

Raquel Lopes Hungueri dos Santos.

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA VIRAL CONVENCIONAL
CONTRA A CIRCOVIROSE SUÍNA EM LEITÕES
SOB CONDIÇÕES DE CAMPO NO BRASIL.**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Patologia Veterinária.

Orientador: Prof. Roberto Maurício Carvalho Guedes.

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2014

Santos, Raquel Lopes Hungueri dos, 1983-
S237a Avaliação da eficácia da vacina viral convencional contra a circovirose suína em leitões sob condições de campo no Brasil / Raquel Lopes Hungueri dos Santos. – 2014.

50 p. : il.

Orientador: Roberto Maurício Carvalho Guedes
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Suíno – Doenças – Teses. 2. Virose em animais – Teses. 3. Vacina veterinária – Teses. I. Guedes, Roberto Maurício Carvalho. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.408 96

**Dissertação defendida e aprovada em 24 de Fevereiro de 2010, pela Comissão
Examinadora constituída por:**

Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes.

Dr. Ernane Fagundes do Nascimento.

Dr. José Lúcio dos Santos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me amparar diante de todo e qualquer desafio e dificuldade, por mais intransponível que pudesse parecer.

Aos meus pais sou eternamente grata pelo apoio incondicional às minhas escolhas e, sobretudo, nos momentos mais difíceis dessa jornada!

As minha irmãs Yone, Valéria e Elisa pela enorme compreensão das minhas constantes ausências! As minhas sobrinhas queridas Júlia, Isabela, Sara, Amanda, Ana Clara, Sophia e Isadora. Amo demais todas vocês!

Ao Westinho pelo carinho, amor e compreensão! Obrigada amor por permanecer sempre ao meu lado!

Aos meus sogros pelo incentivo. Em especial à minha sogra Marlúcia que segurou em minhas mãos e me ajudou a persistir.

Ao Professor Roberto Guedes, orientador, pelos ensinamentos, dedicação, apoio e paciência.

A professora Zélia Lobato, co-orientadora, pelo carinho, atenção e por ceder o Laboratório de Virologia EV-UFGM para realização dos testes sorológicos.

Aos professores do Setor de Patologia Veterinária, pelos ensinamentos durante as disciplinas do curso e pelo grau de exigência.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Veterinária: Sílvia França, Ana Patrícia, Juliana Saes, Juliana Paniago, Jankerle, Juneo, Ana Luiza, Theane, Valéria, Eduardo Coulaud e Custódio pela convivência, brincadeiras e companheirismo!

Aos Médicos veterinários da Integrall®, Glauber Machado, Roniê Pinheiro e, em especial, à Djane Dallanora e seu marido Alexandre pela imensa ajuda e apoio durante o período experimental.

A empresa Merial Saúde Animal Ltda ® e ao Dr. Edson Luiz Bordin por patrocinar e proporcionar todos os elementos necessários para realização do experimento.

A toda Família Schoeler por cederem a Granja Schoeler em Itapiranga-SC. Em especial, a Liliam Schoeler pela amizade. Guardo por você um grande e eterno carinho!

Aos meus amigos, que sempre torcem pelo meu sucesso!

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

*Ninguém é suficientemente
perfeito, que não possa
aprender com o outro e,
ninguém é totalmente
destituído de valores que não
possa ensinar algo ao seu
irmão.*
São Francisco de Assis

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	11
2.1 Caracterização e patogênese do Circovírus suíno tipo 2	11
2.1.1 Família <i>Circoviridae</i>	11
2.1.2 Genoma e proteínas virais	11
2.1.3 Importação viral	12
2.1.4 Replicação viral	12
2.1.5 Interação entre células e vírus.....	13
2.1.6 Efeitos imunopatológicos	14
2.2 Transmissão	15
2.3 Quadros patológicos relacionados ao Circovírus suíno tipo 2.....	15
2.3.1 Síndrome de refugagem pós-desmame (SRPD)	15
2.3.2 Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS).....	16
2.3.3 Falhas reprodutivas.....	17
2.3.4 Complexo da doença respiratória suína (CDRS)	17
2.3.5 Pneumonia necrosante proliferativa (PNP)	17
2.3.6 Tremor Congênito (TC).....	18
2.3.7 Enteropatias	18
2.4 Diagnóstico	18
2.5 Controle	19
2.5.1 Recomendações de Madec.....	19
2.5.2 Efeito da leitegada	19
2.5.3 Resistência racial	19
2.5.4 Plasma suíno.....	19
2.5.5 Vacinação	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Seleção dos animais	21
3.2 Tratamento experimental	21
3.3 Avaliação da segurança.....	21
3.4 Avaliação da eficácia	22
3.4.1 Indicadores de eficácia primários	22
3.4.2 Indicadores de eficácia secundários.....	23
3.5 Avaliação sorológica	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Avaliação da segurança.....	24
4.2 Avaliação da eficácia	24
4.2.1 Indicadores de eficácia primários	24

4.2.2 Indicadores de eficácia secundários.....	32
4.3 Avaliação sorológica.....	34
4.3.1 Perfil sorológico.....	34
4.3.2 Sorologia nos grupos experimentais.....	35
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Animais selecionados para avaliação da segurança vacinal.....	22
Tabela 2 – Peso médio na saída da creche e final de acabamento.....	24
Tabela 3 – Média de ganho de peso diário médio na saída da creche e final de acabamento.....	25
Tabela 4 – Taxa de refugagem (%) na creche e terminação.....	25
Tabela 5 – Taxa de mortalidade (%) na creche e terminação.....	25
Tabela 6 – Frequência das principais alterações macroscópicas.....	27
Tabela 7 – Frequência das principais lesões histopatológicas.....	30
Tabela 8 – Índice de tosse, espisso e diarreia.....	33
Tabela 9 – Número de médio de animais medicados por dia de aplicação.....	33
Tabela 10 – Área e frequência de pneumonia.....	34
Tabela 11 – Média de títulos de anticorpos anti-PCV-2 obtidos por faixa etária*.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lesões macroscópicas de circovirose observadas nos leitões.....	28
Figura 2: Lesões histopatológicas da circovirose.....	31
Figura 3: Linfonodo: Circovirose suína – Imuno-histoquímica.....	32
Figura 4 – Perfil sorológico da granja.....	34
Figura 5 – Média de título de anticorpos obtidos nas fêmeas*.....	35
Figura 6 – Perfil sorológico das fêmeas.....	36
Figura 7 – Média de título de anticorpos obtidos nos machos*.....	36
Figura 8 – Perfil sorológico dos machos.....	37

RESUMO

Investigou-se os efeitos da aplicação de uma vacina viral convencional contra Círcovírus suíno tipo 2, em leitões ao desmame. Um total de 1.140 leitões, entre machos e fêmeas, foram separados aleatoriamente em dois grupos: vacinado (dose única de 0,5ml da vacina) e controle (não vacinado). Os animais foram acompanhados desde a aplicação do tratamento experimental até a fase final de acabamento. A aplicação da vacina não demonstrou qualquer efeito adverso significativo. Os machos vacinados, comparados aos machos do grupo controle, apresentaram um maior peso corporal ao abate de 2,73Kg ($p=0,029$) e um maior ganho de peso diário de 0,025Kg ($p=0,027$). Nas fêmeas, os mesmos resultados não apresentaram diferença significativa entre o grupo controle e vacinado, entretanto havia um maior peso corporal final de 1,50Kg ($p=0,07$) nas fêmeas vacinadas. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto a taxa de mortalidade e refugagem, índices de tosse, espirro e diarreia, uso de medicamentos, índice de pneumonia, lesões anatomopatológicas e histopatológicas, e titulação de anticorpos. Esses dados indicam que a vacinação contra PCV-2 é segura e eficaz na melhoria do peso final e ganho de peso diário em leitões machos vacinados sob condições de campo no Brasil.

Palavras chave: Círcovírus suíno tipo 2, vacina, leitão, segurança vacinal, eficácia vacinal

ABSTRACT

The effects of implementing a fully viral and conventional vaccine against porcine circovirus type 2 in pigs at weaning were studied. A total of 1140 piglets, males and females, were divided into two groups: vaccinated (single dose of 0.5 ml of vaccine) and control (not vaccinated). All animals were evaluated from the application of the experimental treatment until market. The application of the vaccine had no significant adverse effects. Vaccinated males compared to males in the control group had a higher slaughter weight of 2.73 kg ($p = 0.029$) and a higher average daily gain of 0.025 Kg ($p = 0.027$). In contrast, females had no difference in body weight or average daily gain between control and vaccination groups. However, there was a greater final body weight of 1.50 kg ($p = 0.07$) in females vaccinated compared to the control group. There was no significant difference between groups regarding mortality and culling rates, coughing, sneezing and diarrhea, medication use, pneumonia index, pathological and histopathological lesions, and antibody titration. These data indicate that vaccination against PCV-2 is safe and effective in improving the final weight and the average daily gain in piglets vaccinated under field conditions in Brazil.

Key-words: *Porcine circovirus type 2, vaccine, pig, vaccine safety, vaccine effectiveness*

1. INTRODUÇÃO

A modernização e intensificação da criação de suínos aumentaram em muito o desafio de agentes infecciosos, favorecendo o surgimento das “infecções de rebanho”, como a circovirose suína. Essa enfermidade teve seu primeiro relato em 1991, no Canadá, e desde então tem sido descrita em países produtores de suínos em todo o mundo (Harding *et al.*, 1996). No Brasil, a primeira descrição da enfermidade foi realizada em Santa Catarina por Zanella e Morés, em 2003. Nesse estudo, através de técnicas moleculares, relatou sua presença desde o ano de 1988, estando agora disseminada por todo país.

Em 2005, baseado em dados de empresas integradoras, estimou-se um impacto econômico anual de 33 milhões de reais apenas para a região Sul do Brasil (Morés, 2005). O custo desta síndrome, além das mortes, deve-se ao declínio das taxas de crescimento, piora na conversão alimentar e elevação do número de suínos refugos e/ou debilitados. Para agravar o problema, a doença provoca imunossupressão e predisposição a infecções secundárias, que não regridem com tratamentos antimicrobianos e vacinas de uso comum na suinocultura (Zanella, 2008).

Atualmente, a circovirose suína tem sido apontada como a doença de maior importância econômica nas principais áreas produtoras. O circovírus suíno tipo 2 (PCV-2), agente etiológico da circovirose suína, está associado a diversos quadros patológicos como a Síndrome da Refugagem Pós Desmame (SRPD - quadro mais comum e importante), a Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (SDNS), a Pneumonia Necrotizante Proliferativa, ao Tremor Congênito e ao Complexo da doença respiratória suína, além de falhas reprodutivas e enteropatias (Morés *et al.*, 2007). Dentre as principais medidas de controle recomendadas estão os “20 pontos de Madec”, onde são enumerados uma série de ações de desinfecção, manejo, vazio

sanitário e controle sanitário geral (Straw *et al.*, 2006). Porém, muitas destas recomendações não são seguidas em grande parte das granjas nacionais, seja por problemas estruturais ou por ausência de mão de obra capacitada. Assim sendo, na perspectiva de ampliar o controle por meio mais eficaz, vacinas tem sido desenvolvidas e testadas em várias partes do mundo. Até pouco tempo, havia no mercado dois tipos de vacinas contra PCV-2: as “autógenas” e as convencionais. As vacinas “autógenas” eram produzidas a partir de macerados de órgãos, como linfonodos, fígado, baço e pulmões de animais doentes. Porém, estas vacinas induziam respostas variadas quanto a viremia e título de anticorpos sob diferentes condições de campo (Costa *et al.*, 2007). No início de 2008, a comercialização de vacinas “autógenas” foi considerada ilegal, por não se tratar de produto devidamente aprovado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Nota Técnica nº001, 2008), o que deixou uma grande lacuna nos programas de controle da enfermidade no país.

Em julho de 2007, foi lançada no país a primeira vacina comercial contra o PCV-2, pela empresa Merial®. Essa vacina é constituída por PCV-2 íntegro inativado em adjuvante oleoso, sendo recomendada para aplicação em marrãs e porcas. Pesquisas conduzidas a campo na França, Alemanha e Canadá demonstraram diminuição do impacto da circovirose suína, oferecendo proteção ao leitão através da transferência passiva de anticorpos (Joisel *et al.*, 2007). No entanto, esta proteção por anticorpos passivos só ocorre por um tempo limitado, já que a duração da mesma pode variar segundo a qualidade e manejo do colostro, viabilidade do leitão e tamanho da leitegada (Machado e Fontes, 2003). Além disso, diferentes perfis sorológicos para PCV-2 foram observados em granjas no Brasil e indicam exposição e circulação viral diferenciada, sugerindo que a imunidade passiva, o manejo e as condições ambientais de cada granja possam influir no perfil

encontrado (Gerber *et al.*, 2009). Desta forma, existe um grande receio de que a proteção humoral passiva não seja duradoura e/ou suficiente para o controle da circovirose suína em animais da recria e terminação. Outras três vacinas convencionais de PCV-2 foram desenvolvidas em diferentes países, para uso específico em leitões, utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Atualmente, todas receberam aprovação para serem comercializadas no Brasil, mas não tem conseguido atender a enorme demanda do mercado brasileiro (Roberto Guedes, comunicação pessoal).

Devido à importância e necessidade imperativa do controle da circovirose suína, associado às características da suinocultura nacional e na restrita disponibilidade de vacinas convencionais para leitões no país, a vacina viral convencional aprovada para uso em matrizes suínas, vem sendo utilizada sem critério técnico-científico a campo para vacinação de leitões desmamados. Desta forma, faz-se necessária a avaliação científica e detalhada desta possibilidade para reduzir as perdas econômicas causadas por esta enfermidade. Para isso, avaliou-se, em nível de campo, a eficácia e a segurança da aplicação da vacina inativada contra PCV2, em dose única, em leitões recém desmamados, no controle da circovirose suína sob condições de campo no Brasil.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1 Caracterização e patogênese do Circovírus suíno tipo 2

2.1.1 Família *Circoviridae*

A família *Circoviridae* compreende dois gêneros: Gyrovirus e Circovírus. O vírus da anemia infecciosa das galinhas é o único membro do gênero Gyrovirus. Já o gênero Circovírus inclui o vírus da gripe aviária, afetando canários, psitacídeos, pombos, patos, corvos, gansos e estorninhos, bem como dois vírus de suínos: o circovírus

suíno tipo 1 (PCV-1) e o tipo 2 (PCV-2) (McNulty *et al.*, 2000). PCV-1 foi descrito em 1982 como um contaminante persistente não-citopatogênico de células PK-15 (Tischer *et al.*, 1982). Infecções experimentais indicam que PCV-1 é apatogênico para suínos, porém há uma alta prevalência de anticorpos anti-PCV-1 na população (Mateusen *et al.*, 2004). PCV-2 é um vírus pequeno (16-18nm), não envelopado e com DNA circular fita simples, sendo apontado como agente etiológico da circovirose suína (Liu *et al.*, 2006).

2.1.2 Genoma e proteínas virais

O genoma de PCV-2 é composto por um DNA de fita simples circular (single-stranded DNA ou ssDNA) de 1.759 nucleotídeos, possuindo sete janelas abertas de leitura (ORF - *open reading frames*). Porém, apenas três delas foram mais caracterizadas: ORF1, ORF2 e ORF3. A primeira codifica proteínas envolvidas na replicação viral (rep e rep') e a segunda codifica a proteína do capsídio (cap). Já ORF3 parece não ser essencial para replicação viral, mas tem sido relacionada com a patogênese viral e a apoptose. Os genes rep e cap são orientados de forma divergente no genoma, resultando numa organização ambi-senso, e ORF3 encontra-se dentro de ORF1, onde sua transcrição é invertida (Liu *et al.*, 2006).

As duas proteínas expressadas de ORF1 são necessárias na replicação viral, mas rep e rep' são produzidas de diferentes transcritos. Análises filogenéticas sugerem que as proteínas rep de Circovírus evoluíram por eventos de recombinação entre a proteína rep de Nanovírus e uma proteína ligadora de RNA, codificada por vírus semelhante a Picornavírus ou uma helicase de origem procariótica (Gibbs e Weiller, 1999).

Cap é o principal determinante antigênico viral e tem sido demonstrado ser um marcador filogenético seguro para PCV-

2. Após sua tradução, o N-terminal é rico em resíduos de arginina que supostamente está envolvido na ligação ao DNA viral. Depois da sua expressão intracelular, as proteínas se agrupam formando partículas semelhantes ao vírus (VLP - *virus like particles*) (Liu *et al.*, 2006). Através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e pela análise de polimorfismo de fragmentos de comprimento por restrição (RFLP) de seqüências de ORF2, um estudo demonstrou a existência de diferenças genéticas entre amostras de PCV-2. Assim, recentemente, os vírus tem sido classificados como PCV-2 grupo 1 (ou PCV-2b) e PCV-2 grupo 2 (ou PCV-2a) (Carman *et al.*, 2008).

