

DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 2 EM BEXIGAS DE BOVINOS COM HEMATÚRIA ENZOÓTICA PELA TÉCNICA DE REACÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE NO SUL DO ESPÍRITO SANTO, BRASIL*

Jacques D.C.Dias¹⁺, Mariana D.C. Ignacchiti², Patrícia G.G. Giuriato³,
Louisiane de C. Nunes⁴ e Olavo dos S. Pereira Júnior⁵

ABSTRACT. Dias J.D.C., Ignacchiti M.D.C., Giuriato P.G.G., Nunes L. de C. & Pereira Jr O. dos S. 2010. [Detection bovine papillomavirus type 2 in bladders of bovines with enzootic hematuria by technique of polymerase chain reaction in the south of Espírito Santo, Brazil]. Detecção do papilomavírus bovino tipo 2 em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica pela técnica de reação em cadeia de polimerase no sul do Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(2):146-151, 2012. Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000, Brasil. E-mail: jacquestrompete@yahoo.com.br

The objective of this study was to evaluate the presence of bovine papillomavirus type 2 in bladders of bovines with enzootic hematuria by technique of polymerase chain reaction in the south of Espírito Santo, Brazil. Fifty bladders from bovines with gross lesions were collected, each bladder being divided into four quadrants, identified as A, B, C and D, for histopathologic evaluation, totalizing 200 samples. The samples were characterized macroscopically and divided into two fragments, one for histopathological analysis and the other for PCR. The PCR was only performed in samples with neoplastic lesions confirmed by microscopy. Histopathologic analysis showed five samples positive for neoplasm (2.5%). The presence of bovine papillomavirus type 2 in all neoplastic lesions of the urinary bladder of cattle was confirmed by PCR, and reinforces the hypothesis of the relationship between the presence of viral agent, the plant and the development of neoplastic lesions in the bladders of cattle with bovine enzootic hematuria (HEB).

KEY WORDS. BPV-2, PCR, neoplasm, bladder, bovine.

RESUMO: Objetivou-se com este estudo detectar a presença do papilomavírus tipo 2 em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica pela técnica de reação em cadeia de polimerase no sul do Espírito Santo. Para isso foram coletadas 50 bexigas de bovinos que apresentaram lesões macroscópicas, sendo cada uma dividida em quatro quadrantes, identificados como A, B, C e D, para avaliação histopa-

tológica, totalizando 200 amostras. As amostras foram caracterizadas macroscopicamente e divididas em dois fragmentos, um para análise histopatológica e outro para PCR. A PCR só foi realizada nas amostras com lesões neoplásicas confirmadas pela microscopia. A análise histopatológica revelou cinco amostras positivas para neoplasia (2,5%). A presença do papilomavírus bovino tipo 2 em todas

*Recebido em 10 de agosto de 2011.

Aceito para publicação em 28 de fevereiro de 2012.

¹ Mestre em Ciências Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES), Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: jacquestrompete@yahoo.com.br

² Doutora em Ciências e Pós-Doutoranda, CCA/UFES), Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000.

³ Médica-veterinária, CCA/UFES, Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000.

⁴ Doutorado em Medicina Veterinária, Professora Adjunto III, Departamento de Medicina Veterinária, CCA/UFES, Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000.

⁵ Doutor em Bioquímica, Professor Adjunto e Chefe do Departamento de Zootecnia, CCA/UFES, Alto Universitário, s/n, Alegre, ES 29500-000.

as lesões neoplásicas de bexiga de bovino, foi confirmada pela técnica de PCR e reforça a hipótese da relação entre a presença do agente viral, a planta e o desenvolvimento de lesões neoplásicas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica bovina (HEB).

PALAVRAS-CHAVE. BPV-2, PCR, neoplasias, bexiga, bovino.

INTRODUÇÃO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma das formas clínicas da intoxicação crônica causada pelo consumo da espécie vegetal (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn), variedade *Arachnoideum*, conhecida comumente por samambaia, samambaia-do-campo, samambaia-das-taperas, pluma ou pluma-grande, pertencente à família *Polypodiaceae* (Tokarnia et al. 2000).

