

Implementação da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o diagnóstico do circovírus suíno tipo-2 (CVS-2)

Clara Nilce Barbosa ¹

Tânia Rosária Pereira Freitas ²

Resumo

Circovírus Suíno Tipo-2 (CVS-2) é um vírus não-envelopado, DNA fita única circular, classificado na família Circoviridae, associado à Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS). A SMDS é considerada uma doença emergente, multifatorial e de distribuição cosmopolita. Os sinais clínicos são inespecíficos e o diagnóstico, além dos achados de necropsia e histopatologia compatíveis com SMDS, deve ser corroborado pela demonstração do ácido nucléico e (ou) do antígeno viral nas lesões. A técnica de Imuno-Histoquímica (IHQ) permite a demonstração de antígenos virais pela aplicação de anticorpos específicos e conjugados de anticorpos. A implementação da IHQ foi realizada aplicando-se anticorpo policlonal anti – CVS -2 em 23 blocos de cortes histológicos, fixados com formalina e embebidos em parafina, sabidamente positivos ou negativos para o CVS-2. A análise histológica prévia demonstrou que os tecidos positivos continham lesões características da SMDS. O genoma do CVS-2 foi demonstrado pela Hibridização “in situ” (HIS). A IHQ implementada foi testada em 16 blocos com de três a quatro amostras de tecidos de animais, totalizando, respectivamente, 48 a 64 amostras de tecido de suínos com suspeita clínica da SMDS. Em dez blocos (40 amostras de tecidos) foram confirmadas pela detecção do genoma viral. Os resultados obtidos pela aplicação da IHQ padronizada foram correlacionados com as lesões histopatológicas compatíveis com a SMDS. A IHQ vem sendo aplicada com êxito no rastreamento do vírus em suídeos de diversas granjas brasileiras onde se estabelece a suspeita de ocorrência de SMDS.

Palavras-chave: Circovírus suíno tipo-2 - Imuno-histoquímica - Diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Circovírus Suíno Tipo-2 (CVS-2) é um vírus não-envelopado, DNA fita única circular, classificado na família Circoviridae e associado à Síndrome Multissistêmica do Definhamento dos Suínos (SMDS). A SMDS é considerada de

uma doença emergente que tem sido descrita em vários locais do mundo onde a suinocultura tem grande expressão econômica. A enfermidade acomete suínos principalmente de seis a doze semanas de idade (HARDING, 2004; BARBOSA et al. 2008). Os sinais clínicos da SMDS são inespecíficos, porém comumente são

¹ Pós-doutoranda - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal Rural do Pernambuco.

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

Correspondência para / Correspondence to:

Tânia Freitas

Av. Rômulo Joviano, s/n. Cx.Postal 50

CEP: 33.600-000 Pedro Leopoldo- MG- Brasil.

Tel: +55(31)3660-9630; Fax: +55(31) 36612383.

E-mail: taniafrei@hotmail.com

citados desde baixo ganho de peso, desenvolvimento corporal deficiente até distúrbios respiratórios e diarreia.

As lesões macroscópicas associadas à doença são muito variáveis, sendo constatadas linfadenomegalia regional ou generalizada e pulmões com áreas de consolidação nos lobos anteriores crânio-ventral (SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005).

As principais alterações histopatológicas localizam-se especialmente nos tecidos linfóides do baço, tonsilas e linfonodos e são caracterizadas por redução nos números de linfócitos, proliferação de histiócitos e formação de células gigantes multinucleadas. Eventualmente, pode ser observada a presença de corpúsculo de inclusão intracitoplasmático (ROSELL et al., 1999; KIM; CHOI; CHAE, 2003). Doenças concorrentes, como a síndrome respiratória reprodutiva suína (SRRS), a Parvovirose Suína, a Enteropatia Proliferativa e a Doença de Glässer dificultam o diagnóstico da SMDS. Conseqüentemente, o diagnóstico final deve ser estabelecido pela presença de sinais clínicos e achados de necropsia compatíveis com SMDS, conjuntamente com identificação de lesões histopatológicas e a demonstração do ácido nucléico e (ou) do antígeno viral dentro das lesões pelas técnicas de Hibridização *in situ* (HIS) ou de Imuno-Histoquímica (IHQ), respectivamente. Esses critérios analisados separadamente não confirmam a presença da doença, pois a infecção pelo CVS-2 não implica necessariamente a existência da SMDS no plantel (HARDING, 2004; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005).