Vários outros ORFs menores têm sido encontrados mas, com exceção de ORF3, sua expressão não tem sido demonstrada. ORF3 é um importante candidato na indução da patogênese. Sua expressão não é essencial para a replicação de PCV-2, porém variantes virais que o expressam induzem apoptose via caspase-8 e caspase-3 (Liu *et al.*, 2005). Estudos com cepas de campo de PCV-2 e vírus mutantes, que não expressam ORF3, foram realizados *in vivo*. O título de anticorpos, para cepas de campo de PCV-2, foi mais alto quando comparado com a cepa mutante e esta falhou na indução de lesões histopatológicas típicas. Estes resultados sugerem que ORF3 é o principal responsável na indução da SRPD (Fenaux *et al.*, 2004).

2.1.3 Importação viral

A heparina-glicosaminoglicano, sulfato de heparina, sulfato de condroitina-B e o sulfato de queratina, presentes nas membranas celulares, servem como receptores de ligação para PCV-2, mas outras moléculas também podem ser necessárias como um receptor específico (Misinzo *et al.*, 2007). Os vírus, de um modo geral, podem penetrar na célula hospedeira por vários caminhos comuns como: macropinocitose, a endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada

por caveolina e caminhos independentes de caveolina e clatrina (Meier e Greber, 2004).

Estudo recente demonstrou que, a infecção por PCV-2 diminuiu significativamente quando bloqueadores dos processos de endocitose mediada por clatrina e acidificação do citosol, foram utilizados. Porém, a inibição da macropinocitose e da endocitose mediada por caveolina não reduziu a infecção. Desta forma, PCV-2 pode penetrar nas células via “endocitose mediada por clatrina” e requer um ambiente acidificado. Além disso, como a inibição da endocitose mediada por clatrina não impediu a infecção dessas células, sugeriu-se que este caminho não representa a única rota de internalização em células epiteliais (Vincent *et al.*, 2005). Em células epiteliais e em células da linhagem monocítica/macrofágica, PCV-2 liga-se rapidamente ao sulfato de heparina e ao sulfato de condroitina-B. Porém, sua internalização via endocitose mediada por clatrina é lenta (Misinzo *et al.*, 2008).

Depois da internalização, PCV-2 localiza-se em endossomos. Sendo que, a protease serina é essencial para sua liberação, sugerindo ser esse processo o principal indutor da clivagem proteolítica da proteína Cap (Misinzo *et al.*, 2007). Contudo, variações na atividade endocítica, adesão, internalização e liberação viral têm sido relatadas de forma ineficaz em células específicas.

2.1.4 Replicação viral

A replicação inicial de PCV-2, provavelmente, ocorre em macrófagos e células apresentadoras de antígenos de tecidos linfóides, como tonsilas e linfonodos regionais (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999), ou, alternativamente, nas placas de Peyer (Rosell *et al.*, 1999). Logo após, PCV-2 pode ser transportado via intracelular ou livres na linfa e/ou sangue (Rosell *et al.*, 1999). Depois da infecção, o DNA viral fita-simples circular (ssDNA) é convertido por fatores da célula-alvo em DNA fita-dupla

circular (dsDNA), forma replicativa que serve como molde para replicação de DNA viral (Steinfeldt *et al.*, 2001).

Devido ao seu pequeno genoma e sua capacidade codificante limitada, o ciclo de vida de PCV-2 depende predominantemente, de fatores da célula-alvo. Recentemente, várias proteínas intracelulares suínas interagindo com as proteínas virais rep, rep', cap e proteína ORF3 foram identificadas através de testes com híbridos. A maioria das interações descritas ocorre com proteínas de múltiplas funções, mas não há indicação de uma origem comum. Podem estar associadas à múltiplos aspectos da replicação viral, tal como regulação da transcrição e processos de transporte intracelular (Finsterbusch e Mankertz, 2009).

Após a tradução, rep e rep' estão localizadas no nucleoplasma de células infectadas e parece não ser alterada durante o ciclo infeccioso. Ambas, rep e rep', carregam três sinais de localização nuclear (NLSs) em seu N-terminal. NLS1 e NLS2 medeiam a acumulação nuclear e NLS3 serve como um potencializador da importação nuclear de rep e rep'.

Em contraste, a localização da proteína cap é variável. No estágio inicial da infecção cap localiza-se no nucléolo e com o decorrer do tempo há migração para o nucleoplasma e, posteriormente, exportação para dentro do citoplasma. Isto indica, que a proteína cap move-se entre compartimentos celulares distintos durante o ciclo infeccioso. Como todas as proteínas codificadas por PCV são encontradas pelo menos em algum momento no núcleo, a replicação de DNA e seu encapsulamento ocorrem provavelmente neste compartimento e não no citoplasma (Finsterbusch e Mankertz, 2009).

2.1.5 Interação entre células e vírus

Através de estudos *in vivo*, o DNA viral e antígenos foram encontrados em células monocíticas, epiteliais e endoteliais, mas não houve identificação de replicação

substancial em células monocíticas. Por outro lado, a replicação de PCV-2 foi detectada em células endoteliais da linhagem PEDSV.15, células endoteliais aórticas, células epiteliais intestinais e fibrócitos por aumento nos níveis de proteína rep e cap (Steiner *et al.*, 2008).

A imunofenotipagem de células-alvo de PCV-2 em suínos demonstrou que populações celulares susceptíveis mudam de acordo com a fase do desenvolvimento do hospedeiro, variando de células embrionárias, cardiomiócitos fetais, hepatócitos e macrófagos no início da gestação, e macrófagos no final da gestação (Mateusen *et al.*, 2004). Como o PCV requer as polimerases presentes no núcleo durante a fase S do ciclo celular, células de alta atividade mitótica podem ser os maiores sítios para a replicação de PCV-2 (Tischer *et al.*, 1982). Em animais neonatos, PCV-2 frequentemente é encontrado no citoplasma de monócitos e células da linhagem de macrófagos (MLCs), mas sinais virais intranucleares são raramente encontrados nestas células (Darwich *et al.*, 2004). Em contrapartida, PCV-2 pode ser detectado no núcleo de hepatócitos e outras células epiteliais (Rosell *et al.*, 2000a). Todas essas células mencionadas aqui, exceto para MLCs, têm sido indicadas como suporte para replicação de PCV-2, pois mantém uma forte atividade mitótica (Darwich *et al.*, 2004).

A ausência ou presença de replicação limitada de PCV-2 em células MLCs corresponde com a baixa atividade da DNA-polimerase destas células (Meerts *et al.*, 2005). Assim, tem sido sugerido que o grande número de antígenos virais encontrados em macrófagos de suínos doentes são resultado do acúmulo das partículas virais devido à fagocitose de outras populações celulares (Darwich *et al.*, 2004). Além disso, Yu *et al.*, (2007) utilizando RT-PCR determinou que os níveis de DNA viral e RNAm de cap diferem dramaticamente entre tecidos obtidos de um mesmo suíno. A demonstração de que os

níveis de RNAm de cap e níveis de DNA viral em linfócitos e de células mononucleares reduzem durante a infecção e que os níveis de DNA viral em monócitos permanecem consistentes, sugerem que os linfócitos são os sítios primários de replicação de PCV-2 e os monócitos funcionam como armazenadores do vírus.

2.1.6 Efeitos imunopatológicos

A infecção por PCV-2 leva a linfadenopatias em suínos, sendo caracterizadas por desaparecimento de folículos linfóides, redução de linfócitos interfoliculares e infiltração histiocítica com formação de células gigantes multinucleadas. Vários mecanismos tem sido implicados na depleção linfocítica induzida por vírus. Incluindo a habilidade citopática direta viral, hiperativação e exaustão imune, supressão imune mediada por vírus e produtos de genes regulatórios e morte equivocada de células não infectadas. Entretanto, o principal mecanismo não é reconhecido (Feng *et al.*, 2002).

Apenas raros antígenos de PCV-2 ou ácidos nucléicos têm sido detectados em pequenas células redondas como os linfócitos, demonstrando que a severa depleção destas células e a redução na população linfocítica não é considerada um resultado destrutivo direto de PCV-2 (Mandrioli *et al.*, 2004). Segundo Lin *et al.* (2008), PCV-2 foi detectado tanto em linfócitos B quanto T, porém, os linfócitos B são mais susceptíveis. Já Shibahara *et al.* (2000) observaram diminuição de linfócitos B em tecidos linfóides na presença de vírions de PCV-2 e corpos apoptóticos fagocitados por macrófagos de suínos sintomáticos. Sendo assim, a alta susceptibilidade de células B é consistente.

A diminuição da densidade celular em áreas associadas a linfócitos B e uma diminuição na proporção de IgM nas células periféricas (Darwich *et al.*, 2002) confirmam que linfócitos podem funcionar como reservatórios e a replicação viral pode

ocorrer quando estes são ativados. Por outro lado, a caracterização dos efeitos da inoculação de PCV-2 em macrófagos alveolares (AMs) *in vitro* (Chang *et al.*, 2006), revelou um aumento significativo na produção de TNF-alfa, IL-8 e expressão de RNAs para fator quimiotático para neutrófilos derivados de macrófago tipo-2 (AMCF-2), fator estimulador de colonização granulocítica (GM-CSF), proteína quimiotática para monócitos tipo-1 e tipo-2 (MCP-1 e MCP-2). Além de uma reduzida produção de reativos oxigenados específicos (ROS).

As citocinas e quimiocinas liberadas por células inflamatórias são fatores essenciais na eliminação de patógenos invasores. Entretanto, sua excessiva liberação pode intensificar o dano tecidual por aumento na reação inflamatória e recrutamento adicional de células mononucleares fagocíticas. TNF-alfa é um mediador pró-inflamatório da fase aguda, promovendo inflamação e induzindo febre, destruição tecidual e, em alguns casos, choque e morte. IL-8, AMCF-2, GM-CSF, MCP-1, MCP-2 e a ativação de células T trabalham em sinergismo ou sozinhos, recrutando neutrófilos, monócitos e linfócitos. Esses fatores biológicos são gerados, primariamente, por macrófagos e podem mediar a progressão de lesões teciduais, já que são encontrados em diversos sistemas (Yoshioka *et al.*, 2004).

O dano na habilidade de produção de ROS pode contribuir parcialmente na redução da capacidade de matar microrganismos, já que a fagocitose e a produção de ROS são as propriedades citotóxicas principais de fagócitos. Esses achados contrastam com estudos em PCV-1 que demonstraram não afetar a fagocitose e a capacidade microbicida de AMs, confirmando a patogenicidade de PCV-2 (McNeilly *et al.*, 1996). Sendo assim, esses resultados em conjunto sugerem que os macrófagos alveolares portadores de PCV-2 favorecem a sobrevivência e a expansão viral. Além disso, a diminuição na produção

de ROS (que leva à redução de danos celulares e apoptose em fagócitos) somada à presença de fator estimulante de colonização de macrófagos (M-CSF), contribui para proliferação e sobrevivência destas células (Stanley *et al.*, 1997). Segundo Kim e Chae (2004), tanto citocinas quanto MCP-1, produzidas por macrófagos contendo PCV-2, podem induzir inflamações granulomatosas. Finalmente, o dano funcional induzido por PCV-2 em macrófagos alveolares pode contribuir com uma maior susceptibilidade a infecções secundárias em suínos.

2.2 Transmissão

A alta prevalência de PCV-2 nos principais países produtores de suínos, indica que sua transmissão é muito efetiva (Rose e Madec, 2002). Domingo *et al.* (2005), através das técnicas de PCR em tempo real e hibridização *in situ*, detectaram altos níveis de PCV-2 no soro e em swab nasal, fecal, tonsilar e urinário, tanto de animais com SRPD (Síndrome da Refugagem Pós-Desmame) quanto de animais infectados sub-clínicos. PCV-2 é principalmente transmitido entre suínos pelas rotas oro-fecal e/ou oro-nasal (Caprioli *et al.*, 2006). Mas, a transmissão vertical e venérea também tem sido documentada (West *et al.*, 1999), já que PCV-2 foi detectado no sêmen (Hamel *et al.*, 2000), e em fetos entre 32 e 114 dias de gestação (Ohlinger *et al.*, 2000). Além disso, Opriessnig *et al.* (2009a) verificaram que a imunidade induzida na fêmea por vacinação não preveniu a infecção fetal após a inseminação artificial com sêmen contaminado por PCV-2. O contato com suínos infectados, instalações, equipamentos e fômites também constituem em importante forma de transmissão.

2.3 Quadros patológicos relacionados ao Circovírus suíno tipo 2

2.3.1 Síndrome de refugagem pós-desmame (SRPD)

2.3.1.1 Sinais clínicos

A SRPD afeta suínos na fase inicial de crescimento, entre 5 e 12 semanas de idade, podendo acometer rebanhos de alto padrão sanitário. Porém, é mais comumente encontrada em granjas de ciclo completo e fluxo contínuo, e granjas de terminação de múltiplas origens (Domingo *et al.*, 2004). A morbidade e a mortalidade variam de acordo com a fase que o surto acontece e o manejo empregado, podendo alcançar 70-78% e 4-30%, respectivamente (Segalés *et al.*, 2002). Os sinais clínicos incluem progressiva perda de peso, baixa condição corporal, depressão, palidez cutânea, dificuldade respiratória, linfadenomegalia, diarreia e por vezes icterícia (Mateu *et al.*, 2004).

2.3.1.2 Lesões anatomo-patológicas

Na necropsia, as lesões mais marcantes são pulmões não-colapsados e aumento dos linfonodos, principalmente inguinais, submandibulares, mesentéricos e do mediastino (Rosell *et al.*, 1999). No entanto, estas lesões não estão sempre presentes e não podem ser utilizadas como o único marcador de SRPD. Em uma baixa proporção de casos, os linfonodos podem ter áreas multifocais à coalescentes de necrose que são visíveis a olho nu (Segalés *et al.*, 2000a). Outras lesões graves incluem a redução ou aumento do tamanho do fígado, com áreas multifocais brancacentas (Rosell *et al.*, 2000b), e rins aumentados com múltiplos focos brancacentos de diâmetro variável. Além disso, um elevado número de suínos afetados pela SRPD tem áreas de consolidação pulmonar crânio-ventral (broncopneumonia) e úlceras gástricas da *pars oesophagica*, que são normalmente associados à infecção bacteriana e de origem multifatorial, respectivamente, e não ao efeito direto da infecção por PCV-2.

Úlceras gástricas podem causar hemorragia interna, sendo a causa da morte em alguns animais, e podem também levar à anemia e palidez cutânea (Segalés *et al.*, 2000b). A anemia, sem úlceras gástricas, também tem sido descrita como uma característica da SRPD em suínos severamente afetados. Finalmente, suínos com SRPD crônica podem desenvolver caquexia, com marcada perda de massa muscular e atrofia da gordura das serosas (Darwich *et al.*, 2003).

2.3.1.3 Lesões histopatológicas

Lesões microscópicas em tecidos linfóides de suínos afetados severamente pela SRPD têm sido amplamente descritos, e incluem depleção linfóide com perda de folículos linfóides, redução da celularidade parafolicular e infiltração por macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas com corpúsculos de inclusão citoplasmáticos (Rosell *et al.*, 1999). Nos estágios avançados, não há atrofia macroscópica de órgãos linfóides, principalmente linfonodos (Segalés *et al.*, 2000a), que coincidem microscopicamente com uma diminuição generalizada das células linfóides e proeminente estroma fibro-reticular. Ocasionalmente, ocorrem lesões necrosantes nos linfonodos de suínos severamente afetados (Segalés *et al.*, 2000a).

Pneumonia intersticial subaguda é uma lesão pulmonar comum na SRPD, apresentando-se macroscopicamente como não-colapso pulmonar (Rosell *et al.*, 1999). Em alguns casos, é possível observar histiócitos e células gigantes multinucleadas nos septos alveolares espessos e lobulares. Nos casos crônicos, bronquiolite fibrosa obliterante pode estar presente (Clark, 1997; Segalés *et al.*, 2000a).

As lesões hepáticas têm sido descritas como infiltrado inflamatório linfo-histiocitário peri-portal com vacuolização, cariomegalia e necrose dos hepatócitos. No entanto, em alguns casos, pode haver lesões graves, com fibrose peri-lobular

generalizada, desorganização dos sinusóides e perda generalizada de hepatócitos (Clark, 1997).

Além disso, nefrite intersticial subaguda grave e crônica associada com quantidades elevadas de PCV-2, podem ser observadas (Domingo *et al.*, 2004). Outras lesões microscópicas incluem infiltrado inflamatório linfo-histiocitário em praticamente todos os tecidos (Rosell *et al.*, 1999).

