

Perfil sorológico, viremia e eliminação do circovírus suíno tipo 2 em animais naturalmente infectados pertencentes a granjas com ou sem a síndrome da refugagem multissistêmica¹

Flávia F. Pinto², Priscilla F. Gerber², Túlia M.L. Oliveira², Iara A. Borges² e Zélia I.P. Lobato^{2*}

ABSTRACT.- Pinto F.F., Gerber P.F., Oliveira T.M.L., Borges I.A. & Lobato Z.I.P. 2011. [Serological profile, viremia and PCV2 shedding in naturally infected pigs of herds with or without postweaning multisystemic wasting syndrome.] Perfil sorológico, viremia e eliminação do circovírus suíno tipo 2 em animais naturalmente infectados pertencentes a granjas com ou sem a síndrome da refugagem multissistêmica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(1):17-22. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brazil. E-mail: ziplobato@vet.ufmg.br

A virological and serological cross-sectional study (E1) and a longitudinal study (E2) were performed on herds with (G2 and G3) and without (G1) post weaning multisystemic syndrome (PMWS) in Brazil. Blood, serum, nasal and rectal swabs samples were collected of sows, farrowing piglets, nursery, growing and finishing pigs. In E1, were sampled 40 animals in each category (G1a and G2). In E2, (G1b and G3), 35 farrowing piglets were identified and sampled along the production cycle. Porcine circovirus type 2 (PCV2) antibodies were assayed. A PCR was used to detected PCV2 genome in blood and swabs. In E1, sows had high rates of viremic and seropositives animals, with percentage of sows with high antibodies titers greater than G2. Passive antibodies decline occurred between nursery and growing area with increased viral shedding in swabs and subsequent seroconversion in G1. In G2, the passive antibodies decay occurred in nursery, with a reduction in viral shedding. In E2, the decline of maternal immunity occurred between the 1st and 2nd collection in G1b, and between 2nd and 3rd collections in G3. In both herds, the decay of passive immunity coincided with increased viremia and viral shedding; and seroconversion occurred between the 3rd and 4th collection in both herds with decline of viremia. Viremia and viral shedding was detected in all samples days, 42% of animals sampled in E2 were viremic and all tissue samples collected at slaughter were positive for PCV2. This study confirms the persistence of viremia even in the presence of high titers of antibodies and the serological profile in a herd with or without PMWS may be different, especially with regard to the passive immunity duration.

INDEX TERMS: Serology, viral circulation, viremia, porcine circovirus type 2, postweaning multisystemic syndrome.

RESUMO.- Um estudo virológico e sorológico seccional (E1) e outro longitudinal (E2) foram realizados em granjas com (G2 e G3) e sem (G1) a síndrome de refugagem multissistêmica

(SRM) no Brasil. Foram coletadas amostras de sangue, soro, *swabs* nasal e retal de animais de cada categoria do ciclo produtivo: porcas, leitões maternidade, creche, recria e terminação. Em E1, nas granjas G1a e G2, foram amostrados 40 animais de cada categoria. Em E2, nas granjas G1b e G3, 35 leitões na maternidade foram identificados e amostrados ao longo do ciclo produtivo. O soro foi avaliado para presença de anticorpos contra circovírus suíno tipo 2 (CVS2) e sangue e *swabs* para presença do ácido nucléico viral. Em E1, a categoria porcas possuía altas taxas de animais virêmicos e

¹ Recebido em 17 de abril de 2010.

Aceito para publicação em 21 de agosto de 2010.

² Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30123-970, Brasil. *Autor para correspondência: ziplobato@vet.ufmg.br

soropositivos, com porcentagem de porcas com títulos altos superior a G2. Em G1a a queda de imunidade passiva ocorreu entre o final da fase de creche e início da recria com aumento da eliminação viral em swabs e subsequente soroconversão. Em G2 a queda ocorreu entre a fase final da maternidade e início da creche, com diminuição da eliminação viral. Em E2, a queda da imunidade materna ocorreu entre a 1ª e 2ª coleta em G1b; e em G3, entre a 2ª e 3ª coleta. Em ambas as granjas, a queda de imunidade passiva coincidiu com o aumento da viremia e eliminação viral e a soroconversão ocorreu entre a 3ª e 4ª coleta em ambas as granjas com aumento da média de título de anticorpos e declínio da viremia. Viremia e eliminação viral foram detectadas em todas as coletas realizadas; 42% dos animais amostrados em E2 foram virêmicos em todas as coletas e todas as amostras de tecido coletadas no abate foram positivas para o CVS2. Este estudo confirma a persistência da viremia mesmo em presença de altos títulos de anticorpos e que o perfil sorológico em um rebanho com e sem a presença da síndrome pode ser diferente, principalmente em relação à duração da imunidade passiva.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Sorologia, circulação viral, viremia, síndrome de refugagem multissistêmica, circovírus suíno tipo 2.