Segundo Silva et al. (2009) a samambaia é abundante na microrregião do Caparaó, sul do Espírito Santo e a prevalência de HEB em bovinos leiteiros nesta região é bastante elevada (56,4%) quando comparada com outros estados do Brasil. O grande número de animais que apresentam esta doença tem levado os produtores a consideráveis perdas econômicas e a descartar precocemente os animais utilizados em criações leiteiras, enviando-os para o matadouro frigorífico. Não existem relatos até o momento da presença do papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) em bovinos com hematúria enzoótica no sul do Estado do Espírito Santo.

Entretanto, Campo et al. (1992) relataram que *P. aquilinum* possui vários princípios carcinogênicos, mutagênicos e imunossupressores, podendo causar diferentes neoplasmas na bexiga.

De acordo com Moreira-Souto et al. (2006), o diagnóstico de HEB é estabelecido com base na epidemiologia, sinais clínicos e nas lesões macroscópicas e microscópicas da bexiga. A co-carcinogenicidade, que é a correlação entre o BPV-2 e os princípios tóxicos da samambaia, tem sido implicada na etiologia da HEB (Campo et al. 1992, Campo 2002, Wosiacki et al. 2005).

De acordo com Wosiacki (2002) e Wosiacki et al. (2006) as relações entre o BPV-2 e os tumores de bexiga em bovinos já estão documentadas. No entanto, o envolvimento viral na etiologia da HEB ainda tem sido pouco estudado. Algumas evidências epidemiológicas sugerem que haja progressão das lesões da bexiga em relação à malignidade e que isto é dependente de inter-relações entre o papilomavírus e os compostos químicos da samambaia.

Objetivou-se com este estudo detectar a presença do papilomavírus tipo 2 em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica pela técnica de reação em cadeia de polimerase no sul do Espírito Santo.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e coleta da amostra. As 50 bexigas bovinas utilizadas nas análises foram provenientes de uma seleção de 131, coletadas no matadouro frigorífico do município de Muniz Freire, Estado do Espírito Santo. As bexigas foram selecionadas quanto à presença de lesões macroscópicas, caracterizadas por hemorragias difusas ou focais, lesões verrucosas ou hemangiomas, lesões ulceradas, dentre outras. As bexigas foram analisadas, no próprio matadouro, por meio da abertura pela face ventral, no sentido caudo-cranial, com corte que se iniciava da base (uretra) até ao fundo (cicatriz do úraco) para observação da mucosa e confirmação da lesão. As que apresentaram lesões foram embaladas individualmente e identificadas com o número de abate e do lote, acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (HOVET/CCA-UFES). No laboratório, as bexigas foram divididas em quatro quadrantes: A e B (superior), C e D (inferior), totalizando 200 amostras. De cada quadrante foram retirados dois fragmentos, de aproximadamente 4 cm, sendo um destinado à análise por meio da PCR e o outro para o processamento histopatológico. Para a PCR, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e acondicionadas no freezer a -20°C . Para a histopatologia, as amostras foram colocadas em cassetes plásticos, identificadas e fixadas em solução de formalina a 10%.

Análise histopatológica. O material fixado foi submetido ao processamento histológico que consistiu na desidratação (álcool absoluto), diafanização (xilol absoluto) e inclusão em parafina histológica. Em seguida, as amostras foram submetidas à microtomia em micrótomo rotativo manual para a secção de cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura que foram depositados em lâminas histológicas e corados pelo método Hematoxilina-Eosina (Luna 1968). A avaliação histopatológica serviu de parâmetro para a realização das reações de PCR.

Reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se para PCR somente as amostras que apre-

sentaram lesões neoplásicas malignas ou benignas. Como controle negativo foram utilizadas cinco bexigas sem a presença de lesões macroscópicas coletadas no mesmo matadouro frigorífico.