2.3.2 Síndrome da dermatite e nefropatia suína (SDNS)

PDNS foi primeiramente descrita no Reino Unido em 1993 (Smith *et al.*, 1993). Desde então, países da Europa, América do Sul e do Norte, Oceania e África descreveram casos dessa doença, sugerindo uma distribuição mundial. A detecção clínica de SDNS é relativamente fácil, devido a presença de infartos cutâneos hemorrágicos, localizados principalmente em membros posteriores e região perineal (Segalés *et al.*, 1998). Na maioria dos animais, ambos os rins estão aumentados, pálidos e com petéquias difusas na cortical. Nem todos os suínos afetados tem lesões renais e cutâneas macroscópicas, sendo considerados casos atípicos da síndrome. Porém, incluídos aqui devido a presença regular de vasculite necrosante sistêmica.

Os principais achados histopatológicos incluem glomerulonefrite necrosante fibrinosa e vasculite sistêmica necrotizante (Thibault *et al.*, 1998). Essas características microscópicas, juntamente com a presença de imunoglobulinas e fatores do complemento nos vasos glomerulares danificados, sugerem uma reação de hipersensibilidade do tipo III como o possível mecanismo patogênico para doença (Sierra *et al.*, 1997). Os fatores envolvidos nesse complexo distúrbio imuno-mediado são atualmente desconhecidos e, teoricamente, medicamentos, produtos químicos, alimentos alergênicos, antígenos endógenos e outros agentes infecciosos

podem estar relacionados (Domingo *et al.*, 2004).

2.3.3 Falhas reprodutivas

As falhas reprodutivas associadas a PCV-2 em fêmeas gestantes resultam principalmente de doença aguda sistêmica, sendo caracterizada clinicamente pela presença de aborto, aumento da parição de fetos não-viáveis (mumificados e natimortos) ou de neonatos fracos (Park *et al.*, 2005). PCV-2 foi detectado em natimortos e em leitões neonatos não-viáveis apresentando congestão passiva crônica hepática, edema pulmonar, hidrotórax, ascite, hipertrofia cardíaca e severa miocardite difusa (O'Connor *et al.*, 2001; Madson *et al.*, 2009). A presença do vírus no coração, fígado, e esporadicamente no pulmão e no rim foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), imunohistoquímica, e técnicas de isolamento viral (West *et al.*, 1999; O'Connor *et al.*, 2001).

Na fêmea gestante, PCV-2 é capaz de atravessar a placenta durante a viremia e infectar fetos no útero (Park *et al.*, 2005). Durante o início e meio da gestação, PCV-2 tem predileção pelo miocárdio, resultando em necrose e fibrose miocárdica, e miocardite não supurada (West *et al.*, 1999). Entretanto, se a infecção ocorre no final da gestação o miocárdio é menos afetado e o DNA de PCV-2 pode ser mais detectado nos tecidos linfóides (Sanchez *et al.*, 2003). PCV-2 também pode disseminar de feto para feto no útero, resultando em morte em vários estágios de gestação.

2.3.4 Complexo da doença respiratória suína (CDRS)

CDRS é caracterizado por um crescimento lento e desigual do leitão, redução do consumo de ração e conversão alimentar, e aumento das taxas de pneumonia clínica. Essa condição geralmente aparece em um rebanho quando os suínos atingem 16-20 semanas de idade (Domingo *et al.*, 2004). Os principais

patógenos envolvidos no CDRS são o Vírus da Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRSV) e *Mycoplasma hyopneumoniae*. No entanto, outros patógenos bacterianos e virais também foram detectados em surtos, sendo PCV-2 um destes agentes (Thacker e Thacker, 2000). As lesões macroscópicas e microscópicas dependem, principalmente, do número de agentes patogênicos envolvidos. Além disso, na maioria dos casos não há diferenças claras entre CDRS e casos SRPD, uma vez que o quadro clínico pode ser muito semelhante (Sorden *et al.*, 2000).

2.3.5 Pneumonia necrosante proliferativa (PNP)

Descrita inicialmente em 1990, no Canadá, como uma condição associada a problemas respiratórios em creches e unidades de terminação (Morin *et al.*, 1990). A PNP é diagnosticada através de critérios histopatológicos, incluindo presença de células necróticas, histiócitos e material protéico dentro alvéolos, proliferação de pneumócitos tipo II e bronquiólite necrosante (Larochelle *et al.*, 1994). A etiologia do PNP foi inicialmente desconhecida, mas uma variante antigênica do vírus da gripe (SIV) foi relatada como o agente causal no início dos anos 90 (Girard *et al.*, 1992). Anos mais tarde, foi sugerido que a detecção freqüente de PRRSV era mais do que apenas uma associação ao acaso, e este vírus foi considerado como o agente primário ou predisponente na etiologia do PNP (Larochelle *et al.*, 1994). Mais recentemente, tem sido relatado que essa condição é resultado de uma co-infecção pelo PCV2 e PRRSV (Pesch *et al.*, 2000). Nesse estudo, 192 pulmões com lesões semelhantes a PNP foram estudados e PCR foi utilizada para detectar PRRSV, PCV2 e SIV. Em 164 deles (85,4%) apresentaram a presença concomitante de PRRSV e PCV2.

2.3.6 Tremor Congênito (TC)

O tremor congênito (TC) é caracterizado por contrações clônicas de cabeça e membros em recém-nascidos, de severidade variável, que poder resolver espontaneamente ou levar o animal à óbito. A mortalidade de suínos afetados pode chegar a 50% e é resultante da inabilidade do leitão mamar (Chae, 2005). Dois tipos de TC foram descritos com base na presença (tipo A) ou ausência (tipo B) da deficiência de mielina no sistema nervoso central e periférico. O tipo A foi dividido em cinco diferentes subtipos (AI-AV), que incluem anormalidades genéticas, toxicidade ao triclorforme *in utero* e infecção uterina por vírus. Subtipo TC AII tem sido tradicionalmente associado com um vírus não identificado, mas vários relatórios dos USA tem sugerido que PCV-2 é o agente causal (Stevenson *et al.*, 2001). Nesse trabalho, não foram registrados em todos os suínos TC-afetados lesões macroscópicas ou microscópicas. No entanto, ácidos nucleicos de PCV-2 foram detectados em tecidos do sistema nervoso e no fígado de suínos afetados e normais. Por outro lado, trabalhos realizados na Europa sobre casos de TC também classificados como AII não mostraram qualquer associação com PCV-2 (Kennedy *et al.*, 2003). Desta forma, a associação entre o PCV-2 e TC é atualmente uma questão controversa.

2.3.7 Enteropatias

A enterite granulomatosa é caracterizada clinicamente por apresentação de diarreia e a terapia antibiótica ineficaz. As alterações histopatológicas predominantes são inflamação granulomatosa e depleção linfóide nas placas de Peyer, tanto no intestino delgado quanto no grosso. Presença de células gigantes multinucleadas e corpúsculos de inclusão citoplasmáticos também podem ser observados. Animais sem SRPD podem apresentar enterite granulomatosa sendo que,

esta só pode ser diagnosticada quando há presença de diarreia, lesões microscópicas nas placas de Peyer, mas não nos linfonodos e presença de PCV-2 nestas lesões (Chae, 2005).

2.4 Diagnóstico

A confirmação de que PCV-2 é o agente etiológico da SRPD baseou-se na associação de sinais clínicos e lesões macroscópicas e histopatológicas, concomitantes com a detecção de antígeno ou ácido nucleico viral. Um rebanho é considerado positivo para circovirose suína quando achados patológicos e histopatológicos indicativos estão presentes ao mesmo tempo em pelo menos um suíno examinado (Morés *et al.*, 2007). A detecção viral atualmente pode ser realizada através de técnicas de imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e PCR (Opriessnig *et al.*, 2006). Já o isolamento viral, pode ser realizado em células PK-15, ST e SK-6. Por não possuir efeito citopático, nessas células, é necessária detecção viral através de técnica de imunofluorescência (IF) ou imunoperoxidase em monocamada (IPMA) (Ellis *et al.*, 1998).

Apesar da detecção sorológica não ter valor diagnóstico, este bioindicador pode ser utilizado para determinar quando a infecção ocorre no rebanho através de estudos longitudinais e transversais (Opriessnig *et al.*, 2007), devido à alta prevalência de animais clinicamente saudáveis (Carasova *et al.*, 2007). A análise do perfil sorológico pode aumentar o conhecimento da circulação viral e pode ser útil para a implementação de estratégias de vacinação e controle mais eficazes (Gerber *et al.*, 2009). A pesquisa de anticorpos anti-PCV-2 no soro é atualmente realizada por testes de imunofluorescência indireta ou IPMA por células infectadas por PCV-2 (Ellis *et al.*, 1998). Além disso, testes ELISA competitivo foram recentemente desenvolvidos com anticorpos monoclonais específicos para PCV-2 e preparações

específicas do antígeno, com o intuito de reduzir o efeito das reações cruzadas entre PCV-1 e PCV-2 (Jestin *et al.*, 2003).

2.5 Controle

Nos primeiros estágios da circovirose suína no Brasil e em vários outros países, houve muita dificuldade em controlar os surtos a campo, pela pouca experiência da comunidade técnica em lidar com uma forma desconhecida de manifestação patológica. Paralelamente, a inexistência de vacinas complicava em muito as decisões relativas ao controle. Dessa forma, num primeiro momento, a melhor alternativa pareceu ser à busca de experiências que eventualmente existissem em outros países. Nesse sentido, à adequação das granjas nacionais às recomendações de Madec foi a primeira medida adotada. Posteriormente, estudos revelaram novas alternativas de controle (Morés *et al.*, 2007).

2.5.1 Recomendações de Madec

Abrangem uma série de medidas de manejo incluindo desinfecção eficiente, taxas de densidade e lotação adequadas, evitar a mistura de animais de múltiplas origens, manejo todos dentro - todos fora e maximização a ingestão de colostro pelos leitões. Além de utilizar programas de vacinação adequados às doenças do plantel e melhorar o bem estar animal incluindo conforto térmico, disponibilidade adequada de água e ração. Essas são algumas das principais recomendações (Madec *et al.*, 2000).

2.5.2 Efeito da leitegada

Segundo Segalés *et al.* (2007), um efeito de leitegada está associada à mortalidade em granjas afetadas quando o baixo título de anticorpos, em porcas, foram positivamente relacionados com a mortalidade de suínos. Isto sugere que anticorpos maternos podem proteger contra

a mortalidade de leitões. Esta sugestão foi anteriormente observada no campo e em condições experimentais (Allan *et al.*, 2002; McKewon *et al.*, 2005; Ostanello *et al.*, 2005). No entanto, não foi possível avaliar como o equilíbrio entre a viremia por PCV-2 e o título de anticorpos pode determinar o resultado final de mortalidade na prole. De qualquer forma, manter um plantel com fêmeas com alta titulação de anticorpos e garantir uma ingestão adequada de colostro são também importantes formas de controle (Segalés *et al.*, 2007).

2.5.3 Resistência racial

Foi demonstrado que suínos da raça Landrace são mais susceptíveis às infecções causadas por PCV-2 do que suínos das raças Duroc e Large White. A raça Pietrain também foi considerada resistente à infecção (Opriessnig *et al.*, 2009b). A causa para as diferenças raciais permanece indefinida, embora tem sido sugerido que animais de crescimento mais lento poderiam ser menos afetados (Opriessnig *et al.*, 2009b).

2.5.4 Plasma suíno

O uso de plasma suíno ultrafiltrado obtido pelo método do “spray dried” em rações de leitões tem se mostrado eficiente em prevenir possíveis efeitos da infecção pelo circovírus. Esse tipo de aditivo alimentar possui imunoglobulinas, peptídeos, fatores de crescimento e outros nutrientes que possuem atividade biológica e que poderiam explicar seu efeito antiviral. Provavelmente, a melhora de desempenho dos leitões suplementados com plasma seja devida, principalmente, à ação de imunoglobulinas no intestino e a alta qualidade de sua proteína, constituindo-se em um ingrediente importante na alimentação de leitões após o desmame (Morés *et al.*, 2007).

2.5.5 Vacinação

A primeira vacina comercial disponível contra PCV-2 foi baseada na abordagem clássica de vírus íntegro inativado e adjuvante (Reynaud *et al.*, 2004). Este produto é o único registrado para uso em animais adultos (marrãs e porcas), sendo recomendada aplicação de duas doses antes do acasalamento ou inseminação artificial e de uma dose após cada parto (Joisel *et al.*, 2007). Em contrapartida, três vacinas comerciais para uso em leitões de 3-4 semanas de idade ou leitões mais velhos estão disponíveis em diferentes partes do mundo. Duas delas correspondem a vacinas geneticamente modificadas de PCV-2 com base na expressão da proteína Cap no sistema de expressão em Baculovírus (Fachinger *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2008). A quarta vacina disponível no mercado é um produto geneticamente modificado baseado em um vírus quimérico contendo como espinha dorsal o genoma do circovírus suíno tipo 1, mas substituindo seu gene ORF2 pelo ORF2 de PCV-2 (Fenaux *et al.*, 2004). Recentemente, a administração de vírus quiméricos vivos demonstrou ser eficiente no controle experimental com desafio por PCV-2, abrindo a possibilidade de obtenção de vacinas comerciais vivas atenuadas (Gillespie *et al.*, 2008).

Além das vacinas comerciais atualmente disponíveis, diferentes protótipos de vacinas foram desenvolvidas durante os últimos seis anos. Entre elas incluem, a expressão da proteína recombinante cap em diferentes bactérias como *Escherichia coli* (Liu *et al.*, 2000) ou em *Lactococcus lactis* (Wang *et al.*, 2008), e em sistemas de vetor viral incluindo Adenovírus recombinante (Wang *et al.*, 2006), Baculovírus (Fane *et al.*, 2008) ou vírus atenuado da doença de Aujeszky (ADV) (Song *et al.*, 2007). No entanto, a maioria desses estudos, realizados em ratos e/ou suínos, os animais não foram posteriormente desafiados com PCV-2 e, portanto, a capacidade de proteção da vacina não foi avaliada. Vacinação com DNA,

também tem sido abordada como potencial candidato (Blanchard *et al.*, 2003; Fane *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008), embora alguns dos resultados tenham sido obtidos apenas em ratos.

Em condições de campo, todas as vacinas comerciais contra PCV-2 foram capazes de reduzir o impacto SRPD através da redução significativa das taxas de mortalidade e de refugagem. Além disso, maior média ganho de peso diário e diminuição na frequência das co-infecções foram observados em suínos imunizados (Cline *et al.*, 2008; Fachinger *et al.*, 2008; Horlen *et al.*, 2008; Kixmoller *et al.*, 2008; Desrosiers *et al.*, 2009). Pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual elas são capazes de proteger contra o desenvolvimento da SRPD. Entretanto, há indícios que elas sejam capazes de induzir respostas de anticorpos neutralizantes, bem como uma resposta imune celular (Fort *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Antes da aplicação do tratamento experimental, foi realizado o perfil sorológico da granja através da análise de 150 soros pertencentes as seguintes categorias: porcas e leitões da maternidade, creche, recria e terminação, sendo coletadas 30 amostras de cada categoria. O título de anticorpos foi determinado através da técnica de imunoperoxidase em monocamada de células (IPMA), adaptada de Ellis *et al.* (1998), onde soros com quatro diluições (1:20-1:5120) foram incubados por 1 h em 37 °C, sob uma monocamada de células PK-15 infectadas por PCV-2 e, em seguida, lavadas com PBS-Tween. O conjugado anti-IgG de suíno com a enzima peroxidase foi adicionada e incubada por uma hora. Amino-etil-carbazol (Sigma Chemical) foi usado como substrato. Os títulos foram classificados como: <20, negativo; 20-80, baixo; 320-1280, médio e ≥5120, alto.

3.1 Seleção dos animais

Utilizou-se no experimento 1140 leitões recém desmamados, sendo 592 leitões (média de 20 por baía) e 548 leitões (média de 30 por baía), entre 24 a 28 dias de idade, saudáveis e não vacinados anteriormente contra circovirose suína. Estes animais, até o desmame, recebiam medicação parenteral e oral aplicadas individualmente. Ao final, haviam 571 animais no grupo controle e 569 no grupo vacinado. Os animais foram selecionados de quatro lotes sequenciais, em uma granja multiplicadora localizada no município de Itapiranga - Santa Catarina. Com um total de 560 matrizes provenientes de um cruzamento entre as raças Landrace e Large White, a granja de ciclo completo possuía diagnóstico clínico e laboratorial de circovirose suína e taxa de mortalidade, entre o desmame e o abate, de 6% (sendo esta mortalidade relacionada primariamente com circovirose suína). O rebanho era vacinado contra *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae*. O alojamento, alimentação e manejo geral dos animais ocorreram segundo a rotina estabelecida na granja sendo que, as instalações e programas de arração dos leitões eram diferentes das leitões, já que estas eram destinadas para reposição de mães e os leitões para o abate. O experimento foi desenvolvido durante o período de Abril a Outubro de 2008.