Atualmente, a técnica de IHQ está sendo amplamente empregada em diagnósticos de enfermidades humanas e de animais, em particular, nas doenças infecciosas suínas de etiologias bacterianas e virais. A IHQ conjuga as técnicas histológicas, imunológicas e bioquímicas, possibilitando a demonstração de antígenos tissulares *in situ* por meio da utilização de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GIMENO, 1995).

O objetivo deste trabalho foi de implementar a técnica de IHQ para a demonstração e diagnóstico de antígenos do

CVS-2 em diferentes tecidos de suínos com sinais clínicos sugestivos de SMDS.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para implementação da IHQ foram realizados no Laboratório Nacional de Agropecuário LANAGRO/MG do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG.

Tecidos de suínos usados como controles positivos e negativos

Inicialmente, a implementação da IHQ foi realizada em 23 blocos de tecidos de suínos, dos quais 12 eram oriundos de suínos com a SMDS e com o genoma viral previamente demonstrado pela técnica de hibridização *in situ* (HIS). Amostras de tecidos utilizadas como controles positivos foram gentilmente fornecidas pelo Professor Joaquim Segalés da Universidade Autônoma de Barcelona, Espanha.

Os tecidos utilizados como controles negativos foram obtidos de suínos “SPF” (*Specific Pathogen Free*) obtidos no Centro de Pesquisa em suínos e Aves – CNPSA/ Embrapa, SC. Todos os tecidos utilizados estavam fixados em formalina e embebidos em parafina.

Soros e anti-soros

Soros de suínos com anticorpos policlonais contra CVS-2 e soros de suínos livres de anticorpos contra o CVS-2, aplicados na técnica como controles positivos e negativos, respectivamente, foram adquiridos da VMRD, USA. Também foram utilizados soros de suínos livres de anticorpos contra o CVS2, oriundos do plantel SPF do CNPSA – Embrapa (SC).

- Amostras de tecido para análise

Dezesseis blocos de tecidos suínos oriundos de granjas com histórico de refugagem fixados com formalina e embebidos em parafina, cada com de três a quatro diferentes tecidos correspondentes ao mesmo animal, perfazendo um total de 48 a 64 amostras,

foram analisados pela IHQ implementada. Dos 16 blocos trabalhados, dez também foram testados pela HIS para demonstração do ácido nucléico viral.

Histopatologia

Os fragmentos de amostras de tecidos de suínos foram fixadas em formalina tamponada 10% (pH 7,2) e processados em equipamento histotécnico automático para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Em seguida, foram efetuados cortes de cinco micrômetros de espessura. Em cada lâmina, foram colocados dois a três cortes corados pela técnica de Hematoxilina – Eosina (HE) segundo Luna (1968).

Contra-coloração

Os cortes histológicos foram desidratados em soluções crescentes de álcoois, permanecendo um minuto em cada solução. Em seguida, foram contra-corados com hematoxilina de Mayer por quarenta e cinco segundos e lavados imediatamente em água corrente por cinco minutos. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

Preparação das lâminas para IHQ

Inicialmente, as lâminas de vidro foram limpas com solução de álcool-éter na proporção 1:1 sendo mantidas nessa solução por doze horas, em temperatura de 4°C. Em seguida, foram lavadas com água destilada em dois ciclos de cinco minutos. Para evitar o descolamento dos cortes durante o processamento, as lâminas foram tratadas com polímero adesivo Silane (3-aminopropiltrióxosilane, SIGMA, USA) a 2% em acetona. As lâminas foram imersas na solução Silane por um minuto e, na seqüência imediata, submersas em água destilada por um minuto e secas em estufa a 60°C por duas horas. Todos os procedimentos foram realizados em capela de exaustão.

Imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de IHQ foi adaptada e padronizada com base em Sorden e colaboradores (1999) e em Chianini e colaboradores (2001).

- Re-hidratação dos cortes

Os cortes histológicos foram desparafinizados em quatro banhos de xileno com uma duração de três minutos em cada. As amostras foram tratadas com 96%GL para retirada dos resíduos de xileno. Em seguida, foram re-hidratadas em uma bateria decrescente de álcoois 90%, 80% e 70%, durante um período de três minutos em cada etapa. Ao final, os cortes de tecidos foram submersos em água destilada por três minutos.

