZIL**)

Meio de transporte (Means of transport) **Aereo (Air)**

Flight N^o: / Airway bill N^o:

Nome e endereço do destinatário (Name and address of consignee): **Sector de Patologia Veterinária Departamento de Patologia Clínica Veterinária - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - BRASIL– TEL (51)3308-6107,FAX(51) 3308-6116,E-mail: setpatvet@ufrgs.br, Att: Prof. David Driemeier**

IV. CERTIFICAÇÃO (CERTIFICATION)

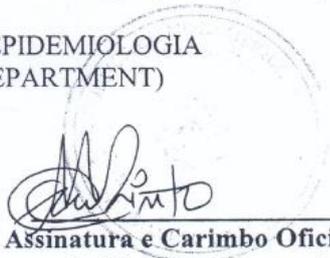
Eu, abaixo assinado, veterinário oficial da **Direcção Nacional de Veterinária do Ministério da Agricultura e Segurança Alimentar**, certifico que os produtos acima descritos, obedecem aos seguintes requisitos (I, the undersigned, official veterinarian of the **National Directorate of Veterinary of the Ministry of Agriculture** hereby certify that the products described above, meet the following requirements):

As amostras vão embaladas em recipientes hermeticamente fechados até ao aeroporto internacional de São Paulo - Guarulho com destino ao aeroporto internacional de Porto Alegre -Salgado Filho e segue para Sector de Patologia Veterinária Departamento de Patologia Clínica Veterinária - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul para investigação (**The samples are packed in leak proof, and are transported through port of entry São Paulo – Guarulho International Airport with final destination Porto Alegre -Salgado Filho International Airport to Veterinary Pathology Sector - Department of Veterinary Clinical Pathology - Faculty of Veterinary Medicine - Federal University of Rio Grande do Sul for research**).

Emitido em Maputo aos 04 de Abril de 2016 (Issued at Maputo, 04th April 2016)

DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA
(EPIDEMIOLOGY DEPARTMENT)

MARIA EMILIA LINTO
Nome (letras de imprensa)
(Name in print)


Assinatura e Carimbo Oficial
(Signature and official government stamp)

	MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SUPERINTENDÊNCIA FEDERAL DE AGRICULTURA EM SÃO PAULO SERVIÇO DE VIGILÂNCIA AGROPECUÁRIA INTERNACIONAL - VIGIAGRO - GUARULHOS/SP
	TERMO DE FISCALIZAÇÃO DE BAGAGEM/ENCOMENDA nº 06599/2016

Inspecionamos a bagagem/encomenda do Sr.(a) CLAUDIO JOÃO MOURA LAISSE, passaporte/RG nº 12AC87821, em trânsito no Terminal TPS3, procedente de MOÇAMBIQUE, meio de transporte SA222, com destino a RIO DO GRANDE DO SUL, contendo o material a seguir caracterizado:

Descrição do Produto	Quantidade/Peso	Descrição do Produto	Quantidade/Peso
Pescados		Sementes e Grãos	
Embutidos		Mudas, Bulbos, estacas e Raízes	
Laticínios		Frutos	
Carnes		Farinha, Pós e alimentos	
Produtos apícolas		Hastes, Caules, Folhas, Flores e Folhas	
Animais		Agrotóxicos, fertilizantes e afins	
Produtos Veterinários		Insetos, Pragas e afins	
Outros			
X Sem Risco Sanitário MATERIAL DE PESQUISA CIENTÍFICA			1,000 Unidade(s)

Discriminação do Produto: 01 PACOTE CONTENDO 3 CXS DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS, 150 EPPENDORF COM DNA E 45 BLOCOS PARAFINADOS DE TECIDO -MATERIAL SUÍNO

Nos termos da legislação em vigor, o material terá o seguinte destino

LIBERAÇÃO

APREENSÃO:

Conclusão:

Destruição

Retorno à origem

Retenção por: Dias

Em função da(s) seguinte(s) não conformidades:

AUSÊNCIA DE CERTIFICAÇÃO SANITÁRIA OU FITOSSANITÁRIA

OUTROS:

Estando portanto em desacordo com o contido no(s):

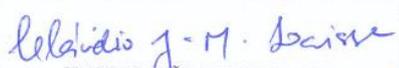
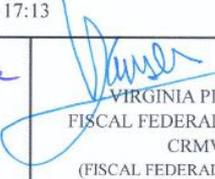
DECRETO 24.548/34

DECRETO 24.114/34

OUTRAS LEGISLAÇÕES:

Observações:

GUARULHOS/SP, 07 de abril de 2016 - Hora: 17:13

	 CLAUDIO JOÃO MOURA LAISSE 12AC87821 (RESPONSÁVEL PELA MERCADORIA)	 VIRGINIA PISATI JANSEN FISCAL FEDERAL AGROPECUARIO CRMV 12608 (FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO)
---	---	---