3.2 Tratamento experimental

No dia anterior ao desmame, cada animal foi pesado, identificado através de

brincos numerados e separados por sexo. Após balanceamento por peso, randomização e separação dos animais, as baias foram sorteadas para o recebimento do tratamento experimental (vacinado ou controle). O grupo tratado (275 fêmeas e 294 machos) recebeu a vacina viral convencional contra PCV-2 (2.1 antígeno ELISA unidades - Circovac®), reconstituída com adjuvante oleoso no momento da aplicação. Já o grupo controle recebeu solução fisiológica estéril. A administração foi realizada por meio de injeção intramuscular, na região anterior do pescoço do lado direito, no volume de 0,5 ml por animal, em dose única, ao desmame. Ao final havia dois grupos de animais vacinados e dois grupos de animais controle (machos e fêmeas). Frente as diferentes condições de arração e ambiente não foi possível a comparação dos resultados entre machos e fêmeas.

3.3 Avaliação da segurança

No início do ensaio, em cada grupo experimental (total de 16) foram selecionados aleatoriamente 5 animais, dos quais foram identificados os brincos e avaliados quanto à presença de reações locais e sistêmicas. Para isto, temperatura retal, apetite (normal, diminuído ou ausente), comportamento (normal, letárgico, inconsciente ou morto) e tamanho e tipo de lesões foram avaliados e registrados anteriormente à vacinação, quatro horas após a aplicação e diariamente até o quarto dia. Sendo que ao final, os animais avaliados estavam distribuídos segundo a Tabela 1.

Tabela 1 – Animais selecionados para avaliação da segurança vacinal

SEMANA	FÊMEAS		MACHOS	
	CONTROLE	VACINADO	CONTROLE	VACINADO
1	5	5	5	5
2	5	5	5	5
3	5	5	5	5
4	5	5	5	5
TOTAL	20	20	20	20

3.4 Avaliação da eficácia

Primariamente, os itens determinantes de eficácia avaliados foram os índices de desempenho e taxa de mortalidade. Já dentre os indicadores de eficácia secundários, estão os índices de tosse e

espirro, índice para pneumonia (IPP), frequência de diarreia e uso de tratamentos antibióticos. Além disso, lesões anatomopatológicas, histopatológicas e marcação imuno-histoquímica foram descritas nos animais que morreram naturalmente durante o período experimental.

3.4.1 Indicadores de eficácia primários

3.4.1.1 Avaliação de desempenho

Foram realizadas pesagens diárias da ração fornecida para cada baía, desde o desmame até o abate. Além disso, houve pesagens individuais dos animais com verificação do número de brinco, em três momentos distintos: na desmama (28 dias), na saída da creche (67 dias) e na terminação (150 dias). Todo leitão com peso abaixo de 75% da média do lote foi considerado refugo. Desta forma, foi possível o cálculo de importantes

índices de desempenho como ganho de peso diário e taxa de refugagem.

3.4.1.2 Taxa de mortalidade

Os animais que morreram naturalmente durante o período experimental foram devidamente registrados, para cálculo da taxa de mortalidade segundo a categoria animal (creche ou terminação), idade, sexo, grupo experimental e causa *mortis*. Além disso, todos foram submetidos à necropsia seguido de coleta de amostras para exame histopatológico e imuno-histoquímico.

3.4.1.3 Avaliação macroscópica

Foi realizada necropsia completa e criteriosa dos animais mortos naturalmente com registro em relatórios e fotografias. Ao final, fragmentos de fígado, rim, baço, linfonodos, tonsila e pulmão com ou sem lesões macroscópicas, foram fixados em solução de formol tamponado (pH 7,2) a 10 % e, posteriormente, submetidos ao processamento histológico de rotina.

3.4.1.4 Avaliação histológica

Os tecidos embebidos e incluídos em parafina foram cortados em micrótomo com 4,5µm de espessura e transferidos para lâminas de vidro. As lâminas para histologia foram coradas por hematoxilina-eosina, sendo, posteriormente, analisadas ao

microscópio óptico. Foram consideradas como lesões histopatológicas consistentes com a infecção por PCV-2 a depleção linfóide, histiocitose, presença de células gigantes multinucleadas, corpúsculos de inclusão citoplasmáticos, entre outras. A intensidade da lesão foi classificada em 4 escores: 0=normal, 1=discreta, 2=moderada e 3=severa. O tipo de lesão também recebeu classificação por escores, variando de acordo com o tecido envolvido.

3.4.1.5 Avaliação imuno-histoquímica

Os linfonodos com alterações histológicas compatíveis com circovirose suína foram selecionados e submetidos à avaliação imuno-histoquímica. Para isso, cortes de 4,5µm foram transferidos para lâminas silanizadas. Após desparafinados, os tecidos foram submetidos à técnica de Streptavidina-Peroxidase (LSAB plus, DAKO) usando anticorpo policlonal anti-PCV-2 (Dr. Pat Halbur, Iowa State University). A marcação foi revelada com amino-etil-carbazol (AEC, Sigma) e coloração de fundo com Hematoxilina de Harris. Através da avaliação em microscópio óptico as marcações positivas foram classificadas segundo Grau-Roma *et al.* (2009), nos seguintes graus: Grau 1, marcação discreta focal ou multifocal em menos de 25% dos folículos linfóides; Grau 2, marcação localizada exclusivamente nos folículos linfóides (25-50%) ou nas áreas interfoliculares (25-50%); Grau 3, marcação maior que 50% na área folicular e parafolicular e Grau 4, marcação difusa.

3.4.2 Indicadores de eficácia secundários

3.4.2.1 Avaliação dos índices de tosse, espirro, diarreia e uso de antimicrobianos.

Os índices de tosse, espirro e diarreia foram avaliados no dia da desmama,

30 dias após e semanalmente até o abate. Para o cálculo dos índices, foi realizada a contagem de tosse e espirro em cada baia durante 2 minutos, após movimentação dos animais por 1 minuto, sendo repetido este procedimento por três vezes e tirando a média. Já o índice de diarreia foi realizado através da contagem do número de animais que excretaram fezes diarreicas, no mesmo período em que era realizada a contagem de tosse e espirro, e calculando-se a porcentagem de animais acometidos. O número de tratamentos antibióticos aplicados foi devidamente registrado, diariamente para todos os grupos de tratamento.

3.4.2.2 Avaliação do índice para pneumonia (IPP)

Ao abate, a incidência e extensão das lesões de consolidação pulmonar foram avaliadas em uma amostragem de 100 suínos machos (50 vacinados e 50 controle). Com o intuito de se calcular o índice para pneumonia (IPP), os pulmões foram classificados por escores com base na área de consolidação pulmonar. Sendo, Grau 0=normal, 1=até 25%, 2=26-50%, 3=51-75% e 4=maior que 76%, assim como recomendado por Morés *et al.* (2001).

3.5 Avaliação sorológica

Dos mesmos animais que foram submetidos à avaliação da segurança vacinal, foram coletadas amostras de sangue para avaliação sorológica, em 3 momentos distintos: na desmama, saída da creche e ao final da terminação. Desta forma, foi analisado um total de 120 soros de animais vacinados e 120 de animais controle.

3.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em que respostas paramétricas, com transformação

logarítmica ou não, e distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA). As variáveis não-paramétricas não-pareadas foram avaliadas pelo teste de Mann & Whitney e as variáveis não-paramétricas pareadas foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon. Quando necessário, a frequência das variáveis foi realizada pelo teste do qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., Carolina do Norte, USA). Considerou-se a diferença entre grupos experimentais com $p \leq 0,05$ como significativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da segurança

Durante as observações antes e após a aplicação do tratamento experimental, 100% (40/40) das fêmeas, apresentaram comportamento e apetite normais e 10% (2/20) das fêmeas do grupo vacinado apresentaram lesão no local da aplicação, menor que 5cm de diâmetro, do tipo eritema, nos dias 2, 3 e 4 após aplicação. Já dentre os machos, 100% (20/20) dos animais controle também apresentaram comportamento e apetite normais, e 5% (1/20) do grupo vacinado apresentou comportamento letárgico e anorexia, no segundo dia após aplicação. Além disso, 5% (1/20) do grupo controle e 10% (2/20) do grupo vacinado apresentaram lesão, no local da aplicação, menor que 5cm de diâmetro do tipo placa (área avermelhada e elevada), nos dias 2 e 3.

As variações de temperatura foram semelhantes em ambos os grupos de tratamento em todos os dias avaliados. Sendo que, não houve alterações significativas tanto de reações sistêmicas quanto locais, no grupo controle e vacinado, tanto de machos quanto de fêmeas.

4.2 Avaliação da eficácia

4.2.1 Indicadores de eficácia primários

4.2.1.1 Avaliação de desempenho

As tabelas 2, 3 e 4 demonstram o peso, GPD médio e taxa de refugagem, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi verificada no peso final, GPD e taxa de refugagem, tanto nas fêmeas quanto nos machos, durante o período da creche. Entretanto, na terminação os machos do grupo vacinado demonstraram diferença estatística no peso final ($p=0,029$) e GPD ($p=0,027$), sendo superior ao grupo controle. O mesmo não foi observado nas fêmeas, porém para peso final na terminação foi verificada tendência de melhores resultados ($p=0,07$). Além disso, é importante salientar que as taxas de refugagem no período da creche e terminação foram altas, tanto para os machos quanto para as fêmeas, sendo que o ideal é de 1% (Straw *et al.*, 2006). Em adição, a refugagem foi mais freqüente e expressiva na creche, quando comparada com a terminação.

Tabela 2 – Peso médio na saída da creche e final de acabamento.

Tratamento	Fêmeas		Machos	
	Creche (67 dias)	Terminação (149 dias)	Creche (67 dias)	Terminação (155 dias)
Controle	22,126 ± 1,986 a	86,807 ± 5,716 a	23,432 ± 5,837 a	104,234 ± 17,042 b
Vacinado	22,876 ± 3,018 a	88,312 ± 5,640 a	24,081 ± 5,812 a	106,970 ± 15,337 a
p	0,355	0,070	0,211	0,029

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através de análise de variância com valor de $p \leq 0,05$.

Tabela 3 – Média de ganho de peso diário médio na saída da creche e final de acabamento.

Tratamento	Fêmeas		Machos	
	Creche (67 dias)	Terminação (149 dias)	Creche (67 dias)	Terminação (155 dias)
Controle	0,371 ± 0,022 a	0,797 ± 0,034 a	0,404 ± 0,055 a	0,891 ± 0,002 b
Vacinado	0,388 ± 0,042 a	0,806 ± 0,042 a	0,420 ± 0,044 a	0,916 ± 0,012 a
p	0,372	0,408	0,232	0,027

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através de análise de variância com valor de $p \leq 0,05$.

Tabela 4 – Taxa de refugagem (%) na creche e terminação.

Tratamento	Fêmeas		Machos	
	Creche	Terminação	Creche	Terminação
Controle	9,560 (26/272) a	4,720 (12/254) a	8,650 (25/289) a	4,760 (13/273) a
Vacinado	7,010 (19/271) a	4,530 (12/259) a	8,330 (24/288) a	3,700 (10/270) a
p	0,282	0,961	0,891	0,540

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através de análise de variância com valor de $p \leq 0,05$.

4.2.1.2 Taxa de mortalidade

As taxas de mortalidade foram calculadas separadamente nas fases de

creche e recria/terminação (Tabela 5). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, tanto para as fêmeas quanto para os machos.

Tabela 5 – Taxa de mortalidade (%) na creche e terminação.

Tratamento	Fêmeas		Machos	
	Creche	Recria/Terminação	Creche	Recria/Terminação
Controle	0,420 ± 0,847 a (1/273)	6,915 ± 3,877 a (18/272)	3,090 ± 0,935 a (9/298)	5,572 ± 1,109 a (16/289)
Vacinado	1,180 ± 1,600 a (3/275)	4,380 ± 6,061 a (13/272)	1,917 ± 1,488 a (6/294)	6,390 ± 1,509 a (18/288)
p	0,508	0,566	0,403	0,456

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através de análise de variância com valor de $p \leq 0,05$.

4.2.1.3 Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica foi realizada em 56 animais, sendo que todos morreram naturalmente. Desses, 37 animais apresentaram sinais típicos da Síndrome da refugagem pós-desmame, sendo 66,7% (6/9)

de fêmeas do grupo controle e 76,9% (10/13) do grupo vacinado. Já dentre os machos, 64,3% (9/14) no grupo controle e 60,0% (12/20) no grupo vacinado foram avaliados. As lesões consideradas compatíveis com circovirose suína foram o não-colapso

pulmonar, áreas multifocais brancacentas nos rins e fígado, esplenomegalia, linfadenomegalia, úlceras gástricas e palidez generalizada. A frequência e representação das principais lesões observadas encontram-se na Tabela 6 e Figura 1. Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento. Outros tipos de lesões

não compatíveis diretamente com a circovirose suína também foram verificados em alta proporção em todos os grupos de tratamento, sendo hérnias inguinais, poliserosite fibrinosa, enterite hemorrágica, gastrite, abscessos multifocais e edema generalizado, as mais frequentemente encontradas.

Tabela 6 – Frequência das principais alterações macroscópicas.

Alterações macroscópicas	Fêmeas				Machos			
	Controle		Vacinado		Controle		Vacinado	
	Número de animais (n=9)	Frequência (%)	Número de animais (n=13)	Frequência (%)	Número de animais (n=14)	Frequência (%)	Número de animais (n=20)	Frequência (%)
Palidez generalizada	3	33,3	4	30,7	7	50	6	30
Pulmões não-colapsados	7	77,8	8	61,5	8	57,1	12	60
Linfadenomegalia	5	55,6	7	53,8	6	42,9	9	45
Esplenomegalia	4	44,4	6	46,1	6	42,9	11	55
Úlceras gástricas	5	55,6	7	53,8	6	42,9	9	45
Rim com focos Brancacentos	5	55,6	7	53,8	7	50	10	50
Fígado com focos brancacentos	5	55,6	8	61,5	8	57,1	11	55
Outras lesões	2	22,2	4	30,7	5	35,7	6	30

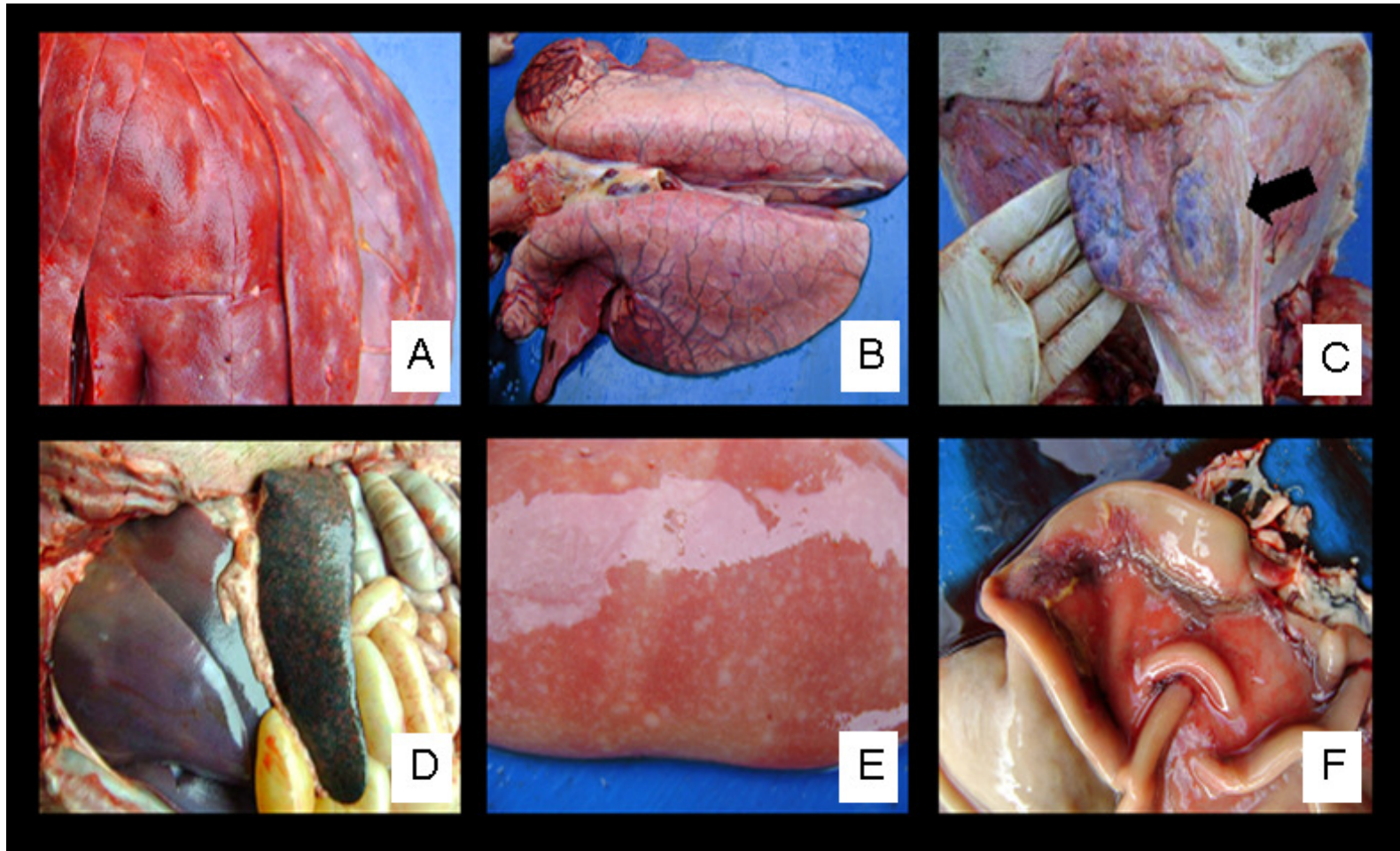


Figura 1: Lesões macroscópicas de circovirose observadas nos leitões. A – Fígado: Áreas multifocais brancacentas; B – Pulmão: Não-colapsamento pulmonar associado à intenso edema e áreas de consolidação; C – Linfadenomegalia; D – Esplenomegalia; E – Rim: Áreas multifocais brancacentas e F – Estômago: Úlceras gástricas.