- Bloqueio da peroxidase

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada tratando-se os cortes histológicos com uma solução de peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% em metanol, durante 30 minutos, em temperatura ambiente, protegidos da luz. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados em água corrente por dez minutos, seguindo-se um banho em tampão fosfato (PBS) por cinco minutos.

- Recuperação antigênica

A recuperação antigênica dos cortes histológicos foi obtida aplicando-se uma solução de proteinase K (GIBCO, USA) diluída em PBS a 0,1M na concentração final de 0,05%. Os cortes foram incubados em câmara úmida em temperatura de 37°C por três a dez minutos. Em seguida, foram lavados em água corrente por dez minutos e em PBS por cinco minutos.

- Bloqueio das reações inespecíficas

Os cortes histológicos foram tratados com solução de soro albumina bovina para o bloqueio das reações inespecíficas. Uma solução de soro albumina (SIGMA, USA) na concentração final de 4% em PBS, pH 7,2, foi aplicada sobre os cortes em câmara úmida, por um período de trinta minutos em temperatura de 37°C. Em seguida, foram submetidos às lavagens citadas anteriormente.

- Titulação dos anticorpos primário e secundário

O anticorpo primário (anti CVS-2, produzido em suínos, VMRD, USA) foi testado nas seguintes diluições: 1:100, 1:200, 1:500,

1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:3500, 1:5000 e 1:10000 em PBS pH 7,2. Cada diluição foi aplicada sobre três cortes histológicos que foram incubados pelos períodos de quinze, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos em temperatura de 37°C. Após cada incubação, os cortes foram lavados como citado anteriormente e drenados cuidadosamente com papel toalha.

Cerca de 80ml do anticorpo secundário (anti-Imunoglobulina G (IgG) de suíno conjugado com peroxidase – SIGMA, USA) foi adicionado, sobre os cortes histológicos nas diluições: 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2500 e 1:5000 e incubados por quinze, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos, em câmara úmida a 37°C. Cada diluição foi testada em triplicata. Após cada incubação, os cortes foram lavados e drenados como descrito anteriormente.

- Controles da prova

Em cada bateria de teste, foram incluídos três duplas de controles positivos e negativos. Na primeira dupla de controles (positivo e negativo), foram aplicados 50µL de PBS no lugar do anticorpo primário. Na segunda dupla de controles (positivo e negativo), foram aplicados 50µL de anticorpo policlonal anti – CVS -2. Na terceira dupla de controles, foi aplicado 50µL de soro negativo.

- Revelação da IHQ

Os cortes foram tratados com cerca de 80µL de solução com substrato cromógeno da peroxidase DAB (diaminobenzidina, Dako) e peróxido de hidrogênio, incubados à temperatura ambiente, em câmara úmida e protegidos da luz. A reação foi paralisada com a lavagem dos cortes histológicos em água corrente após a submissão das amostras em cinco, sete, oito, dez e quinze minutos de incubação.

- Leitura e interpretação

Os cortes histológicos processados pela HE e IHQ foram lidos ao microscópio óptico nas amplitudes de 10X e 40X. No teste de HE, as lesões histopatológicas sugestivas de SMDS foram baseadas em Rosell e colaboradores (1999), enquanto que, para a análise da IHQ,

foram avaliados os detalhes da morfologia celular, a presença e a distribuição antígeno viral. No Quadro 1 está descrito o padrão de leitura dos resultados.

RESULTADOS

Os cortes em tecidos de suínos SPF, corados pela técnica do HE, mostraram um padrão histológico sem alterações. Os tecidos sabidamente positivos revelaram lesões histopatológicas características da SMDS. Nos órgãos linfóides, representados pelos linfonodos e placas de Peyer, a redução de linfócitos com desaparecimento dos folículos linfóides e proliferação de histiócitos, foi observada (FIGURA 1). Nos linfonodos, foram evidenciadas células gigantes multinucleadas e, ocasionalmente, os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos. Broncopneumonia intersticial de intensidade variada pode ser evidenciada nos tecidos pulmonares. A presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário no fígado e nefrite intersticial linfo-histiocitária de distribuição multifocal puderam ser observados nos rins.