INTRODUÇÃO

A síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) é uma doença multifatorial causada pelo circovírus suíno tipo 2 (CVS2) que afeta principalmente animais nas fases de crescimento e engorda (López-Soria et al. 2005) e causa grande prejuízo na indústria suinícola em decorrência do aumento da mortalidade, diminuição do desempenho dos animais e altas taxas de refugagem.

Atualmente, a maior parte das granjas de suínos é soropositiva para CVS2, mas nem todas apresentam surtos ou casos individuais de SRM e o perfil sorológico pode variar entre rebanhos de acordo com a idade, fase de produção e manifestação de sinais clínicos da SRM (Larochelle et al. 2003, Gerber et al., 2009). As taxas de morbidade e mortalidade em decorrência da manifestação da SRM variam entre 4 e 30%, dependendo das práticas de manejo, co-infecções, fatores genéticos do hospedeiro (Segalés et al. 2005) e genótipo viral (Grau Roma et al. 2008).

O CVS2 é considerado ubíquo na população suína e é excretado por via nasal, bronquial, fecal e urinária de animais com ou sem a SRM, sendo as secreções nasais ou

aerossóis apontados como principal forma de transmissão horizontal (Caprioli et al. 2006).

Até o momento, vários estudos epidemiológicos sobre a SRM foram realizados ao redor do mundo (Larochelle et al. 2003, Rose et al. 2003, López-Soria et al. 2005; Kawashima et al. 2007) e mostraram diferenças entre a prevalência e circulação do CVS2 entre regiões e sistemas de criação de suínos, assim como na manifestação da SRM. Estes estudos são importantes para auxiliar na implementação de estratégias de controle da doença uma vez que não existe terapia efetiva para a SRM e o tratamento e prevenção focam a vacinação, diminuição do estresse e co-infecções e mudanças de manejo (Lopez-Sória et al. 2005).

No Brasil, a primeira descrição da SRM foi feita em 2001 (Zanella et al. 2001) e desde então tem sido reportada em todo o território nacional. Entretanto, existem poucos estudos a respeito da circulação viral, viremia e perfil sorológico do CVS2 no Brasil. Desta forma, este trabalho visa contribuir para o entendimento da epidemiologia e patogênese do CVS2 através do estudo da cinética de eliminação e circulação viral, o perfil sorológico de granjas com e sem a SRM.

MATERIAL E MÉTODOS

Granjas. Foram estudadas três granjas de ciclo completo de sítio único entre 500 e 600 matrizes sabidamente positivas para a presença do CVS2 através da nested PCR (nPCR) e classificadas sem (G1) ou com sinais clínicos da SRM (G2 e G3) de acordo com a descrição de Quintana et al. (2001). A caracterização das granjas estudadas pode ser visualizada no Quadro 1. Foram realizados dois estudos, um estudo seccional (E1) com G1 (designada de G1a) e G2 e um estudo longitudinal (E2) com G1 (designada de G1b) e G3.

Amostras coletadas. Foram coletadas amostras de sangue, soro, swabs nasal e retal de animais escolhidos aleatoriamente de cada categoria do ciclo produtivo em cada uma das granjas. Em E1, nas granjas G1a e G2, foram amostrados aleatoriamente 40 animais nas categorias de: matrizes (20 em período de lactação e 20 em gestação), leitões maternidade (8-19 dias de idade), creche (25-40 dias), recria (70 a 80 dias) e terminação (100-120 dias). Em E2, nas granjas G1b e G3, 35 leitões na maternidade (8-19 dias de idade) foram amostrados e identificados com brinco numerado, sendo acompanhados ao longo do ciclo produtivo na creche (30-35 dias de idade), recria (56-70 dias), terminação (85-100 dias) e abate (150 dias). Todas as amostras obtidas (swabs, sangue e soro) foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