4.2.1.4 Avaliação histológica

Os principais achados histopatológicos nos linfonodos, baço, tonsila, pulmão, rim e fígado estão resumidos na tabela 6 e representados na figura 2. Sete (7) animais foram excluídos da avaliação histopatológica devido a má conservação do material. Nos tecidos linfóides (tonsila, baço e linfonodo), a depleção linfóide foi frequente em todos os grupos experimentais, sendo observada principalmente no baço e linfonodo, com intensidade moderada. Contudo, apenas fêmeas do grupo controle, apresentaram depleção linfóide severa no linfonodo. A histiocitose moderada também foi frequentemente observada nos tecidos linfóides de todos os grupos de tratamento. Sendo que, no baço, fêmeas do grupo controle e machos do grupo vacinado, apresentaram histiocitose discreta. Formação de células gigantes multinucleadas (CGMN) e presença de corpúsculos de inclusão (CI) citoplasmáticos em histiócitos, foram observados no linfonodo e baço, porém em um pequeno número de casos (CGMN=7 e CI=3). Dentre as outras lesões observadas, não características da circovirose suína, estão hiperplasia linfóide no baço, linfonodo e tonsila; esplenite, peri-esplenite, tonsilite e linfadenite supurada, hemorragia e congestão em linfonodos.

Nos pulmões, a lesão mais frequente foi pneumonia intersticial moderada linfo-histiocitária, sendo semelhante em todos os grupos. Histiocitose associada à pneumonia intersticial ocorreu principalmente no grupo das fêmeas, sendo 20,0 e 23,1% no grupo controle e vacinado, respectivamente. Outras lesões observadas com menor frequência foram pneumonia, broncopneumonia, bronquite, pleuropneumonia fibrinosa e edema, com graus variados de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e neutrofílico. Nos rins, as lesões mais frequentes eram nefrite, nefrite intersticial e glomerulonefrite sem que houvesse predomínio de qualquer uma delas

e apresentando, principalmente, infiltrado linfo-histiocitário multifocal. Entretanto, considerou-se a nefrite intersticial linfo-histiocitária como sendo mais característica na circovirose suína. Essa variou de discreta a moderada em todos os grupos de tratamento e estava associada à histiocitose moderada em apenas uma fêmea do grupo vacinado. Já no fígado, a hepatite periportal linfo-histiocitária discreta foi a alteração mais frequente em todos os grupos experimentais. Com menor frequência, hepatite centro-lobular e aleatória, com graus variados de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e neutrofílico.

Tabela 7 – Frequência das principais lesões histopatológicas.

Lesões histopatológicas	Fêmeas				Machos			
	Controle		Vacinado		Controle		Vacinado	
	Número de animais (n=6)	Frequência (%)	Número de animais (n=12)	Frequência (%)	Número de animais (n=14)	Frequência (%)	Número de animais (n=17)	Frequência (%)
Baço								
Depleção linfóide	2	33,3	8	66,7	5	38,9	7	38,9
Histiocitose	3	50	2	16,7	2	16,7	5	27,8
Combinado depleção/histiocitose	2	33,3	2	16,7	1	5,6	2	11,1
Linfonodo								
Depleção linfóide	1	20	9	78,2	9	66,7	12	68,4
Histiocitose	4	60	7	61,5	5	38,1	8	47,4
Combinado depleção/histiocitose	1	20	4	30,8	5	33,3	7	42,1
Tonsila								
Depleção linfóide	0	0	4	30,8	4	31,6	7	38,5
Histiocitose	0	0	3	25	1	5,3	1	6,3
Combinado depleção/histiocitose	0	0	2	12,5	1	5,3	1	7,7
Pulmão								
Pneumonia Intersticial	4	60	7	61,5	4	31,6	9	50
Histiocitose	1	20	3	23,1	1	5,3	0	0
Combinado PI e Histiocitose	1	20	3	23,1	1	5,3	0	0
Rim								
Nefrite Intersticial	1	16,7	2	16,7	3	20	5	27,8
Histiocitose	0	0	2	16,7	0	0	1	5,6
Combinado NI e Histiocitose	0	0	1	8,3	0	0	0	0
Fígado								
Hepatite periportal (HPP)	1	16,7	2	15,4	6	42,1	4	23,5
Histiocitose	1	16,7	0	0	1	10,5	0	0
Combinado HPP e Histiocitose	1	16,7	0	0	2	12,5	0	0

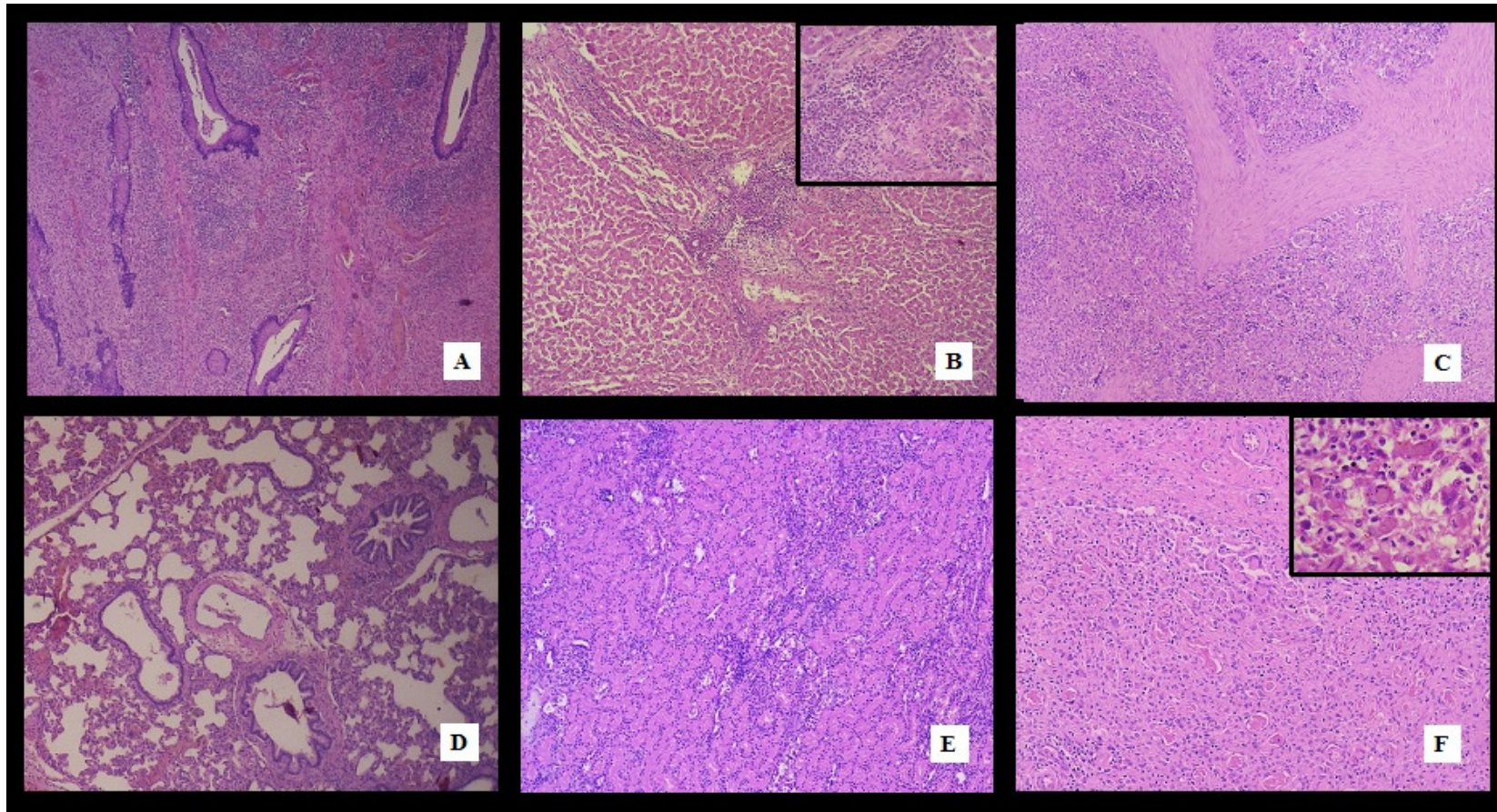


Figura 2: Lesões histopatológicas da circovirose. A, Tonsila - Depleção linfóide moderada, HE, 100X; B, Fígado - Hepatite peri-portal, HE, 100X; C, Baço - Depleção linfóide intensa, histiocitose e células gigantes multinucleadas, HE, 100X; D, Pulmão - Pneumonia intersticial, HE, 40X; E, Rim - Nefrite intersticial, HE, 100X e F, Linfonodo - Depleção linfóide intensa, histiocitose, células gigantes multinucleadas e corpúsculos de inclusão citoplasmáticos, HE, 100X (no detalhe corpúsculos de inclusão citoplasmáticos (seta), HE, 400X).

4.2.1.5 Avaliação imuno-histoquímica

Trinta e oito linfonodos de diferentes animais que apresentaram depleção linfóide de moderada a severa e/ou histiocitose foram submetidos à detecção de PCV-2 através da imuno-histoquímica. Nas fêmeas do grupo controle, 75,0% (3/4) dos animais tiveram marcação positiva em Grau 1. Já no grupo das fêmeas vacinadas 50,0% (6/12) tiveram marcação positiva, sendo um animal em Grau 1, quatro animais, distribuídos igualmente, entre os Graus 2 e 3, e um animal em Grau 4. Dentre os

machos, o grupo controle apresentou 66,7% (6/9) de marcação positiva, sendo três animais Grau 1, um animal Grau 2 e dois animais Grau 4. Já nos machos vacinados, 69,2% (9/13) apresentaram marcação positiva, sendo cinco animais em Grau 1, um em Grau 2, dois em Grau 3 e um em Grau 4. O baixo número de linfonodos com lesões que foram submetidos à detecção imuno-histoquímica não permitiu uma correlação entre a intensidade de depleção linfóide e o grau de marcação positiva. As marcações detectadas pela imunoistoquímica estão representadas na figura 3.

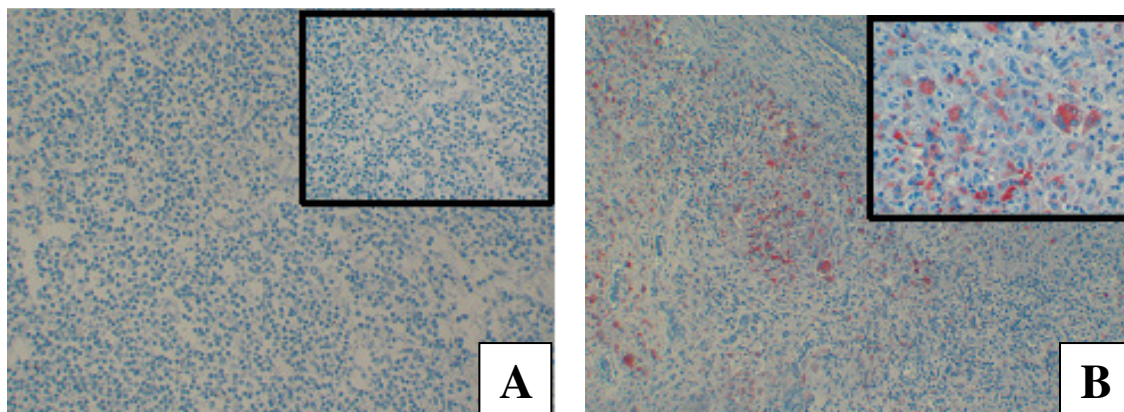


Figura 3: Linfonodo: Circovirose suína – Imuno-histoquímica. A – Observa-se marcação negativa, 100X (no detalhe, 200X) – Macho do Grupo Vacinado; B - Observa-se marcação positiva vermelha em células infectadas, 100X (no detalhe, 200X) – Macho do Grupo Controle.

4.2.2 Indicadores de eficácia secundários

4.2.2.1 Avaliação dos índices de tosse, espirro, diarreia e número de tratamentos antibióticos

Nas fêmeas, os espirros foram mais frequentemente observados do que a tosse e a diarreia. Já para os machos, a incidência de tosse, espirro e diarreia foram semelhantes. Entretanto, os índices de tosse, espirro e diarreia não diferiram estatisticamente entre os grupos experimentais, tanto nas fêmeas quanto nos machos (Tabela 8).

Tabela 8 – Índice de tosse, espirro e diarreia.

Tratamento	Índice de tosse (%)	
	Fêmeas	Machos
Controle	0,833 ± 0,945 a	2,836 ± 1,928 a
Vacinado	1,556 ± 1,743 a	2,437 ± 2,465 a
p	0,495	0,61

Tratamento	Índice de espirro (%)	
	Fêmeas	Machos
Controle	4,778 ± 2,930 a	2,899 ± 2,140 a
Vacinado	4,222 ± 1,743 a	3,689 ± 3,024 a
p	0,768	0,353

Tratamento	Índice de diarreia (%)	
	Fêmeas	Machos
Controle	1,611 ± 2,085 a	1,323 ± 1,900 a
Vacinado	1,944 ± 2,035 a	2,108 ± 2,635 a
p	0,302	0,566

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através do teste de Mann & Whitney com valor de $p \leq 0,05$.

Dentre os medicamentos aplicados individualmente estão incluídos principalmente antibióticos (sulfa-trimetoprim, amoxicilina e enrofloxaxina) e anti-inflamatórios. Não houve diferença

significativa entre o número médio de animais medicados entre o grupo vacinado e controle, tanto dos machos quanto das fêmeas (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de médio de animais medicados por dia de aplicação.

Tratamento	Fêmeas	Machos
Controle	7,089 ± 6,313 a	2,312 ± 1,447 a
Vacinado	7,017 ± 4,611 a	3,562 ± 2,780 a
p	0,481	0,255

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através do teste de Mann & Whitney com valor de $p \leq 0,05$.

4.2.2.2 Avaliação do índice para pneumonia (IPP)

A tabela 10 apresenta a área média e prevalência de consolidação pulmonar, e o índice para pneumonia (IPP). A frequência de pulmões com lesões de hepatização foi

alta em ambos os grupos. Entretanto, a área média de lesões foi considerada baixa (Escore 1). Não houve diferença estatística

entre os grupos de tratamento para nenhuma dessas variáveis.

Tabela 10 – Área e frequência de pneumonia.

Tratamento	Área (%)	Pulmões com lesão (%)	IPP
Controle	3,714 ± 6,708 a	67,600 a	1,048
Vacinado	6,075 ± 8,863 a	80,900 a	0,784
p	0,136	0,172	

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através de análise de variância com valor de $p \leq 0,05$. IPP – Índice para pneumonia

4.3 Avaliação sorológica

4.3.1 Perfil sorológico

O perfil sorológico da granja foi determinado através da técnica de IPMA (Imuno-peroxidase em monocamada de células) nas diferentes categorias, num estudo transversal. Os resultados, segundo cada categoria animal, estão representados na Figura 4. Nas porcas, 50,0% dos soros apresentaram titulação de 1:320 e 1:1280,

sendo considerados como médio. O restante dos soros apresentaram titulação baixa. Entre os leitões da maternidade, 57,9% dos soros apresentaram titulação média (variando de 1:320 a 1:1280). O restante apresentou titulação baixa (1:80). Nas outras fases de creche, recria e terminação, o título de anticorpos aumentou progressivamente sendo que, a soroconversão com altos títulos ocorreu na terminação (33,3% com título de 1:5120).

