

Alessandra Silva Dias

**CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E PARVOVÍRUS SUÍNO: ESTUDO DO
ENVOLVIMENTO EM ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS EM MARRÃS E
PORCAS DE PRIMEIRO A TERCEIRO PARTO.**

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

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: profa. Zélia Inês Portela Lobato

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2010**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Paulo, que me ensinou o que é amar sem limites, que me educou com honestidade, sacrifício e muita luta, que me ensinou a ver o valor das vitórias e das derrotas. Ao meu maior ídolo, meu maior exemplo e grande motivo do meu esforço para terminar esta etapa, que ficou tão árdua sem a sua presença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Paulo (*in memorian*) e Vera, por se esforçarem tanto para que cada etapa da minha formação fosse possível, pela confiança, pelo apoio pessoal e financeiro e pelo amor incondicional. Aos meus irmãos Fábio (*in memorian*) e Carlos Henrique, pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora Zélia Inês Portela Lobato pela recepção, pela confiança e por tudo que fez por mim durante esses dois anos.

Aos proprietários das granjas por terem permitido o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários das três granjas pela importante ajuda e cooperação durante o experimento e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Aos gerentes das três granjas Gislaine, Edmilson, Elias e Marcos e ao médico veterinário Matheus pelo apoio e pela importante participação e esforço para que o trabalho desse certo. Ao Édson Campos, pela imensa cooperação e importante participação durante as coletas.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Animal, Patrícia, Fábiana, Ana Carolina, Izabelle, Maria Isabel e Luís.

À Grazielle, Priscilla e Amanda, que estiveram comigo pessoal e profissionalmente nos momentos em que eu mais precisei.

À Renata, pela amizade, pela companhia e por ter me ajudado na difícil fase de adaptação pessoal e profissional.

Ao Bruno Zambelli pelo companheirismo e apoio, à Ângela e ao Júlio pelo grande incentivo.

À minha tia Márcia, por ter me acolhido e incluído em sua família. À tia Célia, tia Lia e tia Mônica pelo apoio e preocupação.

À minha grande amiga Isabela e toda a sua família, por terem me acompanhado desde o começo desta etapa e pela torcida.

A todos os meus familiares e amigos, por acreditarem em mim e torcerem pelo meu sucesso.

Aos funcionários do DMVP Eduardo, Doracy, Graciela, José Roberto e Dercy pela cooperação.

Aos veterinários do LANAGRO-MG Ronnie e Alexandre pelo suporte técnico.

Ao veterinário José Eustáquio pela ajuda na seleção das granjas e pelo apoio durante o experimento. Aos médicos veterinários Marcos Barezani e Flávia Garrocho pelo auxílio durante as coletas.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo suporte necessário para o andamento do curso.

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2)	13
2.1.1. Histórico e distribuição	13
2.1.2. Classificação e Características Genômicas	14
2.1.3. Transmissão.....	15
2.1.4. Patogenia	16
2.1.5. Resposta imune	17
2.1.6. Doenças associadas ao circovírus suíno (PCVAD).....	18
2.1.6.1. Síndrome multissistêmica (PMWS)	18
2.1.6.2. Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS).....	19
2.1.6.3. Doença Respiratória	19
2.1.6.4. Infecção Subclínica	19
2.1.6.5. Enterite	19
2.1.6.6. Falhas Reprodutivas	19
2.1.6.6.1. Histórico e definição	19
2.1.6.6.2. Patogenia.....	20
2.1.6.6.3. Infecção em diferentes estágios da gestação	21
2.1.7. Vacinação.....	22
2.1.8. Co-infecção com outros agentes causadores de falhas reprodutivas.....	23
2.1.9. Diagnóstico	24
2.1.10. Controle.....	25
2.2. Parvovírus Suíno (PPV)	26
2.2.1. Histórico e distribuição	26
2.2.2. Classificação e características genômicas	27
2.2.3. Transmissão.....	28
2.2.4. Patogenia	28
2.2.5. Resposta imune	29
2.2.6. Diagnóstico	30
2.2.7. Controle.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Granjas estudadas	31
4.2. Animais e amostras coletadas	33
4.2.1. Matrizes.....	33
4.2.2. Leitões	33
4.3. Perfil sorológico	33

4.4.	Processamento laboratorial das amostras	33
4.4.1.	Soro	33
4.4.2.	Preparação de material proveniente de fetos mumificados e natimortos	34
4.4.3.	Teste de Imunoperoxidase em Monocamada Celular (IPMA) para a detecção de anticorpos anti-PCV2.....	34
4.4.4.	Teste da Inibição da Hemoaglutinação (IH).....	34
4.4.5.	PCR para Circovírus Suíno	35
4.4.5.1.	Extração de DNA	35
4.4.5.2.	PCR Convencional para PCV2	35
4.5.	Desempenho reprodutivo das porcas.....	35
4.6.	Análise estatística.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1.	Avaliação do desempenho reprodutivo das granjas estudadas.....	36
5.1.1.	Avaliação dos índices gerais das granjas	36
5.1.2.	Avaliação dos índices das porcas acompanhadas no estudo	37
5.2.	Perfil sorológico das granjas amostradas para PCV2.....	37
5.3.	Perfil sorológico das granjas amostradas para PPV	40
5.4.	Associação entre aumento no título de anticorpos e ocorrência de falhas reprodutivas	42
5.4.1.	PCV2	42
5.4.2.	PPV	44
5.5.	Indicativo da viremia para PCV2 nas porcas acompanhadas atuando no desenvolvimento de falhas reprodutivas	47
5.6.	Indicativos do envolvimento do PCV2 nas alterações reprodutivas	49
5.7.	Indicativo de envolvimento do PPV nas alterações reprodutivas	51
5.8.	Envolvimento simultâneo do PCV2 e PPV nas alterações reprodutivas.....	54
6.	CONCLUSÕES	55
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

Anexo 1 (Dados dos testes sorológicos para PPV e do desempenho reprodutivo da G1 durante o estudo).....	64
Anexo 2 (Dados dos testes sorológicos, da detecção de DNA viral para PCV2 em soro de porcas e tecidos fetais e desempenho reprodutivo da G1 durante o estudo)	66
Anexo 3 (Dados dos testes sorológicos para PPV e do desempenho reprodutivo da G2 durante o estudo).....	68
Anexo 4 (Dados dos testes sorológicos, da detecção de DNA viral para PCV2 em soro de porcas e tecidos fetais e desempenho reprodutivo da G2 durante o estudo)	71
Anexo 5 (Dados dos testes sorológicos para PPV e do desempenho reprodutivo da G3 durante o estudo).....	73
Anexo 6 (Dados dos testes sorológicos, da detecção de DNA viral para PCV2 em soro de porcas e tecidos fetais e desempenho reprodutivo da G3 durante o estudo)	75
Anexo 7 (Manejo reprodutivo das granjas estudadas)	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Perfil de anticorpos totais para PCV2 nas categorias porcas e leitões de 3, 7, 13 e 17 semanas de idade nas granjas 1 a 3.	39
Figura 2: Distribuição de anticorpos totais para PCV2 nas categorias porcas e leitões de 3, 7, 13 e 17 semanas de idade nas granjas 1 a 3.	39
Figura 3: Perfil de anticorpos totais para PPV nas diferentes ordens de parição das três granjas estudadas.	40
Figura 4: Distribuição de anticorpos totais para PPV em marrãs e porcas de todas as paridade de cada uma das três granjas estudadas.	41
Figura 5: Médias dos títulos de AT para PCV2 na CPC e na CP para as quatro categorias estudadas.	43
Figura 6: Distribuição de anticorpos para PCV2 por granja na CPC e CP para as quatro categorias estudadas.	43
Figura 7: Médias dos títulos de AT para PPV na CPC e CP para as quatro categorias.	45
Figura 8: Distribuição de anticorpos para PPV por granja na CPC e CP para as categorias estudadas.	45
Figura 9: Distribuição de porcas que apresentaram leitegadas com exposição fetal relacionadas ao PCV2 no total de desordens reprodutivas de cada granja no período estudado.	51
Figura 10: Distribuição de porcas que apresentaram leitegadas expostas ao PPV no total de desordens reprodutivas de cada granja no período estudado.....	53
Figura 11: Distribuição de casos de alterações relacionadas à exposição fetal ao PCV2 e o PPV simultaneamente nas alterações reprodutivas nas três granjas acompanhadas.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização das três granjas estudadas quanto à localização, número de matrizes, tipo de produção e vacinação para PCV2 e PPV.....	32
Tabela 2: Dados reprodutivos do plantel nas três granjas para porcas de primeiro a terceiro parto no período de seis meses correspondentes ao estudo.	36
Tabela 3: Frequências dos principais índices reprodutivos nas leitegadas estudadas e nas categorias de porcas acompanhadas.	38
Tabela 4: Frequência de animais soronegativos e médias dos títulos de anticorpos para PPV nas diferentes categorias do perfil sorológico realizado nas três granjas antes do início do estudo..	42
Tabela 5: Frequência de porcas que apresentaram aumento nos títulos de anticorpos dos níveis de negativo/baixo para médio/alto para PCV2 entre as granjas e categorias estudadas.....	44

Tabela 6: Média dos títulos de AT para PPV na CPC e na CP e comparação entre as granjas e categorias.....	46
Tabela 7: Relação entre a média dos títulos de anticorpos para PCV2 nas duas coletas e a ocorrência de viremia em todas as categorias e granjas estudadas.	48
Tabela 8: Associação entre a ocorrência de porcas virêmicas e a exposição fetal ao PCV2 (presença de leitões soropositivos ao nascimento e/ou fetos com DNA de PCV2) nas três granjas acompanhadas durante o estudo.	49
Tabela 9: Frequência de leitegadas com fetos mumificados e natimortos com DNA de PCV2 e número de fetos com DNA viral em cada categoria nas granjas 1 e 2.....	50
Tabela 10: Média de anticorpos para PPV nas duas coletas e frequência de leitegadas contendo fetos mumificados e leitões natimortos com anticorpos anti-PPV em conteúdo estomacal.	52
Tabela 11: Associação entre presença de anticorpos anti-PPV em conteúdo estomacal de leitões natimortos e mumificados e ocorrência de leitões soropositivos para PPV ao nascimento.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ADV- vírus da doença de Aujeszky
AT – anticorpos totais
Cap - proteína do capsídeo
CP- coleta do parto
CPC- coleta da pré-cobertura
CSFV- vírus da febre suína clássica
DMEM- meio Dulbecco Eagle modificado
ELISA- Ensaio Imunoenzimático
EMCV- vírus da encefalomiocardite
IHC- imuno- histoquímica
IIF- imunofluorescência indireta
IPMA- imunoperoxidase em monocamada celular
ISH- hibridização in situ
NT- nascidos totais
NV- nascidos vivos
ORF- - janela aberta de leitura
PCR- reação em cadeia da polimerase
PCV1- circovírus suíno tipo 1
PCV2- circovírus suíno tipo 2
PCVAD- doenças associadas ao circovírus suíno
PDNS- síndrome da dermatite e nefropatia suína
PEV- enterovírus suíno
PK-15- células de rim de suíno - 15
PMWS- síndrome de refugagem multissistêmica pós-desmama
PNP- pneumonia proliferativa necrozante
PPV- parvovírus suíno
PRDC- complexo de doenças respiratórias suínas
PRRSV- vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína
qPCR- reação em cadeia da polimerase quantitativa
RI- retroinfecção
SFB- soro fetal bovino
SIV- vírus da influenza suína
SPF- livre de patógeno específico
ST- célula de testículo de suíno
TAA- títulos de anticorpos aumentados
TLMV- mini vírus semelhante ao torque teno vírus
TTV- torque teno vírus

RESUMO

O envolvimento do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e parvovírus (PPV) em falhas reprodutivas em três rebanhos suínos (G1, G2 e G3) foi estudado pela associação entre a infecção natural de marrãs e porcas e sua leitegada por estes dois agentes. Amostras de soro de 143 matrizes coletadas antes da cobertura e após o parto e de dois a cinco leitões destas porcas foram testadas para a presença de anticorpos contra PCV2 e PPV. Soros das porcas também foram testados para viremia para PCV2. Amostras de tecidos de fetos mumificados e leitões natimortos das porcas acompanhadas foram investigados para a presença de DNA do PCV2. Conteúdo estomacal de leitões natimortos foi testado para a presença de anticorpos contra PPV. Não houve associação entre viremia para PCV2 e ocorrência de falhas reprodutivas nas porcas acompanhadas, bem como entre aumento de títulos de anticorpos para PPV e ocorrência de falhas reprodutivas. No entanto, houve associação entre a ocorrência de alterações fetais relacionadas ao PCV2 e PPV e a presença de falhas reprodutivas e entre a co-participação dos dois vírus e a presença de falhas reprodutivas. Ocorreu infecção transplacentária pelo PCV2 e PPV em porcas com títulos elevados de anticorpos, gerando leitões soropositivos e viáveis ao nascimento independente do uso da vacinação contra os dois agentes.