Para a obtenção do DNA genômico (DNAg), aproximadamente 100 mg de cada amostra (neoplásica e controle) foi previamente pulverizada, com o auxílio de nitrogênio líquido, e submetida a extração com auxílio de método de CTAB/NaCl, seguido de extração fenólica, conforme Sambrook et al. (1989). Após a extração, o material foi ressuspensão em 30µL de água deionizada estéril e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Em tubo de poliestireno estéril de 200µL foi adicionado à mistura reacional para um volume final de 50µL, os seguintes componentes: 10µL de tampão da enzima Taq DNA Polimerase (5x), 1,5 µL MgCl₂ (50mM), 1,0µL dos oligoiniciadores específicos descritos por Wosiacki (2002), *BPVCON 5'-TGTTCCCAAAGTGTCTG-3'* e o *BPV2 5'ATTC-TAAAGGAGGACACG-3'* (10mM), 1,0µL dNTPs (10mM), 5hg de DNAg e 0,5µL Taq DNA Polimerase (500 unidades/mL) e água deionizada estéril para completar o volume. Os oligoiniciadores utilizados neste estudo direcionam a amplificação de um fragmento específico de 386 pares de bases.

Em seguida, a mistura reacional foi incubada em termociclador de acordo com a seguinte estratégia de amplificação: desnaturação inicial de 94°C por três minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto; emparelhamento dos oligonucleotídeos iniciadores por 1 minuto e meio a 45°C; e extensão final a 72°C por 1 minuto e meio. A qualidade da reação foi avaliada em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e observada em luz UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais abatidos eram procedentes das cidades de Irupi-ES, Guaçuí-ES, Muniz Freire-ES, Alegre-ES e Mutum-MG. No total foram acompanhados os abates de 131 animais, sendo examinadas todas as bexigas para verificação de lesões macroscópicas, conforme descrito na Tabela 1.

Evans (1986), Polack (1990), Tokarnia et al. (2000) destacaram que a samambaia da espécie *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn é comum em regiões com características montanhosas, como o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, áreas dos estados do Amazonas, Acre, Mato Grosso, Pernambuco, São Paulo, norte do Paraná, Minas Gerais e Espíri-

Tabela 1. Achados Macroscópicos em Bexigas.

Localidades	Animais	Bexigas com Lesões Macroscópicas
Alegre-ES	20	10 (50%)
Irupi-ES	39	17 (43,6%)
Muniz Freire-ES	25	07 (28%)
Guaçuí-ES	20	06 (30%)
Mutum-MG	27	10 (37%)
Total	131	50 (38%)

to Santo. Com relação à abrangência deste estudo, Silva et al. (2009) verificaram a presença dessa samambaia nos dez municípios que compõem a microrregião do Caparaó, ES, sul do Espírito Santo: Alegre, Guaçuí, Divino de São Lourenço, Muniz Freire, Iúna, Ibatiba, Ibitirama, Irupi, Dores do Rio Preto e São José do Calçado.

Price & Pamucku (1968) relataram que a HEB pode ser caracterizada por neoplasias e hemorragias na parede da bexiga. Tokarnia et al. (2000) realizaram avaliação macroscópica em bovinos com HEB e demonstraram que as lesões variam desde nódulos de alguns milímetros até aqueles com aspecto de couve-flor de vários centímetros de diâmetro, podendo apresentar colorações branco-amarelada ou avermelhada, focos de hemorragia e crescimentos vasculares. De acordo com estes mesmos autores, nos casos mais graves, pode haver espessamento da parede vesical. Peixoto et al. (2003) e Gabriel et al. (2009) também descreveram que bovinos com HEB apresentam uma diversidade de lesões vesicais.

As neoplasias encontradas em bovinos com HEB podem ter origem tanto epitelial quanto mesenquimal e raramente geram metástases. Outro fato é que as alterações neoplásicas nem sempre estão envolvidas diretamente com a hematúria, e sim com a presença de congestão e ectasia de vasos sanguíneos (Tokarnia et al. 2000). Este fato foi também observado neste estudo, onde as lesões hemorrágicas variando desde petéquias até equimoses prevaleceram, demonstrando que nem sempre o que causa necessariamente a hematúria no bovino são lesões neoplásicas e sim as lesões vasculares. Estudos realizados por Souza & Graça (1993) no Estado do Rio Grande do Sul revelaram que em 18 animais com HEB, 10 (55,5%) apresentaram tumores na bexiga e hematúria intermitente ou constante. Apenas uma (5,5%) bexiga apresentou lesão papilomatosa e as demais demonstraram focos hemorrágicos e ulcerações na mucosa.