As análises efetuadas para a implementação da técnica da IHQ permitiram definir com sucesso os padrões. A recuperação antigênica nos cortes histológicos foi obtida após cinco minutos. As titulações dos anticorpos primários e secundários permitiram obter uma ótima marcação nas diluições de 1:3000 e 1:2500, respectivamente, submetidos a quarenta e cinco minutos de incubação em câmara úmida e em temperatura de 37°C. O melhor tempo para catálise do substrato da enzima peroxidase DAB foi definido em cinco minutos. O ajuste dos tempos permitiu a minimização da coloração de fundo ou ruídos que ocorrem quando a concentração de algum reagente não está ajustada.

As células positivas para a presença do CVS-2 exibiam marcação de cor marrom, caracterizando a presença do antígeno, concentrando-se principalmente nos citoplasmas e ocasionalmente nos núcleos. Nos infiltrados inflamatórios, tanto em órgãos

Classificação	Intensidade	Leitura
Negativo	-	Ausência de marc
Fraco - positivo	+	Menos de 25%
Positivo	++	Entre 25 % a 50
Forte - positivo	+++	Acima de 50%

Quadro 1 - Parâmetros para a leitura e interpretação da IHQ para a demonstração de antígenos do CVS-2.

linfóides como em não linfóides, as células com reação positiva encontravam-se agrupadas ou disseminadas pelo tecido. Um forte sinal (+++) de marcação foi demonstrado no citoplasma dos macrófagos e histiócitos, em células gigantes multinucleadas e ao redor dos corpúsculos de inclusão. Além disso, os histiócitos disseminados exibiam, em menor intensidade, dispersos sinais de marcação (FIGURA1; FIGURA 2).

A distribuição de células positivas nos linfonodos foi multifocal, associada a um processo inflamatório. Particularmente, nos linfonodos, foram observadas marcações consistentes, assumindo intensidades que variavam de moderada (++) a forte (+++).

A marcação nas placas de Peyer foi moderada (++) geralmente em células com um núcleo grande, citoplasma abundante e dispersa em todo tecido. Comparação com os mesmos cortes histológicos corados por HE indicou que muitas dessas células eram histiócitos (FIGURA 1).

O antígeno viral foi também demonstrado em histiócitos localizados no fígado, pulmão e rim. A marcação nos hepatócitos foi classificada como fraca (+). Nos pulmões e nos rins, células que se assemelhavam a histiócitos intersticiais apresentaram marcação moderada (++) de forma similar para células renais epiteliais tubulares.

Nos controles negativos, da técnica de IHQ, não foram verificados sinais de marcação, prevalecendo apenas uma cor violácea, resultante da ação da hematoxilina de Mayer, conforme mostra a Figura 3.

Na análise das amostras de campo, observou-se uma similaridade dos resultados obtidos entre todos os blocos de tecidos que foram submetidos às técnicas de IHQ e HIS. Acresce que, nas amostras de tecidos provenientes de granjas com histórico clínico,

foi observada com nitidez a presença do antígeno viral nas lesões macroscópicas e histopatológicas características da síndrome (FIGURA 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostraram que a IHQ para a detecção de antígenos virais em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina é um método efetivo para o diagnóstico do CVS-2 em tecidos de suínos. Em concordância com McNeilly e colaboradores (2002) que, aplicando a IHQ, conseguiram demonstrar a presença do CVS-2 em tecidos de suínos com infecções clínica e subclínica, infectados experimentalmente como também de amostras de campo de rebanhos com SMDS. Entretanto, a literatura corrente afirma que são fundamentais para o diagnóstico da SMDS: o histórico sanitário do rebanho, as injúrias nos tecidos dos suínos, tanto macro como microscópicas, características da doença e, para a associação do CVS-2 a SMDS, a demonstração de antígenos ou genoma virais nos tecidos lesados. Atendendo a essas exigências, as técnicas HIS e IHQ são amplamente empregadas na detecção de CVS-2, por permitirem confrontar as alterações histopatológicas com a presença do ácido nucléico e (ou) o antígeno viral (ALLAN et al., 1989; McNEILLY et al., 1999). Isso se deve ao fato de a IHQ congrega a anatomia patológica, imunologia e bioquímica conjuntamente com distintos marcadores enzimáticos que possibilitam a detecção de até mesmo pequenas quantidades de antígenos nas lesões histológicas, além da localização tecidual de um antígeno e a relação espacial de diferentes antígenos entre si. (HONIG et al., 2005).