Palavras-chave: PCV2, PPV, falhas reprodutivas, infecção transplacentária, viremia

ABSTRACT

The involvement of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) in reproductive failures in three swine herds (G1, G2 and G3) was studied by the association of natural infection of gilts and sows and your offspring by these viruses. Sera of 143 sows before breeding and after farrowing and of two to five newborn pre-suckle piglets of these sows were submitted to antibodies detection against PCV2 and PPV. Sows sera were submitted to viral detection against PCV2. Tissues sample of mummified fetuses and stillborn piglets from followed sows were investigated to presence of PCV2 DNA. Stomach content from stillborn piglets was tested for the presence of antibodies against PPV. There was no association between viremia to PCV2 and reproductive failures in sows, as well as between PPV antibodies increase and reproductive failures. However, there was association between occurrence of fetal abnormalities related to PCV2 and PPV and the presence of reproductive failures, as well as between the co-participation of both viruses and the presence of reproductive failures. There was transplacental infection by PCV2 and PPV in sows with high antibodies titers, generating viable and seropositive piglets, regardless of vaccination against both agents.

Keywords: PCV2, PPV, reproductive failures, transplacental infection, viremia

1. Introdução

Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é um vírus da família *Circoviridae*, reconhecido por causar uma série de doenças denominadas “Doenças Associadas ao Circovírus Suíno” (PCVAD) que incluem a Síndrome da Refugagem Multissistêmica Pós-desmama (PMWS), Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS), Pneumonia Proliferativa Necrozante (PNP), Complexo de Doenças Respiratórias Suínas (PRDC), abortos e falhas reprodutivas (Park et al, 2005). Sua distribuição é mundial, ocorrendo em todos os tipos de criação de suínos e atinge rebanhos de ciclo completo, unidades produtoras de leitões e de diferentes sítios de produção, como crechários e terminadores (Sobestiansky e Barcelos, 2007).

Os primeiros relatos sobre o envolvimento do PCV2 no desenvolvimento da PMWS datam de 1991 quando este vírus foi diagnosticado no Canadá (Segalés et al., 2005). No Brasil, o primeiro relato do PCV2 foi realizado em 2000 por Zanella (2001) e desde então, tornou-se um agente extremamente estudado devido ao envolvimento em doenças que causam grande impacto econômico nos sistemas de produção.

As falhas reprodutivas nos suínos são de grande importância para o sistema de produção, pois causam perdas econômicas resultantes de fatores como redução no número de partos por fêmea por ano, redução na taxa de fertilidade, aumento no intervalo entre partos, redução na quantidade de leitões nascidos vivos, redução no número de leitões desmamados/fêmea/ano, dentre outros. Diversos agentes são associados a essas patologias e recentemente vários estudos têm relacionado o PCV2 a problemas reprodutivos na presença ou na ausência de outros agentes concomitantes (Segalés et al., 2005).

O recente aparecimento do PCV2 nos rebanhos mundiais e o do seu envolvimento em problemas reprodutivos têm levado a um questionamento sobre a sua participação direta ou associada ao parvovírus suíno (PPV) nestes tipos de alterações. Como estes dois agentes estão amplamente distribuídos nas granjas de todo o mundo é esperado que infecções isoladas ou concomitantes ocorram com frequência. Ainda faltam na literatura dados que permitam caracterizar as alterações reprodutivas relacionadas ao PCV2 e os que estão disponíveis são, em sua maioria, advindos de infecções experimentais evidenciando assim a necessidade de estudos a campo que auxiliem na compreensão do que realmente acontece nos sistemas de criação de suínos.

O PPV é um vírus muito resistente, não envelopado, com DNA fita simples de 5kb. Geralmente a infecção por este vírus em suínos em crescimento e fêmeas não prenhes não está associada à doença clínica, que se desenvolve principalmente quando fêmeas primíparas gestantes soronegativas são expostas ao vírus, pois este atravessa facilmente a barreira placentária e infecta embriões ou fetos. A transmissão pode ocorrer pelas formas horizontal e vertical, sendo a via oronasal a rota mais frequente de infecção. O PPV apresenta avidez por células em multiplicação ativa, demonstrando assim grande tropismo por tecidos fetais e envoltórios. Desta forma, fetos mumificados, natimortos e envoltórios fetais são importantes fontes de infecção do vírus (Sobestiansky e Barcelos, 2007).

2. Revisão da Literatura

2.1. Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2)

2.1.1. Histórico e distribuição

O circovírus suíno foi descoberto na Alemanha em 1974, inicialmente como um vírus não patogênico contaminante de

células de rim de suíno, PK-15, o PCV1. Este vírus é amplamente distribuído na população suína e não está associado à doença clínica (Segalés et al., 2005). Alguns anos depois, uma nova espécie de circovírus suíno foi isolada e identificada como sendo antigenicamente e genomicamente diferente do PCV1 e capaz de causar doença clínica e lesões em suínos, sendo então classificada como PCV2 (Allan e Ellis, 2000).

O PCV2 foi inicialmente isolado de suínos refugos no Canadá, e desde então tem sido amplamente descrito na literatura como agente causador da Síndrome da Refugagem Multissistêmica Pós-desmama (PMWS) (Larochelle et al., 2000), caracterizada por perda progressiva de peso, dispnéia, icterícia, diarreia, hipertrofia de linfonodos, pneumonia, hepatite e nefrite (Allan et al., 1999; Sobestiansky e Barcellos, 2007). Após esta primeira descrição, casos similares foram descritos nos principais países produtores de suínos, sugerindo que o PCV2 é amplamente distribuído nos sistemas de produção de suínos (Allan et al., 1999). O PCV2 já foi diagnosticado em todos os continentes, não havendo relatos, no entanto, da ocorrência de casos de doença associada ao vírus na Austrália (Grau-Roma et al., 2010). Uma série de doenças em suínos que incluem a Síndrome da Refugagem Multissistêmica Pós-desmama (PMWS), Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS), Pneumonia Proliferativa Necrozante (PNP), Complexo de Doenças Respiratórias Suínas (PRDC), enterites e doenças respiratórias estão relacionadas ao PCV2 (Segalés et al., 2005, McIntosh et al., 2006).

No Brasil o primeiro relato do PCV2 foi realizado por pesquisadores do Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Suínos e Aves no ano de 2000 (Zanella, 2001) e desde então, tornou-se um agente extremamente estudado devido ao envolvimento em doenças que causam

grande impacto econômico nos sistemas de produção. A partir disso, vários casos de isolamento do vírus foram relatados em outros Estados, mostrando a ampla distribuição do vírus na população suína no Brasil (Gava et al., 2008).

Suínos são frequentemente infectados entre dois a quatro meses de idade, fase em que estão na recria ou terminação (Darwich et al., 2004; Grau-Roma et al., 2010). Barbosa et al., (2008) verificaram em um perfil sorológico desenvolvido em granjas dos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul que 95,4% das amostras coletadas foram reagentes, com títulos de anticorpos anti-PCV2 encontrados em animais de 2 semanas até acima de 24 semanas. Além disso, os títulos declinaram nos grupos de animais de sete a treze semanas, aumentando a partir da faixa etária de 14 semanas. Isso mostra a circulação viral na granja e confirma a suscetibilidade dos animais de recria e terminação. Gerber et al., (2009) estudaram o perfil sorológico de 11 granjas de ciclo completo e encontraram diferenças na circulação do vírus entre as granjas.

2.1.2. Classificação e Características Genômicas

O PCV1 e PCV2 são vírus pequenos (17 nm), icosaédricos, não-envelopados, com DNA fita simples circular (Allan e Ellis, 2000). A molécula de DNA tem um tamanho próximo de 1759 Kb para o PCV1 e 1768 Kb para o PCV2 (Finsterbusch e Mankertz, 2009), sendo uns dos menores entre outros vírus animais (Sobestiansky e Barcellos, 2007). Esses vírus pertencem à família *Circoviridae*, que é dividida em dois gêneros de acordo com o tamanho do vírion e a estrutura genômica. O PCV1 e PCV2 estão incluídos no gênero *Circovirus*, juntamente com o vírus da doença das penas e bico dos psittacídeos, circovírus dos gansos, circovírus dos pombos, circovírus dos canários e dos patos. O outro

gênero, Gyrovirus, inclui o vírus da anemia das galinhas (Segalés et al., 2005).

PCV1 contém sete janelas abertas de leitura (ORFs) que codificam proteínas maiores do que 5 KD (quilodaltons) e o PCV2 contém 11 ORFs de 2 a 36 KD (Allan e Ellis, 2000). As principais ORFs são ORF1, ORF2, e, mais recentemente estudada, a ORF3. A ORF1 codifica a proteína Rep, essencial para a replicação do DNA viral. A ORF2 codifica a proteína Cap, uma proteína estrutural do capsídeo com massa molecular de 30 KD (Segalés et al., 2005) e a ORF3 codifica uma proteína não essencial para a replicação, mas com o papel de indução da apoptose pela ativação de mecanismos das caspases 8 e 3 (Sobestiansky e Barcellos, 2007). Achados recentes indicam uma ligação entre a patogenicidade do vírus com certas alterações na sequência da proteína Cap (Finsterbusch e Mankertz, 2009). Entre PCV1 e PCV2 a ORF1 exibe similaridade de 83% para nucleotídeos e 86% para aminoácidos enquanto que a ORF2 apresenta uma similaridade entre as duas espécies de 67% para nucleotídeos e 65% para aminoácidos (Allan e Ellis, 2000).

2.1.3. Transmissão

O PCV2 pode ser transmitido pela forma vertical e horizontal, sendo a via oronasal a mais freqüente (Bolin et al., 2001, Sobestiansky e Barcellos, 2007). O vírus foi detectado na cavidade nasal, em secreções tonsilares e bronquiais e em fezes e urina, sendo que a carga viral nestas rotas de excreção é maior em animais doentes (Segalés et al., 2005). DNA viral também foi detectado por PCR (reação em cadeia da polimerase) e isolado de swab nasal, retal, urinário, salivar, ocular e tonsilar (Segalés et al., 2005). Allan et al., (1995) inocularam suínos de um dia de idade por via oronasal e endovenosa, leitões de oito dias por via endovenosa e leitões de sete dias por via oronasal e verificaram que a combinação das vias oronasal e endovenosa maximizam

o acesso do vírus aos tecidos e células susceptíveis a infecção com o vírus.

A transmissão vertical pelo PCV2 pode ocorrer, podendo causar morte fetal, aborto, natimortos e mumificados (Farnham et al., 2003). Isso pode ser resultado de uma infecção primária, seguida de viremia. Na porca virêmica, o PCV2 é disseminado da circulação materna para a circulação fetal através de sua passagem pela placenta (Pensaert et al., 2004). Anticorpos anti-PCV2 vem sendo identificados em leitões mortos, provenientes de casos de falhas reprodutivas, sugerindo que ocorre infecção transplacentária pelo vírus (Johnson et al., 2002), e que esta infecção pode ocorrer em diferentes estágios da gestação (Sanchez et al., 2001). Park et al., (2005) inocularam seis porcas de primeiro e segundo parto com PCV2 três semanas antes do parto e isolaram PCV2 de fetos natimortos e de leitões nascidos destas porcas. Além disso, abortos iniciaram a partir de sete dias pós-inoculação e vírus também foi detectado nos fetos abortados, sugerindo então que o PCV2 pode atravessar a placenta em qualquer estágio da gestação. Estudos de infecções naturais em porcas também demonstram que pode haver infecção transplacentária do PCV2 (Madson et al., 2009d, Gerber, 2010, Hansen et al., 2010). West et al. (1999) investigaram a ocorrência de aborto no final da gestação e a presença de fetos mumificados e natimortos em um rebanho suíno infectado naturalmente, concluindo que pode haver transmissão intrauterina vertical, resultando em aborto, mumificação e natimortalidade.