Em nosso estudo, dentre as lesões observadas, prevaleceram às hemorragias petequiais ou equimóticas focais ou difusas em 86% das amostras

(43/50) seguidas das lesões hemangiomas em 26% (13/50) e lesões papilomatosas em 4% (02/50). Essas lesões foram encontradas, principalmente nos quadrantes inferiores (porção caudal das bexigas) conforme apresentado na tabela 2.

Pensa-se que a maior frequência de lesões nessa porção bexiga, possa ser devido ao maior tempo de armazenamento de urina neste local. Entretanto, Moore & Persaud (2000) e Murphy et al. (2004) verificaram que o local de maior incidência para as lesões ainda não está totalmente elucidado. Porém, Gabriel et al. (2009) avaliaram as lesões em bexiga de animais com HEB e verificaram que a maioria das lesões foram encontradas na região do triângulo vesical, e em alguns casos, nos linfonodos da cavidade pélvica, corroborando com nossos achados.

As avaliações histopatológicas revelaram que, das 200 amostras analisadas, cinco apresentaram neoplasias (2,5%), sendo três carcinomas de célula de transição, dois hemangiossarcomas, um adenoma cístico, um hemangioma cavernoso (Tabela 3).

Souza & Graça (1993) no RS encontraram resultados histopatológicos semelhantes ao deste estudo, sendo que em bexigas de 18 animais com HEB, nove apresentaram hemangiomas, uma com hemangiossarcoma, uma com carcinoma e uma com papiloma. As demais bexigas estudadas tiveram relação com carcinomas do trato alimentar superior.

Oliveira (2009) verificou que as principais neoplasias observadas em animais com HEB são os tumores vasculares (81,5%). Em 12,5% das neoplasias foram encontrados carcinomas uroteliais, e em uma bexiga somente proliferações vasculares hiperplásicas e acentuada hemorragia na lâmina própria. Estudos anteriores demonstraram que a hematúria pode estar associada apenas a alterações inflamatórias

Tabela 2. Distribuição anatômica das lesões macroscópicas nos quadrantes da bexiga.

Quadrantes Superiores		
A	10/50	20%
B	14/50	28%
Quadrantes Inferiores		
C	42/50	84%
D	34/50	68%

Tabela 3. Classificação histomorfológica dos tumores de bexiga urinária de bovinos com HEB provenientes do matadouro frigorífico de Muniz Freire-ES, entre setembro e novembro de 2009.

Animal	Lesão microscópica da bexiga urinária	
	Benignas	Malignas
P104/09	Adenoma cístico	-
P114/09	-	Carcinoma de células de transição
P123/09	-	Hemangiossarcoma
P129/09	-	Carcinoma de células de transição Hemangiossarcoma
P199/09	Hemangioma cavernoso	Carcinoma de células de transição

rias e vasculares, não-neoplásicas (Tokarnia et al. 2000). Murphy et al. (2004) explicaram que mesmo pequenas lesões que resultem em perda de células uroteliais podem causar sangramento devido à presença de pequenos vasos justapostos à camada basal do urotélio.