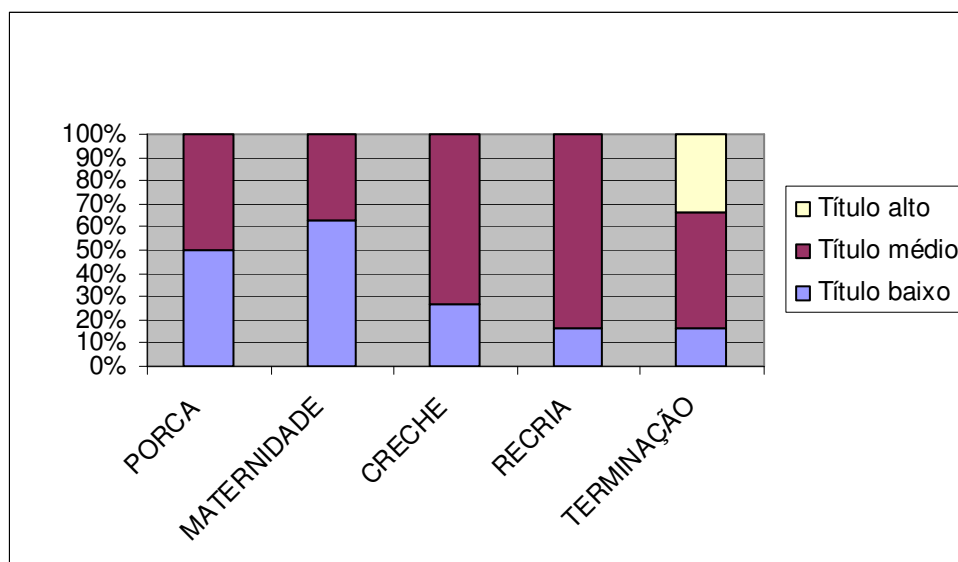


Figura 4 – Perfil sorológico da granja. Os títulos foram classificados como: <20, negativo; 20-80, baixo; 320-1280, médio e ≥ 5120 , alto.

4.3.2 Sorologia nos grupos experimentais

O comportamento do título de anticorpos anti-PCV-2 dos grupos vacinado e controle foram semelhantes tanto nas fêmeas quanto nos machos, nos três momentos avaliados. Na desmama, os animais apresentaram uma mediana de 1:320, sendo considerado um título médio de anticorpos. Já na saída da creche o título apresentado pelos animais foi considerado

baixo, cuja mediana foi de 1:20. Ao final, o título dos animais na terminação foi de 1:1280 e 1:3200 para as fêmeas do grupo controle e vacinado, respectivamente; e 1:5120 e 1:3200 para os machos do grupo controle e vacinado, respectivamente. Apesar dessa variação, o título de anticorpos na terminação não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, tanto nas fêmeas quanto nos machos, e foram considerados como alto (Tabela 11 e Figuras 5, 6, 7 e 8).

Tabela 11 – Média de títulos de anticorpos anti-PCV-2 obtidos por faixa etária*.

Tratamento	Fêmeas			Machos		
	Desmama	Creche	Terminação	Desmama	Creche	Terminação
controle	8,263 a	4,034 a	10,580 a	8,041 a	4,582 a	11,102 a
vacinado	8,560 a	4,775 a	10,919 a	8,399 a	4,797 a	10,887 a
p	0,509	0,097	0,212	0,763	0,853	0,682

* Média geométrica dos títulos após transformação logarítmica ($\log_2(\text{Tit} + 1)$). Letras distintas na coluna indicam diferença estatística através do teste de Mann & Whitney com valor de $p \leq 0,05$.

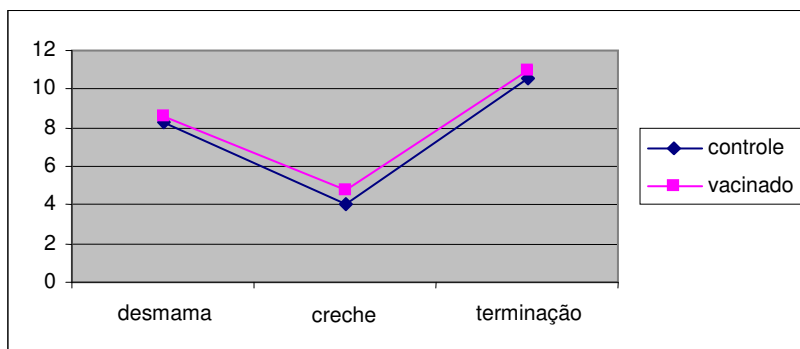


Figura 5 – Média de título de anticorpos obtidos nas fêmeas*. *Média geométrica dos títulos após transformação logarítmica ($\log_2(\text{Tit} + 1)$).

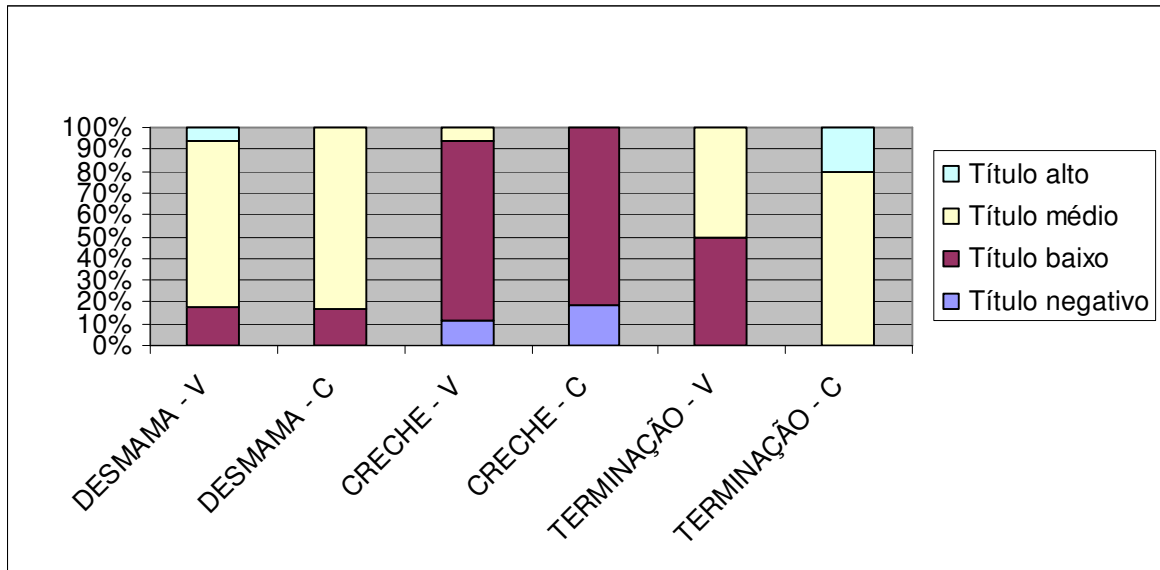


Figura 6 – Perfil sorológico das fêmeas. Os títulos foram classificados como: <20, negativo; 20-80, baixo; 320-1280, médio e ≥ 5120 , alto. V: grupo vacinado e C: grupo controle.

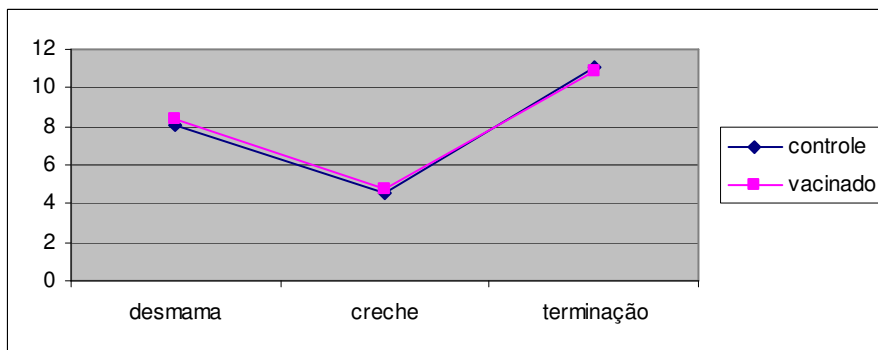


Figura 7 – Média de título de anticorpos obtidos nos machos*. *Média geométrica dos títulos após transformação logarítmica ($\log_2(\text{Tit} + 1)$).

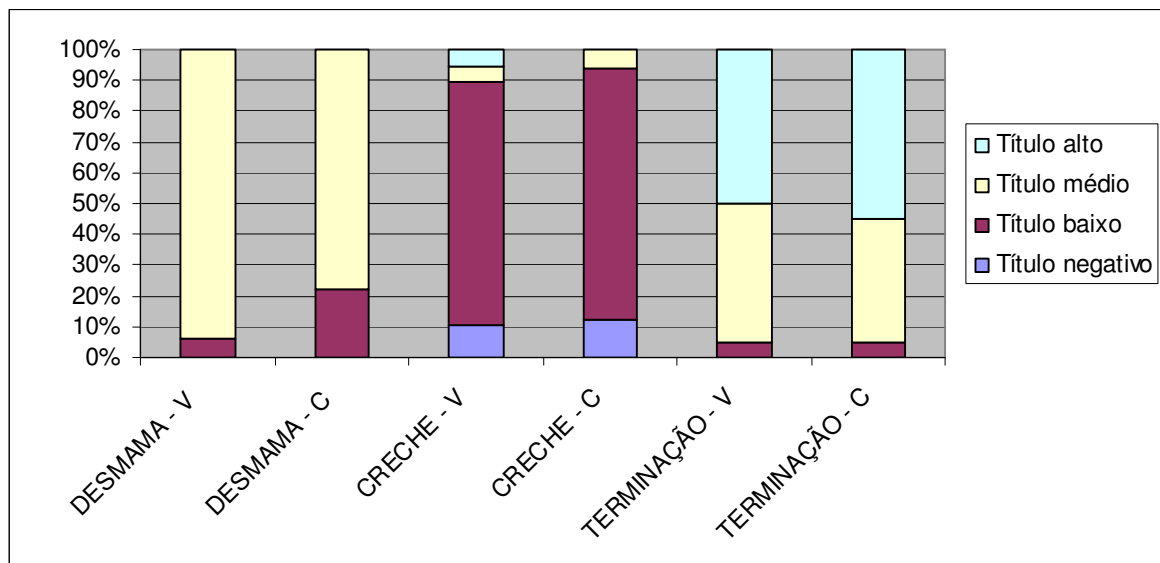


Figura 8 – Perfil sorológico dos machos. Os títulos foram classificados como: <20, negativo; 20-80, baixo; 320-1280, médio e \geq 5120, alto. V: grupo vacinado e C: grupo controle.

Em resposta as perdas econômicas relacionadas à circovirose suína, vacinas comerciais contra a infecção por PCV-2 tem sido avaliadas em várias partes do mundo. O presente trabalho relata a segurança e eficácia da aplicação em leitões de uma vacina comercial viral convencional (Circovac®) contra a circovirose suína, num rebanho multiplicador.

A avaliação da segurança clínica incluiu testes para determinar a toxicidade direta dos componentes da formulação e do potencial da vacina provocar efeitos colaterais. Para isso, mortalidade, sinais clínicos, consumo de ração e temperatura foram observados e mensurados sistematicamente antes e após a aplicação. As alterações sistêmicas e locais observadas após a aplicação da vacina não foram significativas, demonstrando segurança quando aplicada, em dose única de 0,5ml, em leitões ao desmame. Estes resultados estão de acordo com o observado por outros autores, ao testarem a mesma vacina em leitões ao desmame (Opriessnig *et al.*, 2009a; Pejsak *et al.*, 2009). Além disso, um estudo recente demonstrou uma ampla

margem de segurança da dose vacinal, quando 2ml desta mesma vacina foram aplicados por via intramuscular em leitões ao desmame sem que se observasse reações pós-vacinais (Opriessnig *et al.*, 2009a).

O peso final na creche e terminação, o ganho de peso diário (GPD) e taxa de refugagem são considerados parâmetros de mensuração prática para determinar a eficácia da vacinação em um grande número de animais. Dentre os indicadores primários de eficácia vacinal, os resultados do presente estudo demonstraram um aumento significativo no peso final e GPD, no grupo dos machos vacinados quando comparado ao grupo controle. Entretanto, nenhuma diferença estatística quanto a taxa de mortalidade foi verificada, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Estes resultados concordam com outros relatos, sob condições de campo (Fachinger *et al.*, 2008; Pejsak *et al.*, 2009). Fachinger *et al.* (2008) investigaram o efeito da vacinação contra PCV-2 em suínos que sofriam do complexo de doença respiratória suína (PRDC), observaram que os animais vacinados

tinham significativamente maior peso final e GPD quando comparado aos animais controle. Entretanto, nenhuma diferença estatística quanto à taxa de mortalidade foi verificada. Já Pejsak *et al.* (2009), compararam a eficácia de três diferentes protocolos de vacinação, antes e depois de um surto de SRPD, em um rebanho polonês. Foram utilizados os seguintes protocolos: vacinação apenas de porcas (duas doses de 2ml antes do parto), vacinação apenas de leitões (dose única de 0,5ml ao desmame) e vacinação de porcas e leitões, com vacina íntegra inativada (Circovac®). Todos os protocolos foram eficazes no controle da SRPD durante o surto, quanto a peso ao abate, GPD, mortalidade e conversão alimentar. Entretanto, antes do surto, houve melhora significativa apenas quanto ao peso ao abate e GPD. Já outros estudos verificaram diferença estatística na taxa de mortalidade entre animais vacinados e controle (Kixmoller *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2009), também sob condições de campo. No presente trabalho, o critério mais importante para a seleção da granja estudada foi a presença de elevada mortalidade associada ao diagnóstico da SRPD.

Levando-se em conta o significativo remanescente de mortalidade no grupo vacinado é seguro afirmar que outras condições não determinadas estavam desempenhando um importante papel na mortalidade, provavelmente de uma forma não-sinérgica com a vacinação. O fato da taxa de mortalidade (6,39 e 5,57%) dos animais vacinados e controle, respectivamente, durante a engorda ser comparável aos dados históricos da granja (5,27 – 6,00%) sugerem que os animais mantiveram-se com alto desafio. Assim, uma potencialização da infecção por PCV-2 através do estresse dos animais pelo excesso de manipulação durante o estudo, pode ser uma causa provável desses resultados, tal como foi verificado por Fachinger *et al.* (2008) e Pejsak *et al.* (2009). Além disso, apesar da tendência, nenhuma diferença estatística quanto ao peso final foi verificada

nas fêmeas ($p=0,07$). As condições de alojamento desses animais podem explicar essa ausência de diferença estatística. As baias das fêmeas eram de piso não ripado, sendo constituído de concreto e a remoção das fezes só ocorria após a saída do lote. Desta forma, o material fecal era acumulado por toda a fase de recria e terminação, o que não ocorria nas instalações dos machos. Segundo Caprioli *et al.* (2006), PCV-2 é principalmente transmitido entre suínos pelas rotas oro-fecal e/ou oro-nasal. Sendo assim, o desafio entre os animais numa mesma baia era consideravelmente maior, já que o contato direto com as fezes ocorria por um longo período na vida dos animais. Outro fator importante foi a taxa de lotação nas baias das fêmeas tanto do grupo controle quanto vacinado (média de 34,25, variando de 29 a 38 animais por baia) e a presença de apenas um comedouro por baia com espaço linear de 4,6cm por animal, sendo possível a ingestão de alimentos de apenas quatro animais de forma simultânea. Segundo Madec (2000), a taxa de lotação recomendada é de no máximo 30 animais por baia e o espaço linear mínimo por animal de 40 kg é de 5,5cm e de um animal de 100 Kg é de 7,4cm (Morés *et al.*, 2003). Finalmente, devido ao destino final das fêmeas, estes animais eram manejados frequentemente, com o intuito de selecionar os mais adequados para a reposição de marrãs. Desta forma, sendo a circovirose suína uma doença multifatorial em que condições estressantes podem agravar o quadro patológico do animal, todos os elementos citados acima são capazes de explicar a falta de diferença estatística encontrada no desempenho das fêmeas.