A transmissão do PCV2 pelo colostro e leite foi investigada por Gerber (2010) em porcas naturalmente infectadas, vacinadas e não-vacinadas. Vírus infeccioso foi detectado em 53.6% das amostras de colostro, sendo que as porcas vacinadas eliminaram menor carga de vírus infeccioso nessa secreção quando comparadas a porcas não vacinadas. Infecção da glândula

mamária foi avaliada por Park et al. (2009) através de inoculação intranasal de PCV2 em porcas aos 93 dias de gestação. Antígeno viral foi detectado em células localizadas no lúmen da glândula mamária de todas as porcas infectadas. No entanto, células epiteliais da glândula mamária não foram contaminadas com o PCV2. As amostras de soro do leite coletadas até o terceiro dia pós-parto de todas as porcas inoculadas foram positivas para o PCV2. Além disso, DNA viral foi mais frequentemente encontrado no soro do leite do que na fração celular, sugerindo que o PCV2 pode não estar necessariamente ligado às células do leite (Park et al. 2009).

O PCV2 também pode ser eliminado pelo sêmen de varrões infectados, seja de forma natural ou experimental. Pouco se sabe sobre a quantidade de DNA viral que pode ser disseminado pelo sêmen de um único varrão ou sobre a carga viral necessária para causar doença em porcas e/ou leitões pela inseminação artificial. No entanto, sabe-se que o sêmen pode ser considerado um meio de transmissão do PCV2 (Gava et al., 2008; Madson et al., 2009a). A inoculação intranasal de varrões com PCV2 demonstrou que o anticorpos anti-PCV2 foram detectados em 75% dos animais aos 11 dias pós-inoculação e em todos os animais aos 18 dias pós-inoculação, persistindo até os 55 dias pós inoculação (Larochelle et al., 2000). Além disso, verificou-se que o vírus pode ser encontrado em infiltrado de macrófagos em diversos locais do trato reprodutor de varrões e ainda pode ser liberado intermitentemente no sêmen do 5º ao 47º dias pós-infecção (Larochelle et al., 2000). Um estudo de inoculação via intraperitoneal em varrões mostrou que não houve soroconversão de marrãs inseminadas artificialmente com sêmen destes animais inoculados, e que os leitões nascidos destas marrãs eram soronegativos para PCV2 (Madson et al., 2009c). No entanto, outro estudo demonstrou que a utilização de

sêmen contaminado com PCV2 para a inseminação de porcas susceptíveis e soropositivas resultou em infecção dos fetos durante a gestação, gerando mortalidade, natimortalidade e mumificação (Madson et al., 2009b).

2.1.4. Patogenia

O período de incubação varia entre duas a quatro semanas (Allan e Ellis, 2000, Darwich et al., 2004). Madson et al. (2009a) verificaram a soroconversão de porcas SPF infectadas experimentalmente com PCV2 aos 14 dias após inseminação artificial com sêmen contendo o vírus. Estudos sugerem que a replicação viral começa no linfonodo próximo ao local de infecção e dissemina sistemicamente (Yu et al., 2007). Além disso, PCV2 pode infectar células de origem epitelial, endotelial e mielóide, e isso pode ser uma explicação para a ampla difusão do vírus em tecidos animais infectados (Steiner et al. 2008).

O PCV2 replica em tecidos linfóides como timo, baço e linfonodos (Straw et al., 1999) sendo encontrado também no citoplasma de histiócitos, células gigantes multinucleadas e outras células da linhagem da linhagem dos monócitos/macrófagos como macrófagos alveolares, células de Kupffer e células dendríticas foliculares de tecidos linfóides (Darwich et al., 2004). Diante de resultados que demonstram que linfócitos T e B são importantes populações celulares que suportam a replicação do PCV2. Conclui-se que linfócitos são locais primários da replicação viral, enquanto monócitos podem ser locais para a persistência em animais infectados (Yu et al., 2007). Park et al. (2009), inocularam PCV2 intranasal em porcas soronegativas e avaliaram a presença do vírus em secreções lácteas. Como resultado, PCV2 foi detectado na glândula mamária em células com núcleo oval e abundante citoplasma, com morfologia semelhante à de macrófagos. Estudos relacionando o PCV2 com desordens reprodutivas sugerem que o

vírus se replica mais comumente no coração dos fetos (Sanchez et al., 2001, Yoon et al., 2004, Brunborg et al., 2007, Pittman, 2008), causando miocardites e dilatação do miocárdio (West et al. 1999;).

O vírus já foi detectado no endotélio de sinusóides e hepatócitos, células renais e pulmonares de fetos abortados, mumificados e natimortos filhos de porcas infectadas naturalmente (Wets et al, 2009). Johnson et al. (2002) detectaram PCV2 em linfonodos, fígado, baço e pulmão de leitões natimortos, de baixa viabilidade e nascidos vivos após inoculação intrauterina. PCV2 ainda foi encontrado em linfonodos, fígado, baço, tonsila e placa de Peyer de porcas infectadas experimentalmente (Park et al., 2009). Em outro estudo, Park et al. (2005) inocularam porcas soronegativas para PCV2 e encontraram vírus distribuídos nos centros germinativos de linfonodos (células com citoplasma abundante, semelhante a macrófagos) e na polpa vermelha do baço (células com núcleo oval e citoplasma moderado).

Mateusen et al, (2003) estudaram a infectividade do PCV2 em embriões em diversas fases de desenvolvimento (mórula, blastocisto precoce e blastocisto maduro) e concluíram que a zona pelúcida age com barreira física para a entrada do vírus, mas não impede que este atravesse seus pequenos canais e replique em embriões, levando a apoptose e reabsorção embrionária.

O genoma do PCV2 é muito pequeno e, por isso, seu ciclo de vida depende de fatores celulares do hospedeiro (Finsterbusch e Mankertz, 2009). O vírus necessita de células em elevada atividade mitótica para replicação do seu DNA (Mateusen et al., 2007) dependendo assim de enzimas expressas na fase S do crescimento celular (Allan e Ellis, 2000; Darwich et al, 2004). Sanchez et al. (2001) encontraram uma quantidade maior de cardiomiócitos,

macrófagos e hepatócitos infectados com PCV2 em fetos inoculados aos 57 dias de gestação quando comparado à inoculação aos 75 e 92 dias de gestação. Em leitões, o PCV2 geralmente é encontrado no citoplasma de macrófagos/monócitos, células de Kupffer e células dentríticas sendo que é raro encontrar o vírus no núcleo destas células (Darwich et al., 2004). De acordo com Sanchez et al. (2003), os alvos celulares do PCV2 mudam gradualmente de cardiomiócitos, hepatócitos e macrófagos durante a vida fetal para somente macrófagos após o nascimento.

2.1.5. Resposta imune

Atualmente, a maioria das porcas em idade reprodutiva é soropositiva para PCV2 e, com isso, seus leitões adquirem elevados níveis de anticorpos maternos contra o vírus. A meia vida dos anticorpos maternos em leitões desmamados é de 19 dias e esses níveis caem em quatro a seis semanas em animais com baixos níveis iniciais de anticorpos, e em 8,5 a 13,5 semanas em animais com altos níveis de anticorpos (Opriessnig et al., 2004). Estudos sugerem que a proteção de anticorpos maternos depende do nível dos anticorpos presentes: altos níveis de anticorpos maternos são protetores mas não previnem a infecção, enquanto baixos níveis não fornecem nenhuma proteção contra a infecção (McKeown et al., 2005; Ostanello et al., 2005).

Meerts et al. (2006) confirmaram que a ausência de anticorpos neutralizantes é um fenômeno recorrente em suínos com alta replicação do PCV2 e que a anticorpos maternos são capazes de neutralizar a infecção pelo PCV2, mas não evitá-la. Além disso, neste estudo a queda da viremia ocorreu simultaneamente com o aumento do título de anticorpos neutralizantes, sugerindo que a circulação viral na corrente sanguínea seja reduzida através de neutralização mediada por

anticorpos, constituindo um importante mecanismo de controle e recuperação da infecção (Meerts et al., 2006). Fort et al. (2009), ao infectarem experimentalmente leitões vacinados e não-vacinados com PCV2, observaram que animais com títulos de anticorpos totais $\geq 10.6 \log_2$ ou anticorpos neutralizantes $> 8 \log_2$ foram protegidos contra a viremia, enquanto leitões com anticorpos totais < 5.5 ou anticorpos neutralizantes < 3.9 foram potencialmente susceptíveis.

Carasova et al. (2007), ao estudarem a correlação entre soroconversão para PCV2 em leitões desmamados naturalmente infectados relacionando título de anticorpo com nível de viremia observaram que a queda de IgG a partir da segunda semana foi acompanhada pelo início do aumento de IgM a partir da oitava semana, provavelmente como resultado do estímulo do sistema imune causado pela replicação viral. Este aumento de IgM persistiu até a semana 16 com títulos elevados. No entanto, houve uma redução na concentração viral a partir da 12ª semana, indicando que houve neutralização do vírus por anticorpos específicos, juntamente com a ativação da imunidade celular (Carasova et al., 2007).

Calsamiglia et al., (2007) estudaram o efeito da porca nas taxas de mortalidade em rebanhos afetados por PMWS e observaram que o risco de mortalidade de leitões oriundos de porcas com baixos títulos de anticorpos anti-PCV2 era três vezes maior em relação a porcas com títulos médio a alto. Neste estudo, leitões oriundos de porcas infectadas com PCV2 no momento do parto tinham o dobro do risco de morrer do que leitões filhos de porcas não-infectadas.

2.1.6. Doenças associadas ao circovírus suíno (PCVAD)

O PCV2 é o agente causador de uma série de síndromes coletivamente conhecidas

como Doenças Associadas ao Circovírus Suíno. As PCVAD são globalmente emergentes e causam grande impacto nos sistemas de produção de suínos em diversos países (Gillespie et al., 2009). As PCVAD podem ser subclínicas ou incluir uma ou mais manifestações clínicas, dentre as quais pode-se citar a doença multissistêmica, doença respiratória, síndrome da dermatite e nefropatia, sinais entéricos e desordens reprodutivas (Gillespie et al, 2009).

2.1.6.1. Síndrome multissistêmica (PMWS)

A principal manifestação clínica descrita das PCVAD é a síndrome multissistêmica. A faixa etária em que a síndrome mais acontece varia de cinco a doze semanas de idade, com alguns casos descritos em animais de um até seis meses de idade (Sobestianky e Barcellos, 2007). A morbidade está associada com o desenvolvimento da viremia e linfopenia em leitões, seguidas por manifestações clínicas da doença (Gillespie et al., 2009). Morbidade e mortalidade dependem do rebanho, das práticas de manejo, da ocorrência de co-infecções, dentre outros fatores. Desta forma, valores comuns de morbidade em rebanhos afetados variam entre quatro e 30% e 70 a 80% dos animais afetados morrem (Segalés et al, 2005).

Os principais sinais clínicos da PMWS incluem perda de peso progressiva, dispnéia, aumento de linfonodos, icterícia, palidez da pele, e diarreia (Allan e Ellis, 2000; Chae, 2004; Darwich et al, 2004). As lesões macroscópicas mais observadas são linfadenopatia, envolvendo principalmente linfonodos inguinais, mesentéricos, bronquiais e mediastinais (Allan e Ellis, 2000), pulmões não colapsados e com áreas de consolidação nos lóbulos antero-ventrais e atrofia de timo (Darwich et al., 2004). Lesões hepáticas e renais podem ser encontradas com menor frequência (Allan e Ellis, 2000). Microscopicamente, podem ser encontrados vários graus de depleção

linfóide com infiltrados de histiocitos e/ou células gigantes. Essas lesões linfóides são encontradas nos linfonodos, tonsilas, placas de Peyer, baço e timo (Darwich et al., 2004). Em alguns casos são vistos corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos em células da linhagem dos histiócitos (Chae, 2004). Pneumonia intersticial, variados graus de hepatite, infiltração linfocítica e linfoistiocítica renal e atrofia das vilosidades intestinais são lesões encontradas em animais portadores da síndrome (Allan e Ellis, 2000).