Quadro 1. Características das granjas estudadas

Granjas	Idade a desmama (dias)	% Mortalidade ^a (período de um ano durante o estudo)	Média do peso aos 21 dias (kg)	Média do peso aos 150 dias (kg)	Idade à soroconversão (semanas)	Idade dos animais acometidos (dias)	Sinais clínicos associados a SRM
G1 ^b	21	1,8	6	102	14	-	-
G2	18	4,12	5,5	90,2	13	65	Respiratórios
G3	17	7,6	6,1	93,7	13	70	Diarréia e respiratórios

^a Mortalidade do desmame ao abate.

^b Granja sem histórico de SEM.

Extração de DNA e nested PCR (nPCR). O DNA dos *swabs* foi extraído utilizando-se a técnica com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Para o sangue, utilizou-se o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante em 300µl de amostra. As amostras foram analisadas pela nPCR utilizando o par de iniciadores descritos por Ellis et al.(1998) para reação externa: 5'-CGGATGTTGTAGTCCTGGTCG-3' e 5'-ACTGTCAA GGCTACCA CAGTCA-3' e na reação interna foram utilizados os primers descritos por Kim e Chae (2001): 5'-G ATTGTATG GCGGGAGGAT-3' e 5'-AT TGACGATTGTCCCCC-3'. As concentrações finais dos reagentes foram: 1,25mM MgCl₂, 1X tampão PCR, 200 µM de cada dNTP, 10 µM de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase. Ambas as reações foram realizadas utilizando 35 ciclos, aquecimento 95°C por um min., 65°C por um min, 72°C por 1 min. Uma etapa final de alongamento foi realizada a 72°C por 10 min.

Sorologia. O perfil sorológico das granjas foi determinado pela técnica de imunoperoxidase em monocamada celular (IPMC) adaptada de Ellis et al. (1998). Os soros foram testados nas diluições: 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 e 1:5120 sob monocamada de células PK-15 infectadas com amostra de campo de CVS2 isolada de rebanho brasileiro (PCV2VC2B). As placas foram incubadas com as amostras por 1h a 37°C e então lavadas com PBS-Tween. Proteína G conjugada com peroxidase foi incubada por outra hora a 37°C. A revelação da reação foi feita com AEC. Títulos de anticorpos <20 foram considerados negativos; 20 a 80, baixos; 320 a 1280, médios e

≥5120, altos. O título de anticorpos foi expresso através da média de log 4.

Análise estatística. As porcentagens de amostras positivas na PCR foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado e a análise de distribuição dos títulos de anticorpos e perfil sorológico foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis entre categorias de animais na mesma granja e Mann-Whitney entre categorias de diferentes granjas. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Em E1, as duas granjas possuíam altas taxas de animais virêmicos e soropositivos na categoria porca, com maior percentual de animais eliminando o vírus em relação à categoria de leitões maternidade ($P < 0.05$) (Fig.1). Em G1a, a porcentagem de porcas com títulos altos foi superior a G2 (Fig.2).

Na creche de G1a houve aumento das taxas de *swabs* positivos para CVS2 quando comparados aos leitões maternidade ($P < 0.05$) e a queda da imunidade passiva ocorreu entre o final da fase de creche e início da recria com subsequente soroconversão (Fig.1 e 2). Os resultados encontrados na creche de G2 sugerem menor circulação viral que G1a com a queda do título de anticorpos passivos ocorrendo mais precocemente, entre a fase final de maternidade e início de creche, acompanhada pela diminuição da taxa de