A melhora dos parâmetros de produção tem sido relacionada ao uso de vacinas contra circovirose suína, assim como apresentado acima (Fachinger *et al.*, 2008; Kixmoller *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008, Opriessnig *et al.*, 2009a; Segalés *et al.*, 2009). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito da vacinação nas lesões ocorridas em suínos naturalmente desafiados

com o vírus selvagem e na presença da SRPD potencial. Opriessnig *et al.* (2009a) ao testar a eficácia da aplicação de duas vacinas (viral convencional e de subunidade) contra circovirose suína em leitões SPF (specific-pathogen-free), relataram linfadenomegalia discreta em todos os grupos de tratamento. Além disso, escores de lesões linfóides nos animais vacinados foram significativamente menos graves que no grupo controle. Já Segalés *et al.* (2009), ao testar uma vacina quimera PCV-2/PCV-1, analisou apenas tonsilas, linfonodos mesentéricos e inguinais. Todos os cinco pontos considerados (depleção linfóide, histiocitose, hibridização *in situ*, combinação de depleção linfóide e histiocitose, e pontuação final patológica) foram menores ($p < 0,01$) nos suínos vacinados quando comparados ao controle. Esses resultados, eram provenientes de suínos aleatoriamente selecionados e sacrificados, entretanto lesões macroscópicas e microscópicas de tecidos linfóides e não-linfóides, de animais mortos naturalmente, não foram descritas nem analisadas estatisticamente. Desta forma, com o objetivo de abranger o conhecimento sobre as lesões encontradas em animais vacinados, necropsia completa e coleta de tecidos linfóides, pulmão, rim, fígado e coração para análise histopatológica e imuno-histoquímica, foram realizados dos animais mortos naturalmente.

Linfadenomegalia generalizada, não-colapso pulmonar, esplenomegalia, palidez e áreas brancacentas multifocais no rim e fígado foram consideradas compatíveis com a circovirose suína, assim como relatado por outros autores (Clark, 1997; Rosell *et al.*, 1999). Todas essas lesões foram observadas com alta frequência em ambos os grupos de tratamento, não havendo diferença estatística entre eles. Lesões microscópicas consistindo de infiltração linfo-histiocitária, histiocitose, formação de células gigantes multinucleadas e corpúsculos de inclusão citoplasmáticos também foram observados em diferentes

tecidos. E assim, como nas lesões anatomo-patológicas, uma alta frequência de lesões histopatológicas nos tecidos linfóides, pulmão, rim e fígado foi encontrada em todos os grupos, sem que houvesse diferença estatística entre eles. O efeito de redução das lesões em tecidos linfóides através da vacinação contra PCV-2 foi previamente descrito em condições experimentais (Fort *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2009; Segalés *et al.*, 2009). Segalés *et al.* (2009), ao analisar tecidos de tonsila e linfonodos de 300 suínos, aleatoriamente selecionados, verificou uma redução significativa da severidade das lesões em animais vacinados, sob condições de campo. Entretanto, como poucos relatos feitos à campo estão disponíveis, torna-se difícil a comparação dos resultados.

Vários métodos foram desenvolvidos para detectar PCV-2 nos tecidos e correlacionar a sua detecção com a presença de lesões. Entre eles, hibridização *in situ* (ISH) e imuno-histoquímica são os testes mais usados rotineiramente (McNeilly *et al.*, 1996; Rosell *et al.*, 1999). No presente estudo, a detecção imuno-histoquímica imuno-histoquímica ocorreu em uma alta proporção dos animais de ambos grupos experimentais com diferentes graus de distribuição. Entretanto, essa detecção não pôde ser correlacionada estatisticamente com as lesões histopatológicas e tratamento experimental. É comumente aceito que o PCV-2 é onipresente na população de suínos, mas não há um consenso sobre a prevalência do antígeno de PCV-2 nos tecidos de animais sadios e doentes (Opriessnig *et al.* 2007; Ramamoorthy e Meng, 2009). Contudo, tem sido demonstrado que a vacinação contra PCV-2 em leitões sob condições de campo é capaz de diminuir a proporção de suínos infectados, bem como a carga viral, usando diferentes metodologias: imuno-histoquímica imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e PCR em tempo real (Fachinger *et al.*, 2008; Horlen *et al.*, 2008; Kixmoller *et al.*, 2008; Segalés *et al.*, 2009).

Segalés *et al.* (2009) também não encontraram diferença significativa de detecção viral entre o grupo vacinado e controle, em uma granja das três avaliadas pelo método de PCR em tempo real. Desta forma, testes mais extensos e frequentes, provavelmente, mostrariam diferenças mais evidentes entre grupos, como tem sido demonstrado em avaliações experimentais (Fort *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2009; Opriessnig *et al.*, 2009a).

Apesar das lesões anatomoistopatológicas e detecção imunohistoquímica descritas no presente trabalho não terem apresentado diferença estatística entre o grupo vacinado e controle, não se pode afirmar que a vacina não foi eficaz no controle das lesões causadas por PCV-2. Como todas as avaliações foram realizadas em animais que morreram naturalmente, é esperada a ocorrência de lesões em ambos grupos experimentais. Talvez a evidenciação da melhora das lesões devido à vacinação seria possível através de uma amostragem aleatória e eutanásia de animais nos dois grupos experimentais, assim como foi realizado por Opriessnig *et al.* (2008 e 2009a) e Segalés *et al.* (2009).

Para abranger mais o conhecimento sobre o status de saúde dos animais do experimento, índices de tosse, espirro e diarreia foram avaliados no dia da desmama, 30 dias após e semanalmente durante as fases de recria e terminação, até o abate. Todos os três índices foram consideravelmente altos em todos os grupos experimentais, não apresentando diferença estatística entre eles. Ao abate, a frequência de machos com algum tipo de lesão pneumônica também foi alta, tanto no grupo vacinado (80,9%) quanto controle (67,6%). Assim como nos índices de tosse, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Segundo Morés *et al.* (2001), há uma correlação positiva não linear entre o índice de tosse e o índice de pneumonia (IPP). Apesar da caracterização detalhada do tipo de pneumonia e identificação do agente envolvido não terem sido realizadas, sabe-se

que os parâmetros de IPP e índice de pneumonia são inespecíficos, sendo causados por uma série de patógenos (Fachinger *et al.*, 2008). Por outro lado, a imunossupressão causada por PCV-2 aumenta a predisposição do indivíduo em desenvolver infecções secundárias. Desta forma, seja pelo efeito de PCV-2, seja pelo efeito de outros patógenos, o desafio infeccioso é bastante evidente neste plantel e nenhuma melhora vacinal neste contexto foi verificada. Além disso, nas descrições iniciais da doença, um dos problemas mais graves foi a falta de eficiência dos tratamentos antimicrobianos. No presente estudo, tentou-se verificar o efeito da vacinação sobre a frequência e necessidade de aplicações de medicamentos injetáveis. Entretanto, mais uma vez não foi observada diferença estatística entre os animais vacinados e controle, tanto machos quanto fêmeas. Em adição, o número médio de fêmeas medicadas foi visivelmente superior ao dos machos, refletindo claramente de forma indireta uma maior ocorrência de patologias nesses animais, e demonstrando mais uma vez a importância do controle dos fatores predisponentes não infecciosos. Segundo Segalés *et al.* (2009), o número médio de dias em que os suínos recebem tratamentos injetáveis foi maior ($p = 0,024$) no grupo controle (1,77 dias) do que no grupo vacinado (1,46 dias). No entanto, o número médio de dias de aplicação de tratamentos fornecidos na água foi menor ($p < 0,001$) no grupo controle (48,03 dias) do que no vacinado (50,14 dias). Já segundo Pejsak *et al.* (2009), em todos os protocolos de vacinação avaliados, o consumo de antibióticos diminuiu cerca de 1/3 no grupo vacinado quando comparado ao grupo controle, em relação ao período do surto da SRPD, mas sem diferença estatística. Além disso, a mesma redução não foi observada durante a avaliação fora do período do surto (período em que houve maior mortalidade e taxa de refugagem), sendo o grupo vacinado novamente semelhante ao controle. Em resumo, os resultados sobre o efeito da

vacinação no número de tratamentos antibióticos ainda é bastante inconsistente, refletindo, provavelmente, uma seleção não criteriosa dos animais para medicação. Na maioria dos sistemas de produção de suínos no Brasil, a seleção dos animais a serem medicados é realizada por funcionários sem capacitação técnica adequada. Em adição, um desafio viral muito grande na propriedade, associado aos fatores predisponentes infecciosos e não infecciosos, explicam, pelo menos em parte, a necessidade aumentada de medicações.

O perfil sorológico da granja foi determinado através da técnica de IPMA nas diferentes categorias, num estudo transversal. Foi verificado que, em porcas e leitões da maternidade, a titulação variou de baixa a média, sendo semelhante para ambos. Sugere desta forma, uma ingestão adequada de colostro pelos leitões. Não era esperada a titulação apresentada nas porcas, já que de um modo geral animais mais velhos em granjas positivas para circovirose suína apresentam alto título de anticorpos (Gerber *et al.*, 2009). Como porcas e leitões da maternidade foram mantidos num sítio separado das outras categorias, sugere-se que uma baixa circulação viral ocorra neste ambiente, levando a uma menor estimulação do sistema imune. Nas outras fases de crescimento (creche, recria e terminação), o título de anticorpos aumentou progressivamente, sendo que a soroconversão dos animais ocorreu entre a recria e terminação. No momento da aplicação vacinal, todos os grupos experimentais apresentaram título médio de anticorpos (1:320), sendo provavelmente referentes à presença de anticorpos passivos. Tendo em vista a possibilidade de interferência dos anticorpos passivos nas respostas vacinais, vários estudos foram conduzidos (Fort *et al.*, 2008; Kixmoller *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.* 2008). Todos demonstrando que a vacinação de leitões ao desmame induzem uma forte resposta humoral e o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, mesmo na presença de baixo

e médio título de anticorpos passivos. Opriessnig *et al.* (2009a) verificaram que a vacinação de ambos, porca e leitão, com vacina íntegra inativada (Circovac®) homóloga contra PCV-2 parece não ter efeito adverso sobre o desenvolvimento de proteção imune no leitão mesmo na presença da imunidade passiva. Segundo Gerber *et al.* (2009), quando a SRPD se manifesta mais tardiamente na granja (13-17 semanas de idade) e quando o perfil sorológico demonstra resultados negativos a título médio de anticorpos, em leitões em 1 a 2 semanas de idade, a vacinação deve ocorrer ao desmame. Desta forma, o período escolhido para aplicação da vacina foi adequado, mesmo na presença de anticorpos passivos.

Na saída da creche, o título de anticorpos foi novamente mensurado, apresentando-se baixo (mediana=1:20) em todos os grupos experimentais, tanto nas fêmeas quanto nos machos. Apesar de atualmente, a maioria das granjas demonstrarem maior impacto da circovirose suína nas fases de recria e terminação, a associação dos resultados de titulação ao fato de que a taxa de refugagem ocorreu, principalmente, na creche (todas taxas de refugagem encontram-se acima de 7,01% na creche e no máximo de 4,76% na terminação), sugere que a SRPD começa a se manifestar precocemente neste rebanho. Quando os animais são transferidos para creche, eles são expostos à diferentes co-fatores como infecções, mistura de lotes, inflamações, juntamente com a queda progressiva da imunidade passiva. Desta maneira, o PCV-2 presente pode ser favorecido (Pejsak *et al.*, 2009). Uma recente revisão abrangente que reúne todos os 44 ensaios artificiais disponíveis envolvendo o desafio com PCV-2 isolado ou associado a diversos produtos químicos, agentes virais e bacterianos, e co-fatores, demonstrou ser impossível induzir SRPD em suínos com mais de 6 semanas de idade. Isto sugere que as causas específicas da SRPD ocorrem desde as primeiras semanas de vida

dos leitões, mesmo quando a imunidade passiva ainda está presente (Tomas *et al.*, 2008). No final da terminação, o título de anticorpos foi considerado de médio a alto (\geq a 1:1280) para todos os grupos experimentais, não havendo diferença significativa entre eles. Segalés *et al.* (2009) também verificaram ausência do poder discriminatório, utilizando a técnica de IPMA, entre animais vacinados e não vacinados, em três granjas avaliadas. Por outro lado, no mesmo trabalho, o teste ELISA – VP2 demonstrou diferença significativa na porcentagem de suínos soropositivos entre animais vacinados e não vacinados, em duas das três granjas avaliadas, sendo que no grupo vacinado a porcentagem foi maior. Este teste consiste de um ELISA de captura que utiliza placas revestidas por uma proteína recombinante de PCV-2 e detecta anticorpos IgM e IgG específicos (Fort *et al.*, 2007). Atualmente, a medição semi-quantitativa de anticorpos no soro é realizada por testes de imunoperoxidase indireta (IPMA) em culturas celulares infectadas por PCV-2 (Ellis *et al.*, 1998). Entretanto, este teste apresenta uma significativa reação cruzada entre os antígenos PCV-1 e PCV-2 (Magar *et al.*, 2000). Além disso, pesquisas sorológicas revelaram uma alta prevalência de anticorpos anti-PCV-1 na população de suínos (Hines e Lukert, 1995; Tisher *et al.*, 1995). Assim, ferramentas específicas para detecção sorológica são essenciais para determinar a prevalência da infecção por PCV-2 e elucidar como a SRPD se desenvolve. Contudo, não foi possível a medição de anticorpos neutralizantes no presente estudo, porém há indícios que os animais vacinados apresentem uma maior proporção de soropositividade, já que diferenças estatísticas entre grupos experimentais foram verificadas. A vacinação dos leitões contra o PCV-2 causa um efeito significativo sobre a dinâmica de anticorpos contra o vírus (Fachinger *et al.*, 2008; Fort *et al.*, 2008; Kixmoller *et al.*, 2008; Opriessnig *et al.*, 2008; Fort *et al.*,

2009; Opriessnig *et al.*, 2009a). Este efeito consiste principalmente de uma soroconversão precoce de animais vacinados, que são posteriormente infectados em condições naturais ou experimentais. Segundo Fraile *et al.* (2007), quanto maior o título de anticorpos, maior a probabilidade de proteção contra infecção pelo PCV-2 e não desenvolvimento da SRPD. A alta taxa de refugagem (principalmente na creche) e de mortalidade (principalmente na recria/terminação) em todos os grupos experimentais também podem estar associadas ao baixo título de anticorpos nas porcas. Segundo Fraile *et al.* (2007), o risco de SRPD na prole de 33 matrizes suínas (31,4%) com baixo nível de anticorpos (título em 1:20) foi 3 vezes maior em comparação com a prole de 72 matrizes suínas (68,6%) com médio e alto nível de anticorpos título (entre 1:320 e 1: 2480). Juntamente com outro estudo (Harding *et al.*, 2008), isso indica que, em explorações afetadas, recém-nascidos estão expostos a maiores cargas PCV-2 durante as primeiras semanas de vida.

Finalmente, a vacinação é a estratégia mais viável e eficaz para prevenir, controlar e erradicar doenças infecciosas (Andre, 2003). Além disso, melhora o bem-estar animal e diminui o custo de produção de alimentos de origem animal (Pastoret, 1999). Uma vacina ideal deve ser barata, estável e adaptável à vacinação em massa, e conferir uma forte e longa imunidade duradoura com nenhum ou mínimos efeitos colaterais adversos (Bowersock e Martin, 1999). A seleção de vacinas adequadas e protocolos de imunização desempenham um papel importante na indução máxima de proteção. Apesar do presente estudo apresentar algumas variáveis com diferença estatística no grupo vacinado, trabalhos mais abrangentes, avaliando a dose vacinal e o período mais adequado para vacinação de leitões, precisam ser realizados.

5. CONCLUSÃO

A aplicação da vacina viral convencional contra circovirose suína, na dose única de 0,5ml por via intra-muscular, em leitões ao desmame apresentou-se segura e eficaz na melhoria do peso final e ganho de peso diário, em machos vacinados sob condições de campo no Brasil.

Entretanto, o mesmo resultado não foi verificado nas fêmeas devido, provavelmente, ao maior desafio e fatores predisponentes ao desenvolvimento de doenças que estes animais foram submetidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I. *et al.* Passive transfer of maternal antibodies to PCV2 protects against development of PMWS: experimental infection and a field study. *Pig J.* 50, 59–67, 2002.

ANDRE, F.E. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccin.* 21, 593–595, 2003.

BLANCHARD, P.; MAHE, D.; CARIOLET, R. *et al.* An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 94, 183–194, 2003.

BOWERSOCK, T.L.; MARTIN, S. Vaccine delivery to animals. *Adv Drug Deliv Reviews.* 38, 167–194, 1999.

CAPRIOLI, A.; MCNEILLY, F.; MCNAIR, I. *et al.* 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, 2006.

CARASOVA, P.; CELER, V.; TAKACOVA, K. *et al.* The levels of PCV2

specific antibodies and viremia in pigs. *Res Vet Sci.* 83, 274–278, 2007.

CARMAN, S.; CAI, H.Y.; DELAY, J. *et al.* The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease-2004-2006. *Can J Vet Res.* 72, 259–268, 2008.