2.1.6.2. Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína (PDNS)

A PDNS geralmente é fatal dentro de um prazo de três dias de desenvolvimento e afeta na maioria das vezes, suínos em fase de crescimento (Gillespie et al., 2009), podendo afetar também suínos na creche e, esporadicamente, adultos. Suínos com doença aguda severa morrem poucos dias depois do início dos sinais clínicos e os animais que sobrevivem tendem a recuperar e ganhar peso dentro de sete a 10 dias após o início da síndrome (Segalés et al., 2005).

Manifestações clínicas da síndrome incluem anorexia, depressão, prostração e relutância em movimentar. No entanto, o principal sinal clínico é o surgimento de máculas e pápulas irregulares na coloração púrpura, que se localizam na região dos membros posteriores e no períneo e tendem a coalescer (Segalés et al., 2005). Microscopicamente, podem ser observados vasculite sistêmica com necrose de derme e epiderme e glomerulonefrite fibrinosa e necrozante, que se assemelham muito à reação de hipersensibilidade do tipo III, causada pelo depósito de complexos imunes nas paredes dos vasos e capilares glomerulares. A co-infecção com outros agentes dos quais PRRSV, *Pasteurella multocida* e *Streptococcus suis*, dentre outros, auxilia no desenvolvimento da doença (Gillespie et al., 2009).

2.1.6.3. Doença Respiratória

Doenças respiratórias associadas ao PCV2 acometem geralmente suínos de oito a 26 semanas de idade e estão associadas com múltiplos patógenos. A sintomatologia clínica envolve redução na taxa de crescimento, redução na eficiência alimentar, anorexia, febre, tosse e dispnéia (Gillespie et al., 2009). Lesões histopatológicas incluem pneumonia broncointersticial granulomatosa com bronqueolite necrótica ulcerativa moderada a severa e fibrose bronquiolar (Fenaux et al., 2002).

2.1.6.4. Infecção Subclínica

A infecção subclínica pode estar limitada a um ou dois linfonodos na ausência da doença clínica. No entanto, a presença do PCV2 pode estar associada com a redução na eficácia da vacina e suínos saudáveis podem ainda exibir linfadenite necrozante. Esses achados podem causar condenação das carcaças durante o abate (Gillespie et al., 2009).

2.1.6.5. Enterite

Esta síndrome afeta leitões de oito a 16 semanas de idade e assemelha-se com a forma crônica da enteropatia proliferativa causada pela infecção pela *Lawsonia intracellularis*. Os leitões afetados têm diarreia, retardo no crescimento e ocorre um aumento na mortalidade. Lesões histopatológicas incluem enterites glanulomatosas, lesões nas placas de Peyer e em outros tecidos linfóides. Os linfonodos mesentéricos encontram-se aumentados e a mucosa intestinal espessada (Gillespie et al., 2004).

2.1.6.6. Falhas Reprodutivas

2.1.6.6.1. Histórico e definição

Atualmente, o PCV2 é considerado um possível agente causador de falhas reprodutivas em rebanhos suínos. O diagnóstico de falha reprodutiva associada

ao PCV2 é baseado em três critérios básicos: a) aumento de abortos no final da gestação e de natimortos e/ou mumificados; b) miocardite não supurativa fetal; c) detecção de antígeno de PCV2 em tecidos fetais afetados (Straw et al., 1999).

Vários estudos investigam a participação do PCV2 como agente causador de falhas reprodutivas. Alguns casos relatam a participação do PCV2 isolado ou com co-agentes. Um estudo realizado no Brasil descreve a participação do vírus na patogenia reprodutiva com co-participação da *Brucella spp* (Castro et al., 2010). Quintero et al. (2010) verificaram uma extensa distribuição do PCV2 causando falhas reprodutivas em vários estados do México. Em estudo realizado na França, Perreul et al. (2010) concluíram que o PCV2 deve ser incluído no diagnóstico diferencial de casos de falhas reprodutivas. Lipej et al. (2010) ao avaliarem amostras de fetos abortados e prematuros não detectaram o PCV2 em tecido cardíaco por PCR e IHC, nem lesões severas características da atuação do PCV2, concluindo que na Croácia, o vírus não tem grande importância como agente causador de falhas reprodutivas. Conclusão semelhante foi encontrada por Maldonado et al. (2005), que verificaram que na Espanha, falhas reprodutivas conseqüentes da atuação do PCV2 ou do PPV são raras. Neste país, PRRSV é o agente mais importante na patogenia da doença reprodutiva de causa infecciosa.

O primeiro relato de envolvimento do PCV2 em falhas reprodutivas em porcas foi feito por West et al., (1999) ao acompanharem um rebanho com histórico de abortos no final da gestação, partos com natimortos e mumificados, desenvolvimento mamário das porcas sem subsequente parição e retorno ao cio após expulsão de fetos mumificados. A sorologia de porcas e marrãs deste rebanho revelou alta prevalência de anticorpos para PCV2.

Amostras de tecidos fetais foram testadas para a presença de outros agentes associados a falhas reprodutivas como o PPV, PRRSV, EMCV e enterovírus, sendo negativas para todos os agentes, indicando então que o PCV2 pode causar patologia fetal significativa e subsequente aborto. A partir disso, vários estudos surgiram para investigar a participação do PCV2 em falhas reprodutivas em rebanhos suínos (O'Connor et al., 2001; Farnham et al., 2003; Pensaert et al., 2004; Pittman, 2008; Madson et al., 2009a; Hansen et al., 2010).

2.1.6.6.2. Patogenia

Alguns vírus, como o PPV, PRSSV e EMCV atravessam a placenta e anticorpos neutralizantes podem controlar a viremia, impedindo a disseminação do vírus. Por outro lado, alguns vírus somente atravessam a placenta associados a alguma célula, como é o caso do ADV e do vírus da febre suína clássica (CSFV). Estes vírus podem entrar em células sanguíneas mononucleares da mãe, fazendo destas um local primário de replicação (Pensaert et al., 2004). Park et al. (2005) inocularam porcas intranasalmente com PCV2 três semanas antes do parto e detectaram DNA viral em amostras de fetos abortados, sugerindo que o vírus pode atravessar a barreira placentária e infectar os fetos. A viremia é um processo essencial para que o vírus consiga ultrapassar esta barreira, podendo ocorrer com o vírus livre ou com o vírus associado à célula (Pensaert et al., 2004).

A maioria das porcas em idade reprodutiva é soropositiva para PCV2. Estudos experimentais de infecção com sêmen contaminado com PCV2 utilizando porcas soronegativas sugerem que a soroconversão ocorre em 14 dias após a inoculação (Madson et al., 2009a). Porcas negativas para PCV2 não soroconverteram após inoculação intrauterina de fetos em diferentes estágios da gestação (Yoon et al. (2004). Resultado semelhante foi encontrado por Mateusen et al., (2007),

quando inocularam PCV2 em embriões e transferiram a porcas imunes. Esta ausência de soroconversão em porcas gestantes inoculadas via intrauterina sugere que o vírus não é capaz de se replicar no tecido materno.

Em um estudo com inoculação de marrãs com oito meses de idade, soronegativas para PCV2, Pensaert et al. (2004) verificaram que o vírus infeccioso pode permanecer na corrente sanguínea por pelo menos 49 dias após a inoculação. Além disso, a viremia causada pelo PCV2 parece ocorrer com o vírus livre e também associado a células, porém esta última parece ser mais frequente por longos períodos. No mesmo estudo, Pensaert et al. (2004) inocularam fetos em diferentes estágios da gestação e observaram que aqueles inoculados aos 57 dias de gestação apresentavam altos títulos virais e nenhum anticorpo, e que fetos inoculados aos 21 dias de gestação não apresentavam nenhum título de vírus e anticorpo, sugerindo que o PCV2 não se dissemina rapidamente no útero.

Estudos realizados experimentalmente e a campo sugerem que o coração fetal é o principal alvo do PCV2 quando se trata de falhas reprodutivas (Sanchez et al., 2001; Sanchez et al., 2003; Brunborg et al., 2007; Enriquez et al., 2010; Ritterbusch et al., 2010; Sydler et al., 2010). No entanto, o vírus também é detectado em linfonodos, pulmão, fígado e baço (Sanchez et al., 2001; Johnson et al., 2002; Sanchez et al., 2003; Park et al., 2005; Saha et al., 2010). Ao avaliar a influência da idade gestacional na infecção pelo PCV2, Sanchez et al. (2001) verificaram que maiores títulos virais e lesões mais severas foram observadas no coração fetal, confirmando que o órgão é o alvo inicial do PCV2.

2.1.6.6.3. Infecção em diferentes estágios da gestação

A patogenicidade do PCV2 em fetos suínos pode estar relacionada à amostra do vírus e à idade fetal no momento da infecção (Farnham et al., 2003). Em um estudo, Mateusen et al. (2003) investigaram a capacidade de replicação do PCV2 em embriões suínos e a possibilidade de a zona pelúcida agir como barreira física ao vírus. Embriões nas fases de mórula com zona pelúcida intacta, mórula sem zona pelúcida, blastocisto precoce e blastocisto maduro provenientes de porcas imunes ao PCV2 foram inoculados com PCV2 e incubados por 48 horas, com posterior avaliação da morfologia e estágio de desenvolvimento. A porcentagem de embriões infectados foi significativamente influenciada pelo estágio de desenvolvimento, visto que 15% de embriões na fase livre de zona pelúcida, 50% dos embriões na fase blastocisto precoce e 100% dos blastocistos maduros foram infectados. Antígeno viral não foi detectado em células embrionárias de embriões com zona pelúcida intacta após 48 horas de inoculação, sugerindo que a zona pelúcida age como uma barreira física ao PCV2 (Mateusen et al., 2003).

Em outro estudo Mateusen et al. (2007) infectaram embriões de porcas imunes ao PCV2 e os transferiram a porcas também imunes ao vírus para investigar o efeito da transferência sobre a viabilidade e extensão da infecção nos embriões aos 14 dias pós-infecção, bem como os resultados nas porcas gestantes. Antígeno de PCV2 foi detectado em tecidos de todos os embriões não viáveis e quatro dos sete embriões viáveis recuperados de porcas que receberam embriões positivos para PCV2 exibiram células individuais ou pequenos grupos celulares contendo PCV2 em placenta, mesonéfron, fígado e tubo neural. A sobrevivência embrionária foi significativamente menor em embriões expostos ao PCV2 quando comparada aos embriões do controle negativo. Assim, a

transferência de embriões expostos ao PCV2 para porcas soropositivas afeta a gestação e a replicação do vírus antes dos 21 dias de gestação resulta em morte da maioria dos embriões (Mateusen et al., 2007).

Sanchez et al. (2001) inocularam fetos aos 57, 75 e 92 dias de gestação e observaram que a inoculação aos 57 dias gerou títulos de anticorpos para PCV2 mais altos, mais amostras de tecidos fetais positivas para antígeno viral e lesões mais severas do que aos 75 e 91 dias, sugerindo que o vírus se replicou mais intensamente aos 57 dias. Esses resultados corroboram a citação de Darwich et al., 2004, que descrevem que o PCV2 necessita de células em elevada atividade mitótica. Resultados do estudo desenvolvido por Sanchez et al. (2001) mostram que não houve contaminação viral em fetos adjacentes, sugerindo que não ocorre disseminação viral entre fetos no útero. Yoon et al. (2004) usaram a inoculação intrauterina em porcas no meio (54-76 dias) e no final da gestação (84-94 dias). Duas porcas de um total de sete inoculadas no meio da gestação abortaram em uma semana após a infecção. Apesar de parecer que a causa dos abortos tenha sido por infecção bacteriana, DNA viral foi encontrado em todos os fetos filhos destas porcas. Quatro porcas inoculadas no final da gestação abortaram num período de 21 dias pós-inoculação e as porcas remanescentes pariram leitões vivos e natimortos. A extensão da disseminação uterina do PCV2 entre os fetos e a morte fetal de cada leitegada foi diferente entre os grupos inoculados no meio e no final da gestação (Yoon et al., 2004).