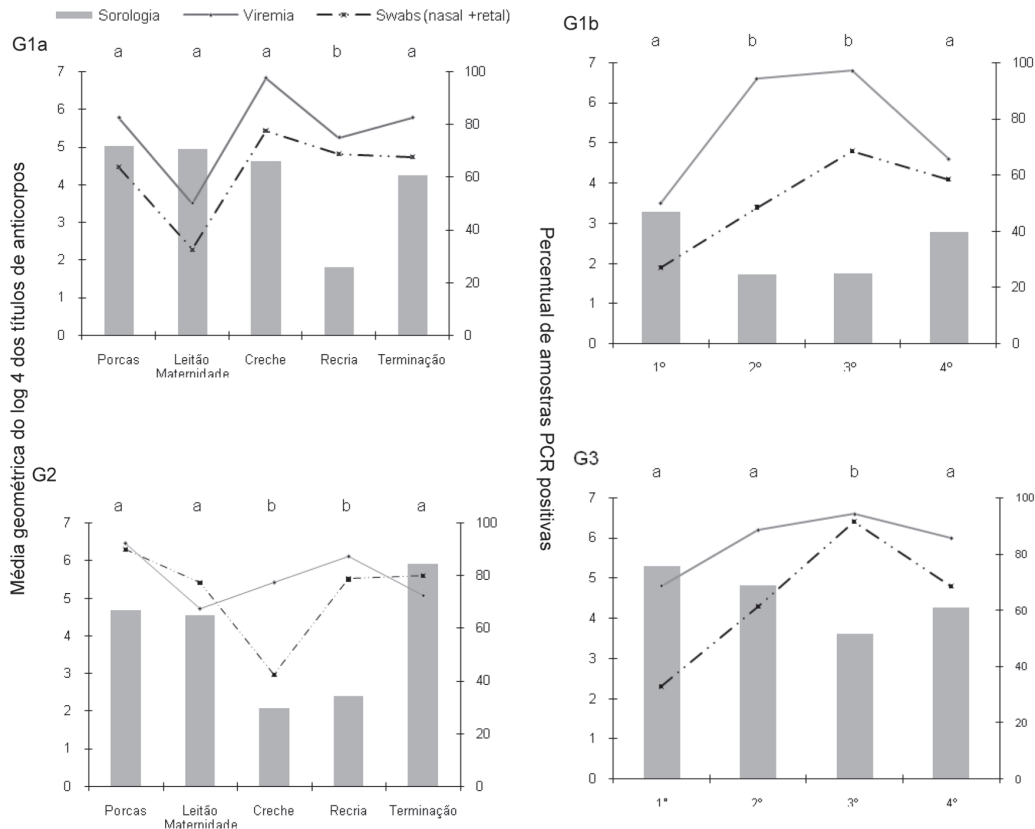


Fig.1. Perfil sorológico e virológico de granjas com SRM (G2 e G3) ou sem SRM (G1) de E1 (G1a e G2) e E2 (G1b e G3). Diferenças significativas ($P > 0.05$) entre a média geométrica do título de anticorpos entre categorias de animais na mesma granja são indicadas por letras diferentes.