CHAE, C. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet J.* 169, 326–336, 2005.

CHANG, H.W.; JENG, C.R.; LIN, T.L. *et al.* Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Vet Immunol Immunopathol.* 15, 207–219, 2006.

CLARK, E. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc Am Assoc Swine Pract.* 28, 499–501, 1997.

CLINE, G.; WILT, V.; DIAZ, E. *et al.* Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Vet Rec.* 163, 737–740, 2008.

COSTA, A.T.R.; LOBATO, Z.I.P.; REIS, R. *et al.* Avaliação da viremia e perfil sorológico em leitões vacinados e não vacinados com vacina autógena experimental contra PCV2. *XIII Congresso ABRAVES*, Florianópolis, 269, 2007.

DARWICH, L.; PIÉ, S.; ROUIRA, A. *et al.* Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol.* 84, 2117–2125, 2003

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. *et al.* Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched

- uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 236-242, 2002.
- DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; MATEU, E. *et al.* Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol.* 128, 857-874, 2004.
- DESROSIERS, R.; CLARK, E.; TREMBLAY, D. *et al.* Use of a one-dose subunit vaccine to prevent losses associated with porcine circovirus type 2. *J Swine Health Prod.* 17, 148-154, 2009.
- DOMINGO, M.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M. *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). *Vet Microbiol.* 111, 223-229, 2005.
- DOMINGO, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C. Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol.* 98, 137-149, 2004.
- ELLIS, J.A.; HASSARD, L.; CLARK, E. *et al.* Isolation of circovirus from lesions of pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J.* 39, 44-51, 1998.
- FACHINGER, V.; BISCHOFF, R.; JEDIDIA, S.B. *et al.* The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccin.* 26, 1488-1499, 2008.
- FENAUX, M.; OPRIESSNIG, T.; HALBUR, P.G. *et al.* A chimeric porcine circovirus (PCV) with immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *J Virol.* 78, 6297-6303, 2004.
- FANE, H.; XIAO, S.; TONG, T. *et al.* Immunogenicity of porcine circovirus type 2 capsid protein targeting to different subcellular compartments. *Mol Immunol.* 45, 653-660, 2008.
- FENG, W.H.; TOMPKINS, M.B.; XU, J.S. *et al.* Thymocyte and peripheral blood T lymphocyte subpopulation changes in piglets following in utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol.* 302, 363-372, 2002.
- FINSTERBUSCH, T. E MANKERTZ, A. Porcine circoviruses--small but powerful. *Virus Res.* 143(2), 177-183, 2009.
- FORT, M.; SIBILA, M.; ALLEPUZ, A. *et al.* Porcine circovirus type-2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccin.* 26, 1063-1071, 2008.
- FORT, M.; SIBILA, M.; PÉREZ-MARTÍN, E. *et al.* One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccin.* 27, 4031-4037, 2009.
- FRAILE, L.; CALSAMIGLIA, M.; ESPINAL, A. *et al.* Sow porcine circovirus type-2 (PCV2) status effect on litter mortality in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res Vet Sci.* 82, 299-304, 2007.
- GERBER, P.F.A.; GALINARI, G.C.F.; SILVA, M.X. *et al.* 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, 2009.
- GIBBS, M.J. E WEILLER, G.F. Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *PNAS.* 96, 8022–8027, 1999.
- GILLESPIE, J.; JUHAN, N.M.; DICRISTINA, J. *et al.* A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) is genetically stable in vitro and in vivo. *Vaccin.* 26, 4231–4236, 2008.
- GIRARD, C.; MORIN, M.; ELAZHARY, Y. Experimentally induced porcine proliferative and necrotising pneumonia with an influenza A virus. *Vet Rec.* 130, 206–207, 1992.
- GRAU-ROMA, L.L.; HJULSAGER, C.K.; SIBILA, M. *et al.* Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol.* 135, 272–282, 2009.
- HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; SACHVIE, C. *et al.* PCR detection and characterization of type 2 porcine circovirus. *Can J Vet Res.* 64, 44–52, 2000.
- HARDING, J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): Preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc West Can Assoc Swine Pract.* 21, 1996.
- HARDING, J.C.; BAKER, C.D.; TUMBER, A. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J Vet Diagn Invest.* 20(3), 274–82, 2008.
- HINES, R.K.; LUKERT, P.D. Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United states. *Swine Health Prod.* 3, 71–73, 1995.
- HORLEN, K.P.; DRITZ, S.S.; NIETFELD, J.C. *et al.* A field evaluation of mortality rate and growth performance in pigs vaccinated against porcine circovirus type 2. *J Am Vet Med Assoc.* 232, 906–912, 2008.
- JESTIN, A.; BLANCHARD, P.; MAHÉ, D. *et al.* An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 94, 183–194, 2003.
- JOISEL, F.; CHARREYRE, C.; BORDIN, E. *et al.* Vaccination of sows and gilts against pcv2 diseases: Field experiences in europe and canada. *In: Anais do XIII Congresso ABRAVES, Florianópolis,* 11–29, 2007.
- KENNEDY, S.; SEGALÉS, J.; ROVIRA, A. *et al.* Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest.* 15, 151–156, 2003.
- KIM, J. E CHAE, C. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs. *Vet J.* 167, 104–106, 2004.
- KIXMOLLER, M.; RITZMANN, M.; EDDICKS, M. *et al.* Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccin.* 26, 3443–3451, 2008.
- LAROCHELLE, R.; SAUVAGEAU, R.; MAGAR, R. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. *Can Vet J.* 35, 513–515, 1994.

- LIN, C.M.; JENG, C.R.; CHANG H.W. *et al.* Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in swine lymphocytes using mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from healthy PCV2-carrier pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 124(3-4), 355-366, 2008.
- LIU, J.; CHEN, I.; DU, Q. *et al.* The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo. *J Virol.* 80, 5065-5073, 2006.
- LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. *et al.* Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol.* 80, 8262-8274, 2005.
- LIU, Y.; DURING, M.J.; XIAO, W. High-titer, wild-type free recombinant adeno-associated virus vector production using intron-containing helper plasmids. *J Virol.* 74(24), 11456-11463, 2000.
- MACHADO, G.S.; FONTES, D.O. Interação entre imunidade, produção e nutrição de suínos. *Pork World.* 13, 2003.
- MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P. *et al.* Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest Prod Sci.* 63, 223-233, 2000.
- MADSON, D.M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S. *et al.* Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Pathol.* 46(4), 707-716, 2009.
- MAGAR, R.; MULLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can J Vet Res.* 64, 184-186, 2000.
- MANDRIOLI, L.; SARLI, G.; PANARESE, S. *et al.* Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol.* 97, 25-37, 2004.
- MATEU, E.; DARWICH, L.; SEGALÉS, J. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol.* 149, 857-874, 2004.
- MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.E.; VAN SOOM A. *et al.* Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. *Theriogenol.* 61, 91-101, 2004.
- McKEOWN, N.E.; OPRIESSNIG, T.; THOMAS, P. *et al.* Effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12, 1347-1351, 2005.
- McNEILLY, F.; ALLAN, G.M.; FOSTER, J.C. *et al.* Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. *Vet Immunol Immunopathol.* 49, 295-306, 1996.
- McNULTY, M., DALE, J., LUKERT, P. *et al.* Circoviridae. In: Proceedings of the Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, 299-303, 2000.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; NAUWYNCK, H.J. Enhancement of porcine circovirus 2 replication in porcine cell lines by IFN γ before and after treatment and by IFN α after treatment. *J Interferon Cytokine Res.* 25, 684-693, 2005
- MEIER, O. E GREBER, U.F. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med.* 6, 152-163, 2004.

MISINZO, G.; DELPUTTE, P.L.; LEFEBVRE, D.J. *et al.* Porcine circovirus 2 infection of epithelial cells is clathrin-, caveolae- and dynamin-independent, actin and Rho-GTPase-mediated, and enhanced by cholesterol depletion. *Virus Res.* 139, 1-9, 2008.

MISINZO, P.L.; DELPUTTE, P.; MEERTS, D.J. *et al.* Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol.* 80, 3487-3494, 2007.

MORES, N. Impacto econômico da circovirose na produção de suínos. *In: Anais do V Seminário Internacional de Aves e Suínos*, Florianópolis, 9-13, 2005.

MORÉS, N.; BARCELLOS, D.; ZANELLA, J.C. *et al.* *Doenças dos suínos: Circovirose suína.* – Goiânia: Cãnone Editorial, 2007, 213-225.

MORÉS, N.; BARIONI, J.R.; SOBESTIANSKY, J. *et al.* Estimativa dos índices de pneumonia, pela tosse, e de rinite atrófica, por espirros, em suínos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 53, 284-289, 2001.

MORÉS, N.; FÁVERO, J.V.; GIROTTO, A.F. *Produção de suínos.* Disponível na Internet: <http://www.cnpsa.embrapa.br>. Julho, 2003.

MORIN, M.; GIRARD, C.; ELAZHARY, Y. *et al.* Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: a newly recognized disease. *Can Vet J.* 31(19), 837-839, 1990.

Nota Técnica n°001/CPV/DFIP/SDA/MAPA. Vacina Autógena contra a Circovirose Suína. Disponível na Internet: <http://www.agricultura.gov.br>. Março, 2008. O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K. *et al.* Multiple porcine circovirus 2-

associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J.* 42, 551-553, 2001.

OHLINGER, V.F.; SCHMIDT, U.; PESCH, S. Studies on pathogenetic aspects of the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *In: Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society*, 577, 2000.

OPRIESSNIG, T.; KITIKOON, P.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 115(3-4), 261-72, 2006.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. *et al.* Porcine circovirus type-2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest.* 19, 591-615, 2007.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A.R.; ELSENER, J. *et al.* Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2. *Clin Vaccin Immunol.* 15, 397-401, 2008.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A.R.; MADSON, D.M. 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. *Vaccin.* 27, 1002-1007, 2009a.

OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A.R.; MADSON, D.M. *et al.* Difference in severity of porcine circovirus type two-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *J Anim Sci.* 87(5), 1582-1590, 2009b.

OSTANELLO, F.; CAPRIOLI, A.; DI FRANCESCO, A. *et al.* Experimental

- infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol.* 108, 179–186, 2005.
- PARK, J-S.; KIM, J.; HA, Y. *et al.* Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J Comp Pathol.* 132, 139–144, 2005.
- PASTORET, P.P. Veterinary vaccinology. *Comptes Rendus de Académie des Sciences – Series III – Sciences de la Vie.* 322, 967–972, 1999.
- PEJSAK, Z.; PODGÓRSKA, K.; TRUSZCZYŃSKI, M. Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* (2009) doi: 10.1016/j.cimid.2009.09.006.
- PESCH, S.; SCHMIDT, U.; OHLINGER, V.F. Proliferativenecrotizing pneumonia (PNP) is a result of coinfection with porcine reproductive and respiratory disease virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *In: Proceedings of the 16th International Congress on Pigs Veterinary Society*, 581, 2000.
- RAMAMOORTHY, S.; MENG, X.J. Porcine circoviruses: a minuscule yet mammoth paradox. *Anim Health Res Rev.* 10, 1-20, 2009.
- REYNAUD, G.; CHARREYRE, C.; DESGUILLES, S. *et al.* Safety of a repeated overdose of an inactivated adjuvanted PCV2 vaccine in conventional pregnant gilts and sows. *In: Proceedings of the 18th Congress International Pig Veterinary Society*, 87, 2004.
- ROSE, N.; MADEC, F. Occurrence of respiratory disease outbreaks in fattening pigs: relation with the features of a densely and a sparsely populated pig area in France. *Vet Res.* 33, 179-190, 2002.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Vet. Pathol.* 37, 687–692, 2000b.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; PLANADURÁN, J. *et al.* Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol.* 120, 59–78, 1999.
- ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.A. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec.* 146, 40–43, 2000a.
- SANCHEZ, J.R.R.E.; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H.J. *et al.* Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol.* 95, 15–25, 2003.
- SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; ROSELL, C. *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Vet Microbiol.* 85, 23–30, 2002.
- SEGALÉS, J.; FORT, M.; OLVERA, A. *et al.* Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol.* 125, 244–255, 2007.
- SEGALÉS, J.; PASTOR, J.; CUENCA, R. *et al.* Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Vet Rec.* 146, 675–676, 2000b.

- SEGALÉS, J.; PIELLA, J.; MARCO, E. *et al.* Porcine dermatitis and nephropathy syndrome in Spain. *Vet Rec.* 142, 483–486, 1998.
- SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; RODRIGUEZ-ARRIOJA, G. *et al.* Patología de la circovirus porcina. *Porci.* 56, 41–54, 2000a.
- SEGALÉS, J.; URNIZA, A.; ALEGRE, A. *et al.* A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccin.* (2009) doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.084.
- SHEN, H.G.; ZHOU, J.Y.; HUANG, Z.Y. *et al.* Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vaccines in mice. *J Gen Viro.* 89, 1857–1865, 2008.
- SHIBAHARA, T.; SATO, K.; ISHIKAWA, Y. *et al.* Porcine circovirus induces B cell depletion in pigs with wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci.* 62, 1125–1131, 2000.
- SIERRA, M.A.; DE LAS MULAS, J.M.; MOLENBEEK, R.F. *et al.* Porcine immune complex glomerulonephritis dermatitis (PIGD) syndrome. *Eur J Vet Pathol.* 3, 63–70, 1997.
- SMITH, W.J.; THOMSON, J.R.; DONE, S. Dermatitis/nephropathy syndrome of pigs. *Vet Rec.* 132, 47, 1993.
- SONG, Y.; JIN, M.; ZHANG, S. *et al.* Generation and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing cap protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol.* 119, 97–104, 2007.
- SORDEN, S.D.; HARMS, P.A.; PAUL, P.S. *et al.* Utilization of a rate enhancement hybridization buffer system for rapid in situ hybridization for the detection of porcine circovirus in cell culture and in tissues of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest.* 12(6), 562–565, 2000.
- STANLEY, E.R.; BERG, K.L.; EINSTEIN, B.D. *et al.* Biology and action of colonystimulating factor-1. *Mol Reprod Dev.* 46, 4–10, 1997.
- STEINER, E.; BALMELLI, C.; HERRMANN, B. *et al.* Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology.* 378(2), 311–322, 2008.
- STEINFELDT, T.; FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. *et al.* Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro. *Virology.* 291 (1), 152–160, 2001.
- STEVENSON, G.W.; KIUPEL, M.; MITTAL, S.K. *et al.* Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest.* 13, 57–62, 2001.
- STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S. *et al.* Diseases of Swine. 9^o Edição. *Blackwell Publishing.* 2006.
- THACKER, B.; THACKER, E. The PRDC battle continues. *Pig Progress.* 25, 16–18, 2000.
- THIBAUT, S.; DROLET, R.; GERMAIN, M.C. *et al.* Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol.* 35, 108–116, 1998.
- TISCHER, I.; BODE, L.; PETERS, D. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different

- breeding farms. *Arch Virol.* 140, 737-743, 1995.
- TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D. *et al.* Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch of Virol.* 91: 271–276, 1982.
- TOMAS, A.; FERNANDES, L.T.; VALERO, O. *et al.* A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol.* 132 (3-4), 260-273, 2008.
- VINCENT, I.E.; CARRASCO, C.P.; GUZYLACK-PIRIOU, L. *et al.* Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunol.* 115(3), 388–398, 2005.
- WANG, K.; HUANG, L.; KONG, J. *et al.* Expression of the capsid protein of porcine circovirus type 2 in *Lactococcus lactis* for oral vaccination. *J Virol Methods.* 150, 1–6, 2008.
- WANG, X.; JIANG, W.; JIANG, P. *et al.* Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice. *Vaccin.* 24, 3374–3380, 2006.
- WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICZ, C. *et al.* Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest.* 11, 530–532, 1999.
- YOSHIOKA, S.; MUKAE, H.; SUGIYAMA, K. *et al.* High-BAL fluid concentrations of RANTES in nonspecific interstitial pneumonia compared with usual interstitial pneumonia. *Respir Med.* 98, 945–951, 2004.
- YU, S.; VINCENT, A.; OPRIESSNIG, T. *et al.* Quantification of PCV2 capsid transcript in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in vitro. *Vet Microbiol.* 123(1-3), 34-42, 2007.
- ZANELLA, J.R.C. Vacinas suínas: o que temos de novidades? vacinas comerciais para circovirus suíno tipo 2 (PCV2). Online. Disponível na Internet: <http://www.cnpsa.embrapa.br>. Acesso em 14/08/2008.
- ZANELLA, J.R. E MORÉS, N. Diagnostic of Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by porcine Circovirus Type 2 (PCV2). *Arq Bras Med Vet Zoo.* 55, 522-527, 2003.