A infecção no final da gestação também pode causar alterações reprodutivas. Park et al. (2005), ao infectarem porcas soronegativas para PCV2 e outros agentes causadores de falhas reprodutivas em três semanas antes do parto observaram aborto a partir do sétimo dia pós-inoculação, partos

prematureos, fetos natimortos e isolaram vírus patogênico em fetos natimortos e leitões nascidos vivos, sugerindo que o PCV2 pode atravessar a placenta em qualquer estágio da gestação. Um estudo de infecção intrauterina realizado em porcas soropositivas para PCV2 aos 86, 92 e 93 dias de gestação resultou em partos com fetos mumificados, natimortos e leitões com baixa viabilidade, mostrando que o PCV2 pode infectar fetos após inoculação uterina no final da gestação e causar doença reprodutiva (Johnson et al., 2002).

2.1.7. Vacinação

Atualmente não existe vacina licenciada para uso em porcas no objetivo de prevenir a infecção fetal. Estudos com vacina utilizada para porcas, no intuito de produzir elevada resposta imune para transferência aos leitões pelo colostro e leite, são realizados para avaliar os efeitos na redução de falhas reprodutivas. Apesar da escassa informação sobre a vacinação de porcas gestantes, alguns estudos sugerem que ela reduz a mortalidade pré-desmame e aumenta o número de leitões nascidos vivos, o que resulta em redução da morte fetal e de mumificados (Delisle et al., 2008; Ebbesen e Kunstmann, 2008; Joisel et al., 2008; del Campo et al., 2010).

Ao inseminarem porcas vacinadas e não vacinadas com sêmen contendo PCV2, Madson et al. (2009b) verificaram que uma porca vacinada apresentou-se virêmica 42 dias após a exposição ao vírus e 15/24 leitões filhos de porcas vacinadas foram virêmicos ao nascimento, antes que ingerissem o colostro. Com base nesses resultados, concluíram que a imunidade induzida pela vacinação foi incapaz de prevenir a infecção em útero. Gerber et al. (2010) pesquisaram níveis de anticorpos para PCV2 e a presença do vírus no leite, colostro e soro de porcas e leitões ao nascimento e de leitões aos 1, 20, 42, 63 e 84 dias pós-parto e verificaram que porcas apresentavam altos níveis de anticorpos no

soro e colostro e que 11/20 amostras de colostro e 5/20 amostras de leite continham vírus infeccioso. DNA viral foi encontrado no soro de 17/20 porcas e leitões apresentavam baixos níveis de anticorpos ao nascimento e 29 leitões apresentavam-se virêmicos um dia após o parto. Com base nesses resultados, Gerber et al., (2010) concluíram que a vacinação de porcas pode não prevenir a viremia no momento do parto e a disseminação do vírus no colostro.

Noirrit et al. (2010) acompanharam a vacinação de marrãs antes da inseminação artificial em um rebanho com histórico de abortos para verificar se o uso da vacinação influenciaria nos parâmetros reprodutivos do rebanho. O protocolo de vacinação incluía uma dose em marrãs ainda na quarentena seguida de uma segunda dose três semanas antes da inseminação. Parâmetros como taxa de aborto, taxa de retorno ao estro e taxa de partos tiveram melhora, apesar de não terem sido significantes e nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos de porcas vacinadas e não vacinadas.

Em uma descrição de caso de falhas reprodutivas em um rebanho, Muller et al. (2010) observou que, após a vacinação, os casos de aborto diminuíram de 3,6 para 1,3%. Apesar da considerada redução na taxa de aborto, altos níveis de micotoxinas foram encontrados no concentrado fornecido às porcas gestantes na ocasião dos surtos de aborto e a redução de micotoxinas a níveis aceitáveis também pode ter contribuído para a redução na taxa de aborto (Muller et al., 2010).

Apesar de alguns estudos já avaliarem a eficácia da vacinação de porcas na performance reprodutiva, a literatura ainda é escassa em resultados que comprovem que essa medida de controle pode prevenir a infecção de fetos em útero e, consequentemente, a ocorrência de falhas reprodutivas em rebanhos suínos.

2.1.8. Co-infecção com outros agentes causadores de falhas reprodutivas

Apesar do PCV2 ser necessário para causar depleção linfóide característica das PCVAD, algumas amostras virais requerem um co-fator para causar o quadro clínico (Gillespie et al., 2009). A co-infecção de suínos com PCV2 e outros agentes causadores de falhas reprodutivas parece aumentar a quantidade da carga viral de PCV2, as lesões associadas ao vírus e a incidência das doenças associadas ao PCV2 (Opriessnig et al., 2007). Kim et al., (2002) verificaram em um estudo de prevalência da PMWS que cerca de 85% dos casos em que a síndrome foi diagnosticada havia a co-infecção com outros agentes, e que em somente 15% dos casos o PCV2 foi encontrado isolado. Os agentes mais frequentemente encontrados em conjunto com o PCV2 são o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), vírus da influenza suína (SIV), parvovírus suíno (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Kim et al., 2002). Estudos recentes sugerem que a co-infecção do PCV2 com PPV e PRRSV podem ocorrer resultando em falhas reprodutivas mais severas e mortalidade neonatal (Ritzmann et al., 2005).

Um estudo investigou a prevalência da infecção com PCV2 e PRRSV em rebanho com histórico de síndrome e verificou que a ordem de parto da porca, status de infecção pelo PCV2 e título de anticorpos para PCV2 tinham efeito significativo sobre a co-infecção com PCV2 e PRRSV em leitões. Além disso, o risco de co-infecção para leitões filhos de porcas de primeira ordem de parição, porcas infectadas com PCV2 ou com baixos níveis de anticorpos para PCV2 era maior do que para leitões filhos de porcas de outras ordens de parição, porcas não infectadas com PCV2

ou com médios a altos títulos de anticorpos para PCV2 (Fraile et al., 2009).

No Brasil, o agente mais comumente associado a falhas reprodutivas é o PPV. Alguns estudos investigaram a presença deste agente agindo em casos de falhas reprodutivas em associação com o PCV2. Um estudo desenvolvido por Allan et al. (1999) pesquisou o efeito da co-infecção e da infecção isolada do PPV e do PCV2 em leitões de um e dois dias de idade. Resultados obtidos sugerem que a infecção isolada do PPV não causa lesão em suínos fora da fase reprodutiva, a co-infecção dos dois vírus resulta em lesão mais severa quando comparada às lesões provocadas pelo PCV2 isoladamente e a disfunção imune induzida pelo PPV aumenta a replicação do PCV2. Os resultados também sugerem que a infecção pelo PPV pode ativar macrófagos e monócitos, que são células alvo para a replicação do PCV2 (Allan et al., 1999).

Pescador et al. (2007), ao investigarem a prevalência do PCV1, PCV2 e PPV em fetos abortados e leitões natimortos no sul do Brasil, observaram que lesões mais graves foram encontradas em amostras que apresentavam co-infecção do PCV2 e PPV, indicando que a doença causada pela co-infecção dos dois vírus pode ser mais severa do que aquela causada pelo PCV2 isoladamente.

Sharma e Saikumar, (2010) desenvolveram um estudo em 70 leitegadas de porcas de primeira parição, totalizando 594 leitões. Falhas reprodutivas induzidas pela co-infecção com PCV2 e PPV caracterizadas por redução no tamanho da leitegada, aumento no número de natimortos e mumificados e morte neonatal foram observadas. Além disso, lesões mais severas foram encontradas em tecidos fetais de fetos co-infectados quando comparado com lesões causadas apenas pelo PPV. Esses resultados indicam um efeito

sinérgico entre o PPV e o PCV2 na patogenia das falhas reprodutivas (Sharma e Saikumar, 2010).

McDowell et al., (2009) avaliaram um surto de falhas reprodutivas em um rebanho e verificaram aumento drástico na taxa de mumificados para primíparas quando comparado a múltiparas. Resultados de sorologia e detecção viral indicaram que havia co-infecção de PCV2 e PPV, com lesões severas sendo atribuídas aos casos de infecção. Resultados semelhantes foram encontrados por Woods et al. (2009). Esses resultados ainda são inconclusivos e pouco se sabe sobre o papel do PCV2 como co-fator em falhas reprodutivas. Desta forma, mais estudos devem ser desenvolvidos para esclarecer a participação do PCV2 associado a outros agentes no desenvolvimento da doença reprodutiva.

2.1.9. Diagnóstico

O diagnóstico da PCVAD é feito seguindo três critérios específicos: 1) presença de sinais clínicos característicos; 2) presença de lesões histopatológicas características; 3) detecção de quantidades moderadas a altas de PCV2 nas lesões de suínos afetados (Finsterbusch e Mankertz, 2009). No entanto, a presença do PCV2 não implica necessariamente em alguma síndrome e sim na infecção pelo vírus (Chae, 2004). Se antígeno de PCV2 é encontrado apenas em um órgão, a doença é caracterizada com base naquele sistema. No caso de detecção de quantidades limitadas do antígeno em lesões severas, a síndrome pode ser considerada crônica (Gillespie et al., 2009).

A detecção de antígeno do PCV2 é considerada padrão-ouro para o diagnóstico das PCVAD. Os testes mais utilizados para fins diagnósticos são hibridização *in situ* (ISH), imuno-histoquímica (IHC) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Gillespie et al., 2009). A ISH e a IHC são utilizadas para avaliar a distribuição do PCV2 no tecido mamário de porcas

infectadas (Park et al., 2009), na detecção do PCV2 em tecidos de fetos abortados, natimortos e mumificados (West et al., 1999; O'Connor et al., 2001; Park et al., 2005). No entanto, a IHC é mais sensível do que a ISH, porém menos específica (Gillespie et al., 2009). Atualmente, a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) tem sido indicada por relacionar a carga viral à ocorrência das formas clínicas e subclínicas da infecção pelo PCV2, além de avaliar a progressão da infecção (Brunborg et al., 2004). Um estudo desenvolvido por Carasova et al., 2007 demonstrou que animais com mais de 10^7 cópias virais/ml de soro são considerados PCV2 e PCVAD positivos; valores abaixo desse limiar já permitem classificar esses animais PCV2 positivos, mas PCVAD negativos ou PCV2 e PCVAD negativos, se não houver amplificação do genoma viral. Hansen et al., (2010) utilizaram da qPCR para o diagnóstico do PCV2 como agente causador de falhas reprodutivas em rebanhos, sugerindo que a detecção de mais de 10^7 cópias virais/500ng em tecidos de fetos abortados, natimortos e mumificados pode confirmar o envolvimento do PCV2 nas falhas reprodutivas, enquanto que a detecção de 10^4 a 10^7 cópias virais/500ng de tecido serve apenas como indicativo desse envolvimento.

A detecção de anticorpos não parece ser indicativo da existência de um problema ou de doença severa (Allan e Ellis, 2000), visto que o vírus é amplamente difundido nos rebanhos suínos e encontrado inclusive em animais clinicamente saudáveis (Carasova et al., 2007). Testes sorológicos são úteis na avaliação da circulação do vírus e do momento em que ocorre a infecção dentro de um rebanho (Barbosa et al., 2008). As técnicas mais utilizadas para a detecção de anticorpos para PCV2 são a imunoperoxidase em monocamada celular (IPMA), imunofluorescência indireta (IIF) e ELISA. Técnicas sorológicas vêm sendo empregadas para estudos epidemiológicos

visando correlacionar títulos de anticorpos e viremia em animais naturalmente infectados pelo PCV2 (Carasova et al., 2007; Lobato et al., 2007); detectar o vírus no soro de fetos e recém nascidos (Farnham et al., 2003), correlacionar a presença de anticorpos neutralizantes e proteção contra a replicação do vírus e desenvolvimento das PCVAD (Meerts et al., 2006); acompanhar o status sorológico de suínos infectados naturalmente desde o nascimento até o abate (McIntosh et al., 2006); avaliar o efeito do título de anticorpos em porcas infectadas na mortalidade de leitões lactentes (Calsamiglia et al., 2007), detectar o PCV2 no soro e correlacionar ao perfil de eliminação (Shibata et al., 2003); avaliar a soroconversão e circulação viral em diferentes países (Grau-Roma et al., 2009) e o perfil sorológico em granjas com diferentes tipos de produção (Gerber et al., 2009).