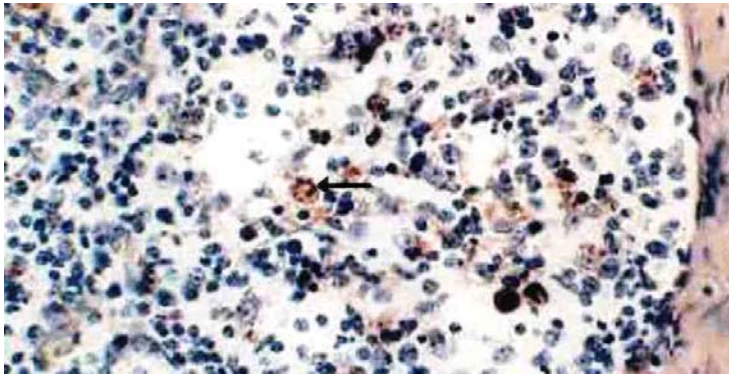


Figura 1 - Placa de Peyer de suíno de rebanho com SMDS, demonstrando a redução no número das células linfóides e marcação intensa de histiócitos e antígenos do CVS-2 (seta) evidenciados pela IHQ.

Nota: 400X.

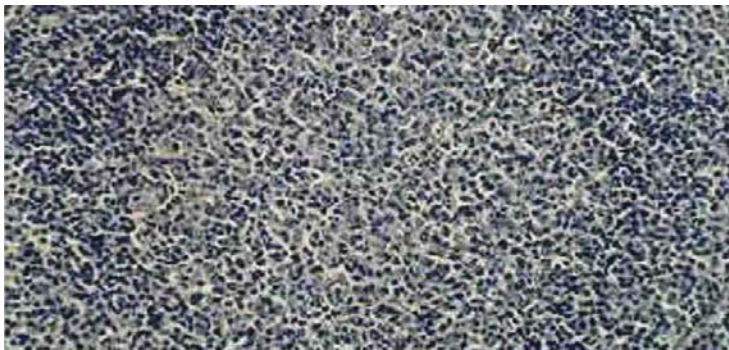


Figura 2 - Linfonodos de suíno naturalmente infectado com CVS2.

Notas: - Antígeno viral detectado pela técnica de IHQ;
- Marcação específica em macrófagos (histiócitos);
- 400X.

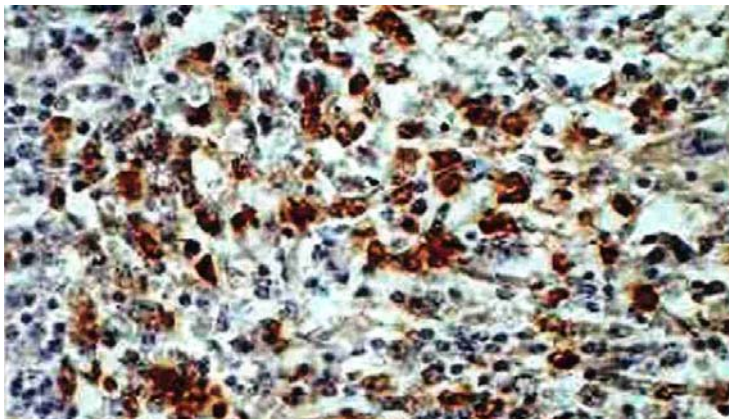


Figura 3 - Avaliação dos controles negativos da IHQ.

Notas: - Anticorpo primário de suíno oriundo de plantel "SPF", livre de anticorpos contra o CVS- 2, aplicado em linfonodos de suíno infectado.
- Contra – coloração Hematoxilina de Mayer;
- 200X.

O sucesso na implementação da IHQ, nas nossas condições laboratoriais, foi fundamentado na acuidade da realização de cada etapa da técnica, conjuntamente com a qualidade dos produtos aplicados. Ressalta-se que todas as etapas da técnica foram críticas, não bastando padronizar apenas um reagente ou definir um único tempo.

A aderência dos cortes histológicos às lâminas de vidro, preservando e mantendo a morfologia celular, demonstra a eficácia do Silane. A aplicação da proteinase K para recuperação antigênica foi baseada no potencial catalítico dessa enzima para romper as ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas, permitindo a recuperação das partes imuno-reativas dos antígenos fixados (ALLAN et al., 1989; HAINES; CLARK; DUBOVI, 1992). Contudo, é imprescindível a definição exata do tempo de ação da enzima sobre o tecido em análise, para impedir que o antígeno-alvo seja atingido pela proteólise enzimática. O período de tempo de cinco minutos para um corte histológico com cinco micrômetros de espessura foi suficiente para manter a integridade do tecido e uma boa visualização da reação.