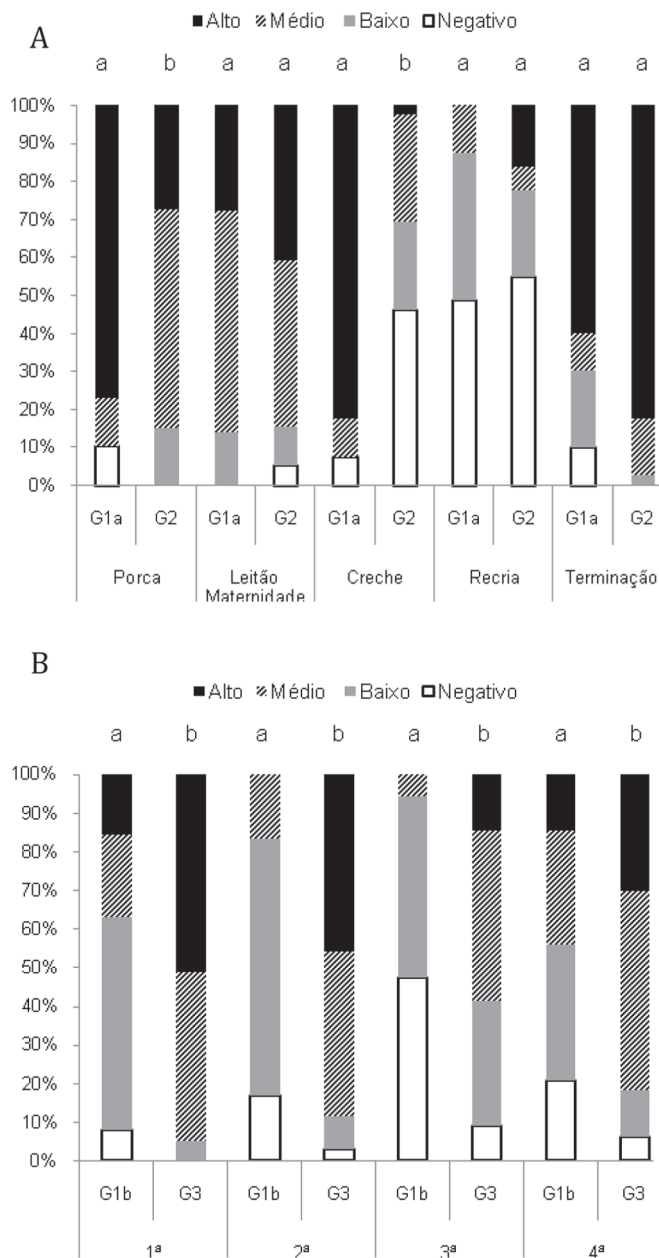


Fig.2. Distribuição dos títulos de anticorpos contra CVS2, em amostras de soro coletadas de animais de diferentes categorias em G1a e G2 (a) e do acompanhamento (b). Amostras negativas (título <20), com baixo título (20 e 80), título médio (320 e 1280), título alto (≥ 5120). Diferenças significativas ($P > 0.05$) entre a distribuição do título de anticorpos entre as granjas dentro do mesmo estudo são indicadas por letras diferentes.

animais eliminando o vírus. A soroconversão ocorreu entre a recria e terminação (Fig.1 e 2).

Em E2, na 1ª coleta, 94,3 e 100% dos animais eram soropositivos para o CVS2 em G1b e G3 respectivamente, porém em G1b predominaram baixos títulos de anticorpos com a queda da imunidade materna entre a 1ª e 2ª coleta; enquanto em G3, com predomínio de altos títulos,

esta queda ocorreu entre a 2ª e 3ª coleta. Em ambas as granjas, a queda de imunidade passiva coincidiu com o aumento da viremia e eliminação viral (Fig.1 e 2). A soroconversão ocorreu entre a 3ª e 4ª coleta em ambas as granjas com aumento da média de título de anticorpos e declínio da viremia (Fig.1 e 2). A média de títulos de anticorpos de G3 foi mais elevada que G1b em todas as coletas (< 0.05) (Fig.1 e 2).

O perfil virêmico de E2 foi semelhante nas granjas amostradas, com aumento da taxa de leitões virêmicos da primeira a terceira coletas e diminuição na quarta coleta, coincidindo a alta da média do título de anticorpos nesta categoria (Fig.1). G2 seguiu o mesmo perfil virêmico de E2, porém, G1a apresentou diminuição da taxa de animais virêmicos na recria e aumento da taxa na terminação (Fig.1).

Em G1b e G3, 9 e 21 animais foram virêmicos em todas as coletas e 6 e 8 destes animais tiveram swabs positivos para CVS2 também em todas as coletas, respectivamente. Em G3 um animal não apresentou viremia em nenhuma coleta e um animal apresentou eliminação do vírus na ausência de viremia. Em G1b 2 animais sorologicamente negativos, eliminavam o vírus e eram virêmicos. Todas as amostras de tecido coletadas no abate foram positivas para o CVS2.

DISCUSSÃO

Neste estudo observamos que houve diferença entre o perfil sorológico de granjas com e sem a SRM em estudos seccionais e longitudinais. O elevado número de animais virêmicos em todas as categorias das granjas estudadas sugere haver grande exposição ao CVS2, fato corroborado pelo alto número de soropositivos, sugerindo uma replicação viral contínua nestes animais.

Os dados encontrados neste estudo demonstrando infecção precoce de leitões entre 5 e 19 dias de vida em granjas com ou sem a SRM diferem de outros estudos que sugerem que a infecção em granjas com sintomatologia clínica ocorra no período pós-desmama, entre 3 e 5 semanas (Shibata et al. 2003) e durante as fases de engorda e terminação em granjas sem sintomatologia clínica (McIntosh et al. 2006). Estas diferenças demonstram a importância de mais estudos epidemiológicos para entendimento da doença no Brasil.