2.1.10. Controle

A redução do estresse, cuidados com a higiene, a utilização do sistema “all in/all out”, a não mistura de lotes de animais de diferentes idades, desinfecção, limitação do contato entre animais, isolamento ou eutanásia dos animais doentes, manutenção da temperatura adequada, uso apropriado dos antiparasitários e vacinação, dentre outros, constituem medidas básicas no controle da circovirose suína (Grau-Roma et al., 2010). A circovirose suína é uma doença multifatorial, que envolve a infecção de suínos com o PCV2 e a influência de fatores infecciosos e não infecciosos responsáveis pelo desenvolvimento da doença clínica (Segalés et al., 2005). Desta forma, é importante que se tenha o controle dos fatores que interferem no desenvolvimento da doença, que incluem medidas de manejo, controle dos agentes responsáveis pelas co-infecções, estímulo da resposta imune, nutrição, dentre outros. O controle destes fatores pode ser feito pela implementação dos 20 pontos de Madec, que visam reduzir

a pressão de infecção do PCV2 e de outros agentes, melhorar a higiene e reduzir o estresse os diferentes estágios do sistema de produção (Madec et al., 2001).

A sobrevivência dos leitões neonatais depende da ingestão do colostro durante as primeiras horas de vida. Esse colostro fornece ao recém nascido anticorpos maternos gerados pelo estímulo antigênico do sistema imune da porca, que produz basicamente IgG e IgM, responsáveis pela neutralização dos patógenos (Salmon et al., 2009). Desta forma, a vacinação em porcas é usada para aumentar a transferência de anticorpos passivos à leitegada. Estas vacinas induzem a produção de altos níveis de IgG, IgM e IgA, além de fatores celulares, que são transferidas aos leitões.

Atualmente quatro vacinas são utilizadas no controle da circovirose suína, sendo que uma delas é registrada para o uso em porcas e marrãs e três são registradas para o uso em leitões. A primeira vacina a entrar no mercado foi a Circovac (Merial, Lyon, France), uma vacina inativada, com adjuvante oleoso, indicada para uso em porcas. O protocolo de uso sugere aplicação de duas doses antes da inseminação artificial/monta, duas doses de reforço entre quatro e duas semanas antes do parto e uma dose de reforço a cada parto subsequente. Duas vacinas foram desenvolvidas para leitões baseadas na expressão da proteína Cap do PCV2 em sistema de baculovírus (Ingelvac CircoFLEX, Boehringer Ingelheim e Circumvent PCV, Intervet Inc, Whitehouse Station, USA) e uma terceira vacina recombinante foi desenvolvida com partículas quiméricas de PCV1-2 inativadas (Suvaxyn PCV2 One dose, Fort Dodge/Pfizer Animal Health, USA). Essas três vacinas foram desenvolvidas para leitões com três a quatro semanas de idade.

Todas essas vacinas tem se mostrado eficazes na redução da mortalidade, melhora da conversão alimentar,

diminuição da frequência de co-infecções em estudos de campo (Opriessnig et al., 2007) além de redução da carga viral e de lesões linfóides induzidas pela PMWS (Opriessnig et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a vacinação contra PCV2 é eficaz no estímulo da produção de anticorpos neutralizantes e de resposta imune celular mesmo em leitões com imunidade passiva no momento da vacinação (Opriessnig et al., 2008). Segundo Kekarainen et al., (2010) a vacinação de porcas melhora as taxas de parto e os problemas de infertilidade.

2.2. Parvovírus Suíno (PPV)

2.2.1. Histórico e distribuição

O parvovírus suíno (PPV) é o principal agente infeccioso relacionado com falhas reprodutivas sendo endêmico na maioria dos rebanhos suínos. O primeiro relato de falhas reprodutivas associadas ao PPV foi feito por Cartwright e Huck (1967) na Inglaterra, quando o vírus foi isolado de fetos abortados e natimortos. Atualmente, o PPV é encontrado em todos os continentes, e considerado a principal causa infecciosa de problemas reprodutivos em suínos (Mengeling et al., 2000), que envolvem uma sintomatologia clínica definida por falha na concepção, retorno ao estro, morte embrionária e fetal com reabsorção, mumificação, leitegadas pequenas, natimortos, morte neonatal e aborto, este último menos frequente (van Leengoed et al., 1983).

Estudos de prevalência indicam que o vírus é altamente disseminado no Brasil. Rodriguez et al. (2003) encontraram prevalência da parvovirose suína em rebanhos no norte do país superior a 79,9%. Gouveia et al., (1984) verificaram alta prevalência de anticorpos para PPV em rebanhos suínos localizados em Minas Gerais e os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados em estudos realizados, na Europa, África, Austrália e

América do Norte. Estudos sorológicos em rebanhos suínos comerciais indicam que o PPV está presente no país há pelo menos duas décadas, causando falhas reprodutivas (Gouveia et al., 1984).

2.2.2. Classificação e características genômicas

O PPV pertence à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae* e gênero *Parvovirus*, que inclui as espécies de parvovírus de camundongos 1, parvovírus de galinha, parvovírus H-1, parvovírus HB, parvovírus Kilham de ratos, parvovírus Lapine, parvovírus RT, parvovírus suínos, vírus Lull, vírus da panleucopenia felina, parvovírus canino, dentre outros (Gava et al., 2009). Um novo parvovírus encontrado acidentalmente em soro de suínos e não relacionado com a indução de doença reprodutiva foi denominado parvovírus suíno 2 (Hijikata et al., 2001). Recentemente, um novo gênero denominado Hokovirus foi proposto por incluir um vírus isolado em suínos saudáveis e doentes, identificado como PPV3 (Lau et al., 2008). Cheung et al., (2010) identificaram um vírus em co-infecção com o PCV2, denominado PPV4, em casos de doença severa associada ao PCV2 a campo. No entanto, o potencial patogênico do PPV4 ainda não está esclarecido.

O PPV é um vírus pequeno (22 a 25 nm) e seu material genético é uma fita simples de DNA contendo cerca de 5000 nucleotídeos. Somente a fita negativa do DNA é incluída no capsídeo para formar os vírions. É um vírus esférico, com capsídeo icosaédrico, não envelopado, o que lhe confere resistência a solventes de gorduras e detergentes, e resiste até uma hora a 37°C em ampla faixa de pH (Sobestianky e Barcellos, 2007).

O genoma do PPV apresenta duas fases abertas de leitura (ORFs), sendo que a primeira codifica para proteínas não

estruturais (NS-1, NS-2 e NS-3) e a segunda codifica para três proteínas do capsídeo (VP1, VP2 e VP3). A proteína não-estrutural NS-1 está associada com a replicação do genoma viral e a NS-2 com a formação do capsídeo, controle da expressão gênica e ainda apresenta alguma participação na replicação do genoma (Gava et al., 2009). NS-3 ainda não tem uma função definida, mas acredita-se que esteja relacionada também à replicação viral. VP2 e VP3 possuem epítomos responsáveis pela indução da formação de anticorpos neutralizantes e pequenas alterações nestas proteínas podem determinar o tropismo por diferentes tecidos e hospedeiros (Gava et al., 2009).

Diferenças de patogenicidade entre isolados de campo já foram encontradas em alguns estudos. Um estudo realizado no Brasil, avaliando a variabilidade genética de amostras de PPV dos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo verificou que as amostras se dividem em dois grupos filogenéticos distintos e com subdivisões internas (Soares et al., 2003). Outro estudo realizado por Zimmermann et al., (2006) com amostras isoladas na Alemanha também identificou dois grupos filogenéticos distintos, sugerindo que o PPV é geneticamente mais variável do que estudos anteriores indicavam.

Zeeuw et al., (2007) inocularam cepas de PPV de diferentes grupos filogenéticos em fêmeas gestantes e observou que amostras do grupo composto por novas cepas da Alemanha apresentaram maior virulência, com maior patogenia e disseminação entre os fetos. Ao avaliar a neutralização cruzada, Zeeuw et al., (2007) verificaram que substituições de aminoácidos de superfície diminuíram significativamente a afinidade dos anticorpos, sugerindo que esses aminoácidos desempenham papel fundamental na virulência do PPV e na sua adaptação ao hospedeiro.

2.2.3. Transmissão

A forma de transmissão do PPV mais comum é pelo contato oronasal direto ou indireto com animais infectados ou suas excreções e secreções (Sobestiansky e Barcellos, 2007). A aquisição de reprodutores infectados pode ser uma forma de introdução do vírus no rebanho e o sêmen contaminado é considerado uma fonte de disseminação do PPV. Lucas et al., (1974) inocularam machos reprodutores experimentalmente com PPV e isolaram o vírus do testículo e linfonodos escrotaes, sugerindo que existe suscetibilidade por parte desses animais e que o sêmen pode ser um meio de transmissão do PPV. Bonte et al., (1984) inocularam por via oronasal 12 machos soronegativos para PPV e observaram lesões degenerativas no testículo de um animal. Além disso, PPV foi isolado de vesícula seminal de alguns animais, que o sêmen pode ser uma rota através da qual ocorre infecção intrauterina.

A avidez do PPV por células em multiplicação, com conseqüente tropismo por tecidos e envoltórios fetais, faz com que esse material seja uma importante fonte de disseminação viral. Sendo assim, as concentrações mais elevadas do PPV em uma granja contaminada pelo vírus podem ser encontradas nas baias das porcas em reprodução (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

2.2.4. Patogenia

A doença clínica resultante da infecção pelo PPV ocorre quando marrãs não são vacinadas, ou vacinadas incorretamente, e iniciam o ciclo reprodutivo sem imunidade ativa para PPV (Clark et al., 1996; Givens e Marley, 2008; McDowell et al., 2009). Cutler et al. (1982) pesquisaram a correlação entre soroconversão de marrãs para PPV e a performance reprodutiva destes animais, encontrando soroconversão em 41/81 porcas. Na medida em que o número de partos por porca aumenta, maior

é a chance de contato com o vírus circulante na granja e, por isso, porcas de maiores ordens de parição são, provavelmente, menos susceptíveis ao PPV (McDowell et al., 2009).

Após a infecção dos animais adultos, o vírus replica-se em tecidos linfóides, medula óssea e criptas intestinais e a viremia pode durar de um a sete dias (Johnson, 1971). O PPV é capaz de atravessar a placenta e infectar os embriões ou fetos em 10 a 14 dias após a exposição materna. A patogenia do PPV já é bastante esclarecida na literatura e os sinais clínicos apresentados pelas porcas vão depender da fase gestacional na qual a porca será infectada (McDowell et al., 2009)

Os fetos podem ser contaminados via placenta, com a passagem ocorrendo em macrófagos maternos (Mengeling et al., 2000; Sobestiansky e Barcellos, 2007). O PPV também pode ser transmitido pela passagem de um feto para o outro (Nielsen et al., 1991), originando diferentes apresentações da infecção em fetos em diferentes momentos da maturação fetal, o que vai resultar em leitegadas irregulares tanto em desenvolvimento fetal quanto em número de leitões paridos (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

Caso a infecção ocorra entre o momento da cobertura até por volta do 9º dia de gestação pode ocorrer morte de todos os embriões com conseqüente reabsorção (Mengeling et al., 1980) e retorno ao cio com intervalo regular (18 a 24 dias) ou irregular (25 a 40 dias) ou morte de alguns embriões (restando pelo menos quatro embriões para que haja reconhecimento materno da gestação pela porca) resultando em leitegadas pequenas. Se a infecção acontecer entre o 10º e o 35º dias de gestação pode ocorrer morte de todos os embriões com reabsorção e retorno ao cio em intervalos irregulares ou falsa gestação, como conseqüência da manutenção do corpo lúteo (Rodeffer et al.,

1975). Pode haver também a morte de alguns embriões, com manutenção da gestação, que resultará em leitegadas pequenas com leitões normais, leitões fracos, com baixo peso e malformados. Isso pode ocorrer devido à lenta disseminação do vírus entre os fetos no útero (Sobestiansky e Barcellos, 2007). A partir do 35º dias de gestação já se inicia a fase fetal, quando a organogênese está completa e começa a ossificação. Se a infecção dos fetos ocorre nesse momento, pode haver morte fetal e desidratação, resultando em mumificação (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

A infecção fetal após os 70 dias de gestação, período no qual o feto consegue produzir resposta imune protetora contra o vírus, resulta no nascimento de leitões viváveis e com anticorpos contra o PPV (Mengelin et al., 2000; McDowell et al., 2009). Johnson (1971) verificaram infecção transplacentária em casos de infecção de marrãs entre 58 e 80 dias de gestação, com leitões exibindo altos títulos de anticorpos anti-PPV ao nascimento. Cropper et al. (1976) verificaram títulos de anticorpos anti-PPV baixos a moderados quando avaliaram conteúdo estomacal de fetos em diferentes idades gestacionais.