Com relação às análises moleculares, o par de oligos utilizados nesse estudo foi utilizado para amplificar um fragmento de 386 pb proveniente do BPV-2 (Wosiacki 2002). Após a reação da PCR todas as amostras neoplásicas se mostraram positivas para BPV-2 como observado na (Figura 1A). Com relação ao controle negativo, não foi visualizado a amplificação de nenhum fragmento (Figura 1B). Vale ressaltar que as amostras utilizadas como controle negativo foram provenientes de animais das mesmas regiões, coletadas aleatoriamente, e submetidas às mesmas condições de manejo e pasto-

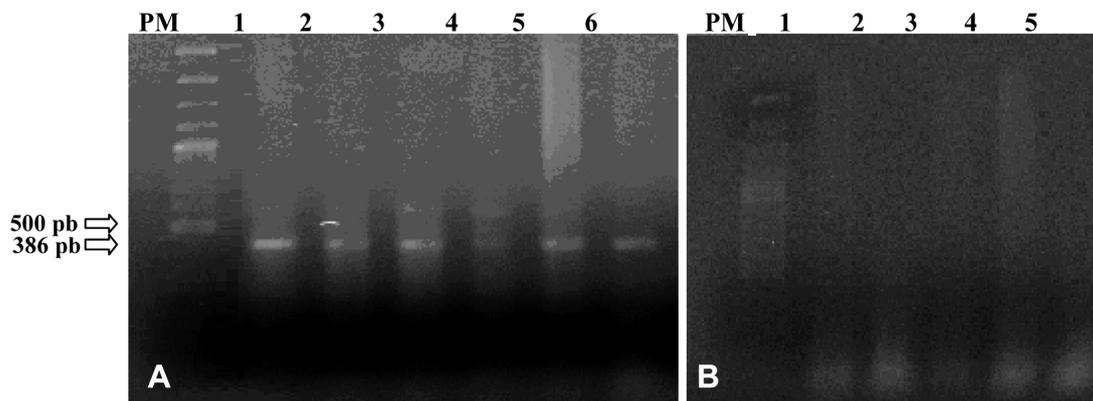


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo, mostrando os resultados da PCR, para o vírus do Papilomavírus Bovino Tipo 2 (BPV2). PM – Padrão do peso molecular de 100pb. A. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 Amostras com neoplasias positivas para BPV-2 (fragmento de 386 pb). B. 1, 2, 3, 4 e 5 – Amostras negativas para BPV-2.

reio, porém sem presença de lesões macroscópicas. Todas as cinco amostras avaliadas foram negativas à presença do vírus pela PCR.

Mesmo com a pequena quantidade de lesões neoplásicas foi possível identificar a presença viral em todas as amostras, utilizando a técnica de PCR. Estes dados reforçam a hipótese de que o BPV-2 pode participar diretamente da etiologia da HEB. De acordo com Wosiacki (2002) os avanços nos métodos de análise molecular vêm tornando possível o diagnóstico da infecção pelo papilomavírus a partir da identificação do genoma viral por técnicas de hibridação molecular ou pela PCR. Outras técnicas convencionais como a citologia, a histopatologia e a imunistoquímica também podem ser utilizadas, porém com menor sensibilidade e, em algumas situações, com demora para a obtenção dos resultados.

A primeira detecção do DNA deste vírus, em tumores de bexiga, foi descrita por Campo (1987), onde foi observada a presença do vírus em lesões naturais e induzidas, sugerindo a sua relação com a formação dos tumores.

Hopkins (1986) relatou a atividade do vírus BPV-2 em casos de HEB pela sua provável associação com os princípios tóxicos da samambaia. No entanto, Borzacchiello et al. (2001), afirmaram que isto ocorre devido ao processo de imunossupressão sofrido pelo animal durante a fase de intoxicação pela samambaia que pode induzir uma maior agilidade do BPV-2 e, conseqüentemente, o desenvolvimento de lesões neoplásicas mais graves na bexiga. Campo et al. (1992) comprovaram esses dados por meio de um estudo onde o DNA do BPV-2 foi detectado em 46% nos casos naturais de tumores e 69% nas lesões induzidas experimentalmente, indicando a associação entre o vírus e as neoplasias, em bexiga de bovino.

Oliveira (2009), com auxílio da técnica de PCR, detectou 80% de amostras de bexiga positivas para BPV-2, com presença de lesões macroscópicas expressivas e verrugosas, sendo que todos os animais eram provenientes de regiões com elevada presença de samambaia.