Na implementação do método a IHQ, ainda se agregaram o baixo custo e a rápida execução, quando comparado ao isolamento viral. Ressalta-se que a especificidade da IHQ pode ser ampliada pelo uso anticorpos monoclonais (HAINES; CLARK; DUBOVI, 1992). Outra vantagem da IHQ é a leitura em microscópio óptico convencional. No entanto, essa técnica exige conhecimento prévio de histologia e de histopatologia, área física adequada e equipamentos apropriados para a execução com segurança, como capela de exaustão.

A titulação dos anticorpos primários e secundários é imprescindível para determinação da diluição ideal a ser aplicada no teste, uma vez que anticorpos policlonais podem reconhecer diferentes determinantes antigênicos em antígenos multivalentes (FREITAS et al., 2006), em concordância com Boenisch (2001) que afirma que o ótimo título de anticorpo pode ser definido como a mais alta diluição que resulta na coloração específica máxima com a

menor quantidade de ruídos ou reações de fundo nas condições definidas de teste. Nas nossas condições experimentais, os títulos de 1:3000 e 1:2500 do anticorpo primário e anticorpo secundário apresentaram, respectivamente, uma marcação considerada ideal, pela distinção entre positivo e negativo e pela redução acentuada da coloração de fundo (FIGURA 3).

As lesões microscópicas que demonstramos pela técnica de IHQ em tecidos linfóides e não-linfóides positivos foram caracterizadas pela presença de histiócitos marcados principalmente no citoplasma, sendo os linfonodos os apresentaram melhor intensidade de marcação classificada como forte (+++) (FIGURA 2). Esses dados são concordantes com Rovira e colaboradores (2002), que afirmou que as lesões microscópicas de suínos com suspeita de SMDS podem ser encontradas em diferentes órgãos, embora as mais características ocorram nos órgãos linfóides. Os dados obtidos também corroboram os de West e colaboradores (1999), que, aplicando a IHQ, demonstraram a presença de antígenos virais nos centros germinativos dos linfonodos de suínos com infecções subclínicas.

Nas amostras de tecidos de suínos, naturalmente infectados com CVS-2, as alterações histopatológicas características da doença, como a ausência de folículos linfóides, a redução acentuada de linfócitos, a proliferação de histiócitos e a presença de antígenos virais, nessas lesões, foram evidenciadas pela IHQ implementada (FIGURA 2).

Embora outras técnicas moleculares possam ser aplicadas na demonstração da presença do CVS-2, como a ampliação do genoma viral pela reação da cadeia de polimerase (PCR), a IHQ ainda é considerada a técnica de eleição para esse diagnóstico, pois demonstra a presença no vírus dentro das lesões ocasionadas pela SMDS, uma vez que a infecção pelo CVS-2 não implica necessariamente a existência da SMDS no plantel (HARDING, 2004; SEGALÉS; ALLAN; DOMINGO, 2005). McNeilly e colaboradores (2002), avaliando técnicas para o diagnóstico de Circovírus, afirmaram que o exame de tecidos

de suínos normais e doentes indicou que a IHQ, o isolamento viral quantitativo e o ELISA de captura permitiram diferenciar infecções clínicas e subclínicas. Entretanto, a aplicação do PCR não permitiu essa diferenciação. Uma vez que a infecção subclínica é muito comum entre os suínos, os autores não recomendam a aplicação do PCR tradicional para esse fim.

Os resultados da implementação da técnica de IHQ para a demonstração do CVS-2 em diferentes tecidos de suínos, foram corroborados pelo histórico das amostras de campo e pela HIS. Isso nos permite concluir que a IHQ, dentro das condições trabalhadas, pode e deve ser aplicada em conjunto com a histopatologia, no diagnóstico de rotina do CVS-2 e, conseqüentemente, auxiliar no diagnóstico e controle da SMDS.