A infecção precoce poderia ocorrer através do contato com o vírus eliminado no meio ambiente pelas porcas, tendo em vista o CVS2 ser muito resistente ao tratamento por calor (O'Dea et al. 2008) e desinfetantes (Martin et al., 2008); ou ainda através de infecção transplacentária pelo CVS2 (O'Connor et al. 2001). A transmissão viral via colostro ainda não foi descrita, porém estudos reportaram a presença de ácido nucléico de CVS2 em amostras de leite e colostro (Ha et al. 2008) sugerindo que esta via pode ser uma forma de infecção precoce para os leitões lactentes.

Ainda que a presença de anticorpos maternos não seja capaz de proteger completamente contra a infecção, sugere-se que estes diminuam o pico de viremia e sejam efetivos na prevenção da SRM e diminuição da mortalidade.

de, principalmente quando em altos títulos (Calsamiglia et al. 2007). Em leitões com baixos níveis de anticorpos passivos, a infecção subclínica pode ocorrer diminuindo a taxa de ganho de peso e conversão alimentar, mesmo na ausência de sinais clínicos ou lesões macroscópicas da SRM (Ostanello et al. 2005). As granjas estudadas com manifestações clínicas da SRM apresentaram menor média de peso aos 150 dias em relação à granja sem SRM.

Em nosso estudo observamos que nas granjas afetadas pela SRM, as categorias em que há maior número de animais com baixos títulos de anticorpos coincidem com a fase do ciclo em que os animais são acometidos pela síndrome e apresentam as maiores taxas de viremia e eliminação do vírus.

Em G1, que não tinha a SRM, a presença de animais soronegativos nas categorias de porca e terminação fez com que a média de anticorpos nestas categorias fosse mais baixa que nas granjas com a SRM. G1 também teve o menor número de amostras de *swabs* positiva, ainda que não houvesse diferença significativa na porcentagem de animais virêmicos. Este fato pode estar relacionado com a menor circulação viral já que Segalés et al. (2005) ao realizarem a quantificação do CVS2 em amostras de soro e *swabs* tonsilar, nasal, traqueobronquial, urinário e retal, coletadas de granjas com e sem a sintomatologia da SRM, verificaram que, com exceção do *swabs* retal, todas as amostras provenientes da granja com manifestação da SRM possuíam maiores quantidades de vírus.

Em ambos os estudos observamos que os títulos de anticorpos encontravam-se heterogêneos em todas as fases do ciclo produtivo amostradas, agrupando animais com diferentes níveis de proteção em uma mesma categoria, principalmente nas fases de creche e recria em que predomina o aparecimento dos sinais clínicos da SRM.

Em geral, a curva dos *swabs* acompanha a curva de viremia. A maioria dos animais virêmicos excretava o vírus pelo menos por uma das vias testadas. Porém observou-se que animais não virêmicos podem eliminar o vírus em secreções e excreções e animais virêmicos podem não excretá-lo, como relatado em outros estudos (Grau-Roma et al., 2008).

Alguns animais acompanhados em nosso experimento eram soropositivos, virêmicos e eliminaram o vírus continuamente ao longo dos 70 dias do estudo, indicando que o sistema imune não foi capaz de eliminar a infecção. Estes achados estão em concordância com outros estudos que detectaram CVS2 em amostras de sangue, soro e *swabs* até 70 dias pós-infecção experimental (Shibata et al. 2003). A viremia persistente após aparecimento de anticorpos indica que o desenvolvimento de uma resposta humoral não é eficiente para a eliminação do vírus do organismo provavelmente devido à ausência ou baixa quantidade de anticorpos neutralizantes ou ainda fatores ligados a resposta celular.

As diferenças entre a média do título de anticorpos e sua distribuição nos estudos realizados em G1, em geral com média mais baixa e menor número de animais virêmi-

cos e soropositivos no acompanhamento em relação ao perfil, podem ser explicadas em parte pela diferença de idade dos animais amostrados, mais cedo em E2, fazendo com que a média de títulos de anticorpos permaneçam mais baixas neste experimento devido a menor soroconversão apresentada. Além disso, os perfis sorológicos podem ser variáveis, mesmo em um período curto de tempo, devido a mudanças de manejo ocorridas na granja.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser úteis para o entendimento da circulação do CVS2 em granjas naturalmente infectadas com e sem a manifestação clínica da SRM no Brasil. Além disso, contribuem para a adoção de medidas corretivas de manejo e estabelecimento do momento adequado da vacinação levando em conta o momento da infecção e duração de anticorpos passivos em cada granja.