CONCLUSÕES

A presença do papilomavírus bovino tipo 2 nas lesões neoplásicas de bexiga urinária de bovinos, confirmada pela técnica de PCR, reforça a hipótese da relação entre a presença do agente viral, a planta e o desenvolvimento de lesões neoplásicas em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica bovina (HEB) no sul do Espírito Santo.

Agradecimentos. Agradeço ao proprietário do matadouro frigorífico do município Muniz Freire, ES, por ter permitido a realização dessa pesquisa, e a Fapes e ao CNPq pelo apoio realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borzacchiello G., Ambrosio V., Galati P., Poggiali A., Venuti A. & Roperto F. The pagetoid variant of urothelial carcinoma *in situ* of urinary bladder in a cow. *Vet. Pathol.*, 38:113-116, 2001.
- Campo M.S. Papillomas and cancer in cattle. *Cancer Surv.*, 6:39-54, 1987.
- Campo M.S., Jarret W.F.H., Barron R., O'Neil B.W. & Smith K.T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res.*, 52: 6898-6904, 1992.
- Campo M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.*, 89:249-261, 2002.
- Evans I.A. The carcinogenic, mutagenic and teratogenic toxicity of bracken, p.139-146. In: Smith L.T. & Taylor J.A. (Eds), *Bracken, ecology, land use and control technology*. Carnforth, *Parthenon Publishing Group*, 1986.
- Gabriel A.L., Kommers G.D., Masuda E.K., Rafael A., Figueira R.A., Piazer J.V.M., Barros C.S.L., Martins T.B. & Rosa F.B. Aspectos clínico-hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos *Pesq. Vet. Bras.*, 29:515-525, 2009.
- Hopkins N.C.G. Aetiology of enzootic haematuria. *Vet. Rec.*, 118:715-717, 1986.
- Luna L.G. *Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. MacGraw Hill, Washington, 1968. 258p.
- Moore K.L. & Persaud T.N.V. Sistema urogenital, p. 290-331. In: Moore K.L. & Persaud T.V.N. *Embriologia clínica*. 6ª ed. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, 2000.
- Moreira-Souto M.A., Kommers G.D., Barros C.S.L., Rech R.R. & Piazer J.V.M. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica. *Cienc. Rur.*, 36:1647-1650, 2006.
- Murphy W.M., Grignon D.J. & Perlman E.J. Tumors of the urinary bladder and related urinary bladder, p.241-351. In: Murphy W.M., Grignon D.J. & Perlman E.J. (Eds), *Tumors of the kidney, bladder and related urinary structures*. 4ª ed. *American Registry of Pathology*, Washington, 2004.
- Oliveira L.G.P. *Novos Aspectos Patológicos e Patogenéticos da Hematúria Enzoótica Bovina*. Dissertação, UFRRJ, 2009.
- Peixoto P.V., França T.N., Barros C.S.L. & Tokarnia H.C. Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 23:65-81, 2003.
- Polack E.W. *Toxicidade da Pteridium aquilinum no Estado do Paraná, Curitiba*. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 1990. 102f.
- Price J.M. & Pamucku A.M. The induction of neoplasms of the urinary bladder of the cow and the small intestine of the rat by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). *Cancer Res.*, 28:2247-2251, 1968.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989. 956p.

- Silva M.A., Scárdua C.M., Dórea M.D., Nunes L.C., Martins I.V.F. & Donatele D.M. Prevalência de hematúria enzoótica bovina em rebanhos leiteiros na microrregião do Caparaó, Sul do Espírito Santo, entre 2007 e 2008 *Cienc. Rur.*, 39:1847-1850, 2009.
- Souza M.V. & Graça D.L. Intoxicação crônica por *P. aquilinum* (L.) Kuhn (Polypodiaceae) em bovinos. *Cienc. Rur.*, 23:203-207, 1993.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. & Peixoto P.V. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, 2000. 320p.
- Wosiacki S.R. *Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico*. Dissertação de Mestrado em Sanidade Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002. 114f.
- Wosiacki S.R., Barreiros M.A.B., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J. Virol. Method.*, 126:215-219, 2005.
- Wosiacki S.R., Claus M.P., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101:635-638, 2006.