2.2.5. Resposta imune

O PPV é capaz de infectar todas as categorias de produção de suínos, mas as marrãs que não possuem imunidade para o vírus são as que apresentam maior risco de desenvolvimento de problemas reprodutivos. A infecção natural dos animais suscetíveis, ao contrário da vacinação, produz títulos elevados de anticorpos para PPV (Gava et al., 2009).

Uma vez que as porcas imunes não transferem anticorpos para os fetos pela placenta, leitões adquirem altos níveis de anticorpos circulantes por meio da ingestão do colostro rico em imunoglobulinas durante as primeiras 24 horas de vida. Os

anticorpos adquiridos passivamente protegem os leitões contra várias doenças durante os primeiros momentos de vida desses animais. No entanto, a imunidade passiva pode interferir no desenvolvimento da imunidade ativa seguida da vacinação e, por isso, a imunidade passiva dos agentes infecciosos deve ser investigada para determinar a idade ótima para que a vacinação tenha sucesso.

Paul et al., (1982) investigaram a duração da imunidade passiva e a meia vida de anticorpos para PPV. De acordo com os autores, esta durou entre 16 e 24 semanas e o tempo de desaparecimento de anticorpos para PPV foi diretamente relacionado com o título inicial de anticorpos. Além disso, os autores demonstraram que os animais ficaram suscetíveis à infecção pelo PPV no período de uma semana após se tornarem soronegativos. Desta forma, animais com baixos títulos de anticorpos podem ser suscetíveis mais precocemente à infecção pelo PPV.

Em infecções pós-natais, anticorpos para PPV podem ser detectados a partir de sete dias após a infecção, atingindo níveis máximos em até 15 dias, com possibilidade de persistência por meses a anos (Gava et al., 2009).

O título de anticorpos necessário para que um animal seja considerado soropositivo para PPV é bastante divergente. Ao verificar pela primeira vez a presença do PPV em um rebanho dos Estados Unidos, Mengeling (1972) considerou positivos soros com títulos superiores a cinco. Lobato (1990) ao trabalhar com uma granja na qual os animais eram soronegativos para PPV, observou que todos os animais apresentaram títulos inferiores a 20, com maior proporção de animais com título igual a cinco. Com base nesses resultados, determinou-se que animais com títulos de anticorpos para PPV maiores e iguais a 40 seriam considerados positivos.

2.2.6. Diagnóstico

Medidas de controle para a parvovirose devem ser tomadas sempre que houver casos de retorno o estro, atraso na data de parição, fetos mumificados, leitões natimortos e leitegadas pequenas, principalmente quando associados porcas de primeiro e segundo parto.

Técnicas de identificação viral, antígenos virais ou segmentos genômicos em tecidos fetais constituem a base de um diagnóstico confiável relacionado aos sinais clínicos observados (Sobestiansky e Barcellos, 2007). Alguns autores sugerem que em fetos com mais de 16 centímetros, o que significa que possuem mais de 70 dias de gestação e por isso já são imunocompetentes, a busca por anticorpos é um bom indicativo da infecção pelo PPV (Joo et al., 1976).

Algumas técnicas de diagnóstico do PPV incluem inibição da hemaglutinação (IH), ELISA, hibridização *in situ*, imunofluorescência e reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica de isolamento viral não é muito eficaz na detecção do vírus, pois a infecciosidade viral é reduzida ou inativada em tecidos de fetos mortos e mumificados (Wilhelm et al., 2006).

Pesquisa realizada por Rocha et al., (2010) identificou DNA de PPV através da nested-PCR em amostras de tecidos de cerebelo, cérebro, medula espinhal, pulmões, baço, linfonodos inguinais e mesentéricos, coração, fígado e rins e em conteúdo estomacal de leitões natimortos e abortados e fetos mumificados.

Cropper et al., (1976) avaliaram a associação entre o tamanho da leitegada e a presença de anticorpos para o enterovirus suíno (PEV) e o PPV em fluidos corporais de fetos suínos utilizando a técnica da inibição da hemaglutinação. A pesquisa foi realizada em fetos de porcas prenhes em diferentes estágios da gestação.

Wilhelm et al., (2006) desenvolveram PCR quantitativa para a detecção do PPV, tendo como alvo o gene da VP2. Neste estudo, os autores utilizaram amostras de tecidos de fetos mumificados e leitões natimortos e observaram que o teste foi capaz de detectar DNA do PPV em todas as amostras positivas na PCR convencional, indicando então, que o teste foi altamente sensível e específico.

O teste mais frequentemente utilizado para a detecção de anticorpos para PPV é a IH. Infecções naturais com vírus de campo induzem à produção de altos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação, sendo que a imunidade geralmente é duradoura. O teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti-PPV é muito utilizado em outros países, mas ainda não é realidade no Brasil (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

Para o diagnóstico de falhas reprodutivas associadas ao PPV é importante que seja feito diagnóstico diferencial para outros agentes, como leptospirose, brucelose, doença de Aujeszky, síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos e, atualmente, PCV2, que vem sendo associado a falhas reprodutivas, principalmente em co-infecção com outros agentes.

2.2.7. Controle

A parvovirose não tem tratamento e as medidas de controle envolvem o desenvolvimento de uma imunidade sólida, principalmente nas marrãs. A vacinação é o método mais utilizado como medida de controle da parvovirose suína. O objetivo deste método é estimular a imunidade do plantel de forma a evitar a infecção intrauterina dos embriões ou fetos.

As vacinas atualmente utilizadas são inativadas. Animais vacinados desenvolvem títulos baixos, porém acredita-se que suínos com título de anticorpos de 160 estão imunes à infecção (Paul et al., 1980;

Sobestiansky e Barcellos, 2007). Estudos realizados com vacinas atenuadas sugerem que a prática da vacinação é efetiva na prevenção da infecção transplacentária e morte fetal quando porcas são expostas ao PPV (Mengeling et al., 1979; Sørensen e Askaa, 1981; Paul et al., 1986). No entanto, várias granjas que adotam esta medida continuam apresentando alterações reprodutivas importantes, evidenciando problema de falha vacinal e/ou envolvimento de outros fatores, infecciosos ou não.

O protocolo de vacinação recomendado atualmente inclui a aplicação de duas doses em leitoas de reposição, sendo uma aos 170-180 dias de idade e a segunda dose aos 190-200 dias. Matrizes de outras ordens de parição geralmente recebem uma única dose 10 a 15 dias após o parto. A vacinação de machos é recomendada, com a utilização de duas doses, uma cinco a seis semanas antes de ser utilizado pela primeira vez e outra 15 a 20 dias após a primeira, com revacinação semestral. A partir daí, recomenda-se a vacinação dos machos anualmente.

Outro método utilizado em algumas granjas no controle da parvovirose é a retroinfecção ou feedback. Este método induz a infecção natural dos animais por meio da oferta de materiais contendo elevada quantidade do vírus, como restos de placenta, fetos mumificados. O material contaminado é oferecido às leitoas por volta de um mês antes da cobertura e os animais geralmente são colocados em instalações previamente utilizadas por porcas de outras partições. Inconvenientes deste método envolvem o risco sanitário, a possibilidade de disseminação de outras infecções no rebanho e a incerteza do número de animais realmente imunizados (Sobestiansky e Barcellos, 2007).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

- Avaliar a infecção natural de fêmeas suínas pelo PCV2 e PPV durante a gestação e as consequências nos índices reprodutivos desta gestação.

3.2. Objetivos específicos

- Conhecer o perfil sorológico para PCV2 e PPV nas granjas estudadas.
- Conhecer os títulos de anticorpos para o PCV2 e PPV nas marrãs e porcas de primeiro a terceiro parto antes da cobertura e depois do parto.
- Verificar a ocorrência no aumento de títulos de anticorpos (negativos/baixos para médios/altos) para PCV2 e PPV durante a gestação e relacionar com os dados de performance reprodutiva.
- Verificar a presença de anticorpos para PCV2 e PPV em soro de leitões filhos das porcas acompanhadas
- Verificar a presença do PCV2 em tecidos colhidos de fetos mumificados e natimortos filhos das porcas acompanhadas.
- Detectar o PCV2 no soro das porcas no dia da cobertura e no dia do parto

4. Materiais e Métodos

4.1. Granjas estudadas

Foram estudadas três granjas (G1, G2 e G3) localizadas em municípios do Estado de Minas Gerais, com rebanho entre 1.000 e 2.300 matrizes e sistema de criação confinado, ciclo completo, sendo duas granjas de sítio único e uma com sistema de produção em sítios múltiplos (Tabela 1).

As vacinas utilizadas para PPV nas granjas eram de três laboratórios diferentes. Os machos reprodutores eram vacinados contra

Tabela 1: Caracterização das três granjas estudadas quanto à localização, número de matrizes, tipo de produção e vacinação para PCV2 e PPV.

Granjas	Localização	Número de matrizes	Tipo de Produção	Taxa de reposição do rebanho	Genética predominate no plantel	Vacinação	
						PCV2	PPV
1	Pará de Minas	1010	Sítio único	46%	Penarlan	Leitões aos 21 e 42 dias, reforço em leitoas de reposição aos 150 dias	180(1ª dose), 200 dias (2ª dose) e revacinação 12 dias pós-parto
2	Pará de Minas	1250	Sítio único	40%	Topigs	Leitões aos 35 dias	180(1ª dose), 200 dias (2ª dose) e revacinação 12 dias pós-parto
3	Formiga	2300	Sítios múltiplos	42.8%	Agroceres	Não utilizava vacina para PCV2	170(1ª dose), 190 dias (2ª dose) e revacinação 7-10 dias pós-parto

PPV semestral ou anualmente, de acordo com o protocolo recomendado pelos fabricantes de cada vacina. Das três granjas, somente uma (G2) não realizava o método de retroinfecção (RI) como medida adicional à imunização para PPV. G1 realizava a RI através da oferta de fetos mumificados de porcas de paridades aleatórias, além de fezes de animais da creche e de rufiões da granja enquanto G3 utilizava preferencialmente placenta e leitões natimortos e fetos mumificados de porcas acima do quinto parto. Os protocolos completos de vacinação para PPV e PCV2 podem ser visualizados na Tabela 1. Todas as granjas realizavam indução do parto dois dias antes da data prevista com produtos apropriados e de acordo com as recomendações do fabricante.

Nas três granjas o sêmen utilizado na inseminação das porcas era proveniente de centrais externas. No entanto, a G1 realizava a avaliação da motilidade do sêmen no momento que este chegava à granja. Os intervalos entre inseminações para cada categoria nas granjas pode ser visto no Anexo 7.

As três granjas possuíam funcionários responsáveis pelo acompanhamento de partos, inclusive nos períodos noturnos. Durante a realização do experimento, os partos foram acompanhados por uma ou duas pessoas responsáveis pela execução do projeto, contando com a participação também dos funcionários das granjas. Os partos na G1 aconteceram durante o inverno, ao contrário da G2 e G3, que ocorreram durante o verão.