Este estudo confirma que o perfil sorológico em um rebanho com e sem a presença da síndrome pode ser diferente, principalmente em relação à duração da imunidade passiva. A manifestação da circovirose pode estar relacionada a queda da imunidade passiva, animais com baixos títulos de anticorpos na fase crítica do aparecimento de sinais clínicos.

Agradecimentos.- À Fapemig e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Calsamiglia M., Fraile L., Espinal A., Cuxart A., Seminati C., Martin M., Mateu E. & Segales J. 2007. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res. Vet. Sci.* 82:299-304.
- Caprioli A., Mcneilly F., Mcnair I., Lagan-Tregaskis P., Ellis J., Krakowka S., Mckillen J., Ostanello F. & Allan G. 2006. PCR detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in blood, tonsillar and faecal swabs from experimentally infected pigs. *Res. Vet. Sci.* 81:287-292.
- Ellis J., Hassard L., Clark E., Hading J., Allan A., Willson P., Strokappe J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D. & Haines D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39:44-51.
- Gerber P., Galinari G., Silva M., Campos F., Reis A. & Lobato Z. 2009. Distribution of antibodies against porcine circovirus type-2 (PCV2) in single site and multi-site farrow-to-finish farms in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 87:488-491.
- Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., López-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A. & Segalés J. 2009. A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Vet. Microbiol.* 138:53-61.
- Kawashima K., Katsuda K. & Tsunemitsu H. 2007. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:60-8.
- Kim J. & Chae C. 2002. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in naturally and experimentally coinfecting pigs by double in situ hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:236-240.
- Ha Y., Ahn K.K., Kim B., Cho K.D., Lee B.H., Oh Y.S., Kim S.H. & Chae C. 2008. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. *Res. Vet. Sci.* 45:842-848.
- Larochelle R., Magar R. & D'Allaire S. 2003. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67:114-120.

- López-Soria S., Segalés J., Rose N., Vinas M.J., Blanchard P., Madec F., Jestin A., Casal J. & Domingo M. 2005. Exploratory study on risk factors for postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Prev. Vet. Med.* 69:97-107.
- Martin H., Le Potier M.F. & Maris P. 2008. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 177:388-393.
- McIntosh K.A., Harding J.C.S., Ellis J.A. & Appleyard G.D. 2006. Detection of porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Can. J. Vet. Res.* 70:58-61.
- O'Connor B., Gauvreau H., West K., Bogdan J., Ayroud M., Clark E. G., Konoby C., Allan G. & Ellis J.A. 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can. Vet. J.* 42: 551-553.
- O'Dea M.A., Hughes A.P., Davies L.J., Muhling J., Buddle R. & Wilcox G.E. 2008. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. *J. Virol. Methods* 147:61-6.
- Ostanello F., Caprioli A., Di Francesco A., Battilani M., Sala G., Sarli G., Mandrioli L., McNeilly, F., Allan G.M. & Prosperi S. 2005. Experimental infection of 3 week old conventional colostrums fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 108:179-186.
- Rose N., Larour G., Le Diguerguer G., Eveno E., Jolly J.P., Blanchard P., Oger A., LeDimna M., Jestin A. & Madec F. 2003. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 french farrow-to-finish hards. *Prev. Vet. Med.* 61:209-225.
- Segalés J., Calsamiglia M., Olvera A., Sibila M., Badiella M. & Domingo M. 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, trachea-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Microbiol.* 111: 223-229.
- Shibata I., Okuda Y., Yazawa S., Ono M., Sasaki T., Itagaki M., Nakajima N., Okabe Y. & Hidejima I. 2003. PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab nasal and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J. Vet. Med. Sci.* 65:405-408.
- Zanella C.J.R., Morés N., Schiochet M.F. & Trombetta C. 2001. Diagnóstico molecular e caracterização do circovirus suíno tipo 2 isolados no Brasil. *Anais X Abraves, Porto Alegre, RS, p.97-98.* (Resumo).