Implementation of immune-histochemical (IHC) technique applied to diagnostic of porcine circovirus type-2 antigen in swine tissues

Abstract

Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) is a non-enveloped circular single stranded DNA virus classified in the Circoviridae family, which is related to the development of post weaning multi systemic wasting syndrome (PMWS) in piglets. The PMWS is an emergent, multi-factorial illness of cosmopolitan distribution. PMWS clinical signals are unspecific and diagnosis involves also compatible findings of necropsy with identification of PMWS injuries must to be corroborated by demonstration of viral nucleic acid and/or antigen inside the lesions by hybridization "In Situ" (HIS) or of Immune-Histochemical (IHC) techniques, respectively. IHC technique allows the demonstration of viral antigen in situ using specific antibodies and antibody-conjugate. Implementation of IHC for PCV-2 diagnosis was carried out applying polyclonal antibody against PCV-2 in 23 blocks of histological sections, set with formalin-fixed and absorbed in paraffin filmstrip previously determined as positive or negative for the PCV-2. Previous histological analysis showed that positive tissues had characteristic PMWS lesions. HIS showed the presence of PCV-2 genome in tissue lesions. The implemented IHC was validated in 16 blocks containing three to four paraffin blocks, ranging of 48 to 64 tissue samples from swine with clinical suspicion of PMWS of which ten blocks (around 40 samples tissue samples) were confirmed by the analysis of virus genome. The results obtained by the IHC implementation demonstrated the presence of PCV-2 antigens in histological lesions compatible with the illness. IHC is successfully applied at PCV-2 surveys in swine from diverse Brazilian farms where is established the suspicion of PMWS occurrence.

Keywords: Porcine circovirus type-2 - Immune histochemical - Diagnosis.

REFERÊNCIAS

ALLAN, G.M. et al. Demonstration of bovine virus diarrhoea virus antigen in formalin fixed paraffin embedded tissue using a streptavidin/biotin technique. *Res. Vet. Sci.*, London, v.46, p.416-418, 1989.

BARBOSA, C.N. et al. Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.60, n.4, p.815-820, 2008.

BOENISCH, T. Antibodies. In: _____ (Ed.) *Handbook [on] immunochemical staining methods*. 3rded. Carpinteria, CA: Dako Cytomation, 2001. p.5-11.

CHIANINI, F. et al. Immuno-histochemical characterisation of PCV2 associated lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Immunol. Immunopathol*, Amsterdam, v.82, p.245-255, 2001.

- FREITAS, T.R.P. et al. **Conceitos básicos, métodos e técnicas em laboratório de virologia animal: imunologia**. Pedro Leopoldo: Tavares Ed., 2006.
- GIMENO, E.J. Fundamentos de imunohistoquímica aplicada à patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG/UFV/CBP, 1995. p.17-51.
- HAINES, D.M.; CLARK, E.G.; DUBOVI, E.J. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Vet. Pathol.**, Middleton., v.29, p.27-32, 1992.
- HARDING, J.C. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.98, n.2, p.131-135, 2004.
- HONIG, A. et al. Immunohistochemistry in human placental tissue: pitfalls of antigen detection. **J. Histochem. Cytochem.**, New York, v.53, n.11, p.1413-1420, 2005.
- KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with Korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v.128, p.52-59, 2003.
- LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institutes of Pathology**. 3rd.ed. New York: Mc Graw-Hill, 1968.
- McNEILLY, F. et al. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.80, p.123-128, 1999.
- McNEILLY, F. et al. Evaluation of a porcine circovirus type 2-specific antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs: comparison with virus isolation, immunohistochemistry, and the polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.14, p.106-112, 2002.
- ROSELL, C. et al. Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool., v.120, p.59-78, 1999.
- ROVIRA, A. et al. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. **J. Virology**, Washington, DC, v.76, n.7, p.3232-3239, 2002.
- SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Anim. Health Res. Rev.**, Wallingford, v.6, p.119-142, 2005.
- SORDEN, S.D. et al. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 circovirus in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.11, p.528-530, 1999.
- WEST, K.H. et al. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus type 2. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v.11, p.530-532, 1999.

Agradecimentos

Agradecemos a gentil colaboração do Professor Joaquim Segalés da Universidade Autônoma de Barcelona, Espanha, na doação de amostras-controle, e à equipe do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves – CNPSA/EMBRAPA (SC) pelo fornecimento de amostras de suínos do plantel SPF. Esse trabalho teve o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Recebido em / Received: 23/09/2008
Aceito em / Accepted: 26/11/2008