4.2. Animais e amostras coletadas

4.2.1. Matrizes

Os grupos experimentais foram divididos em marrãs (P0), porcas de primeiro (P1), segundo (P2) e terceiro parto (P3), sendo

que foram amostradas 20 marrãs e 15 porcas de primeiro, segundo e terceiro parto em cada granja. Foram realizadas duas coletas de sangue das porcas de cada granja em momentos diferentes: a primeira até uma semana antes da cobertura (coleta da pré-cobertura – CPC) e a segunda em até dois dias após o parto (coleta do parto – CP). Foram amostrados um total de 15 animais de cada um dos quatro grupos experimentais (P0, P1, P2 e P3), totalizando 60 matrizes por granja. Devido à repetição do estro, intervalo entre a primeira coleta e a cobertura maior do que sete dias, descarte por parte da granja e anestro, houve descarte de alguns animais no decorrer do experimento. Desta forma, 143 porcas foram acompanhadas desde o momento da cobertura até o parto.

4.2.2. Leitões

Amostras de sangue do cordão umbilical de cinco leitões de cada porca foram coletadas imediatamente após o nascimento, antes que estes ingerissem o colostro. Os leitões mumificados e natimortos pertencentes às porcas dos grupos experimentais foram recolhidos, identificados e congelados para posterior coleta de fragmentos de órgãos para a detecção viral.

4.3. Perfil sorológico

Para a caracterização das granjas foi realizado um estudo sorológico para a pesquisa de anticorpos totais anti-PCV2 e anti-PPV antes do início da CPC. Para PPV foram coletadas amostras de sangue de 10% das porcas de cada ordem de parição em cada granja e para PCV2, foram amostradas 20 porcas e 20 leitões com três, sete, 13 e 17 semanas de idade.

4.4. Processamento laboratorial das amostras

4.4.1. Soro

As amostras de sangue (8ml) das porcas foram coletadas na veia cava cranial ou

jugular em tubos de 10ml. No laboratório as amostras coletadas foram centrifugadas a 1500 x g por 15 minutos à temperatura ambiente para a separação do soro e do coágulo. Após a centrifugação, o soro obtido foi armazenado em microtubos de 1,5ml e estocado a -20°C até o momento do uso. As amostras de sangue de cordão umbilical dos leitões foram processadas como descrito acima.

4.4.2. Preparação de material proveniente de fetos mumificados e natimortos

Um total de 120 leitões mumificados ou natimortos nascidos das porcas dos grupos experimentais foram recolhidos logo após o parto, identificados e congelados para posterior coleta de fragmentos. No laboratório cada leitão foi necropsiado individualmente e amostras de tecidos foram coletadas para a preparação de um homogeneizado. Para isso, foi feito um *pool* em proporções variadas de tecidos fetais incluindo amostras de pulmão, coração, timo, baço e linfonodos. Três gramas de tecido foram macerados com a ajuda de uma pequena quantidade de areia. Em seguida, acrescentou-se 27 ml de PBS 1X, 20.000 U/ml de penicilina, 50 µg de estreptomicina e 1% de anfotericina B, obtendo-se então um volume total de 30 ml. O homogeneizado para PCV2 foi sonificado duas vezes em amplitude 50 e pulso três e, em seguida, centrifugado a 2500 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em microtubos estéreis e congelado a uma temperatura de -70°C até o momento do uso.

Conteúdo estomacal de 49 leitões natimortos foi coletado para a pesquisa de anticorpos anti-PPV. A coleta foi feita por punção estomacal direta, utilizando-se agulhas e seringas estéreis. As amostras foram tratadas com 2% de antibiótico e 1% de anfotericina B e congeladas a -70°C até o momento do uso.

4.4.3. Teste de Imunoperoxidase em Monocamada Celular (IPMC) para a detecção de anticorpos anti-PCV2

Para o crescimento do PCV2, linhagem celular de rim suíno PK-15 livre de PCV1 foi cultivada em meio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% L-glutamina, 10.000 U/ml de penicilina, 50 µg de estreptomicina e 3% de aminoácidos não-essenciais à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Para infecção celular foi utilizada a amostra de PCV2 isolada de campo PCV2G6A401 (Lobato et al., 2007).

O título de anticorpos totais (AT) anti-PCV2 das amostras de soro das porcas e dos leitões foi determinado através da técnica de IPMA, conforme descrito por Gerber (2010). Os resultados foram expressos como média de log₂ no teste de IPMA sendo as diluições correspondentes a: 20 = 4,32; 80 = 6,32; 320 = 8,32; 1280 = 10,32; ≥5120 = 12,32. Para a avaliação do aumento dos títulos entre as coletas realizadas, títulos baixos foram considerados entre 20 e 80; médios entre 320 e 1280 e altos maiores ou iguais a 5120. Variações nos níveis de anticorpos de negativo/baixo para médio/alto foram consideradas para determinar o aumento no título de anticorpos dos animais acompanhados durante o estudo.

4.4.4. Teste da Inibição da Hemoaglutinação (IH)

O crescimento do PPV foi feito em linhagem celular de testículo de suíno ST cultivada em meio MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), suplementado com 0,11g/L de piruvato de sódio, 7% de SFB, 10.000 U/ml de penicilina, 50 µg de estreptomicina à 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Para infecção celular foi utilizada uma amostra de PPV ATCC NADL2 VR 742.

Os soros das porcas, dos leitões e os conteúdos estomacais coletados dos leitões natimortos e mumificados foram submetidos ao teste de IH. Para isso foram tratados para a remoção dos inibidores e hemaglutininas inespecíficas de acordo com o descrito por Lobato (1990).

O teste de IH foi feito de acordo com Gouveia (1984). Os resultados foram expressos como média de $\log_4$ sendo as diluições correspondentes a: 5= 1,16; 10= 1,66; 20= 2,16; 40= 2,66; 80= 3,16; 160= 3,66; 320= 4,16; 640= 4,66; 1280= 5,16; 2560= 5,66 e ≥ 5120 = 6,16. A avaliação do aumento dos títulos de anticorpos para PPV foi feita considerando-se títulos entre 40 e 160 como baixos; entre 320 e 1280 médios e entre 2560 e maiores ou iguais a 5120 altos. Variações nos níveis de anticorpos de negativo/baixo para médio/alto foram consideradas para determinar o aumento no título de anticorpos dos animais acompanhados durante o estudo.

4.4.5. PCR para Circovírus Suíno

4.4.5.1. Extração de DNA

Para a extração do DNA total em amostras de soro das porcas foi utilizado o kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, USA), segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

Amostras de tecidos obtidas dos fetos mumificados e leitões natimortos foram submetidas à extração de DNA total de acordo com Sambrook et al. (1989), com modificações. Resumidamente, 100 μ L de tampão de lise foram adicionados a 500 μ L de cada amostra e incubados a 55°C por 15 minutos. Em seguida, 500 μ L da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 50:48:2 foram adicionados à mistura e novamente incubados a 37°C por 10 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 14000 rpm, a fase aquosa resultante foi retirada e a ela acrescentou-se

500 μ L de clorofórmio para a retirada dos restos do fenol. Uma nova centrifugação por três minutos a 14000 rpm foi realizada e a fase superior resultante foi recolhida em outro eppendorf, adicionando-se posteriormente 10% deste volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol resfriado (-20°C). Estas amostras foram mantidas overnight a -20°C e posteriormente centrifugadas durante 15 minutos por 14000 rpm a 4°C. Após descarte do sobrenadante e secagem dos eppendorfs, o DNA foi ressuscitado em 20 μ L de água de injeção e armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.4.5.2. PCR Convencional para PCV2

Amostras de soro das porcas e tecidos de leitões mumificados e natimortos foram submetidas a PCR convencional para detecção do PCV2 segundo Gerber (2010). A viremia para PCV2 nas porcas foi utilizada para avaliar a atuação do vírus no desenvolvimento de falhas reprodutivas.

4.5. Desempenho reprodutivo das porcas

O desempenho reprodutivo de toda a granja durante o período estudado foi registrado de acordo com dados gentilmente fornecidos pelas granjas. Dados referentes aos grupos experimentais acompanhados foram coletados durante a execução do trabalho. Os dados avaliados incluíam taxa de repetição de estro, taxas de mumificados e natimortos e ocorrência de leitegada menor e igual a sete. Dados de desempenho reprodutivo das três granjas em um período de dois meses anteriores ao início do estudo até o final deste (totalizando seis meses) também foram avaliados visando identificar problemas reprodutivos que justificassem a inclusão das granjas no experimento.

4.6. Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilks. O

teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os títulos de AT para PCV2 e PPV e a quantidade de natimortos e mumificados entre categorias e entre granjas. A diferença entre as duas coletas por granja e categorias foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. Correlação não-paramétrica de Spearman foi utilizada para correlacionar os títulos de AT para PPV nos momentos de coleta e o título de AT para PPV no conteúdo estomacal de leitões. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Avaliação do desempenho reprodutivo das granjas estudadas

5.1.1. Avaliação dos índices gerais das granjas

O desempenho reprodutivo envolvendo taxa de repetição do estro, taxa de

mumificados e natimortos e leitegada ≤ 7 foi avaliado em função das granjas e das categorias estudadas. Dados de desempenho reprodutivo das granjas e das categorias acompanhadas no período de seis meses podem ser vistos na Tabela 2.

Os alvos de produtividade utilizados para o monitoramento do desempenho nos rebanhos suínos sugerem valores de até 10% para taxa de repetição de estro, 7% para taxa natimortos (Sobestiansky e Barcellos, 2007), 2% para taxa de mumificados, e 10% para leitegada ≤ 7 (Cutler et al., 1982). A ocorrência de valores acima dos citados indica a necessidade de intervenção para a normalização dos dados.

De todos os índices avaliados, somente as taxas de mumificados e de repetição de estro apresentaram valores acima dos normais.

Tabela 2: Dados reprodutivos do plantel nas três granjas para porcas de primeiro a terceiro parto no período de seis meses correspondentes ao estudo.

	Categorias	Repetição do estro (%)	Natimortos (%)	Mumificados (%)	Leitegada ≤ 7 (%)	Taxa de parto (%)
G1	P0	10,6	-	-	-	-
	P1	10,6	4,9	2,5	7,51	85,5
	P2	8,8	4,2	2	9,3	86,6
	P3	9,7	4	2,1	9,59	86,2
G2	P0	3,1	-	-	-	-
	P1	3,1	4,9	3,8	4,28	84,1
	P2	4,8	4,9	3,2	7,84	83,8
	P3	0,8	3,5	2,6	0,87	84,2
G3	P0	5,8	-	-	-	-
	P1	10,4	2,1	2,2	7,4	90,6
	P2	7	1,8	1,2	11,3	84,7
	P3	4,8	2,2	1,4	5,6	90,1

A taxa de mumificados apresentou alteração em todas as categorias da G2, diferente da G1 e G3, onde estas taxas apresentaram aumento apenas em algumas categorias. As taxas de repetição de estro ficaram alteradas apenas em porcas de primeiro parto da G1 e da G3.

A seleção das granjas para o desenvolvimento do estudo foi realizada seguindo pré-requisitos importantes que envolveram o número total de matrizes, circulação do PCV2 e do PPV no rebanho e presença de falhas reprodutivas. No momento do estudo não encontramos índices reprodutivos muito aumentados, o que indica que a variação destes valores pode ocorrer de forma sazonal nos rebanhos suínos. A ausência de alteração drástica nos índices não indica necessariamente o não envolvimento do PCV2 e/ou PPV nos rebanhos estudados. Uma hipótese para a ausência de alterações no período estudado pode ser a amostragem, que talvez não tenha sido eficiente em mostrar a existência de problemas reprodutivos nas granjas.

5.1.2. Avaliação dos índices das porcas acompanhadas no estudo

Na Tabela 3 podem ser observados índices reprodutivos referentes às leitegadas das porcas acompanhadas durante o estudo, organizados por categoria. Os índices incluem mumificados, natimortos e leitegada ≤ 7 . Não houve diferença estatística para mumificados e natimortos quando comparados entre granjas e categorias ($P > 0,05$).

As taxas de mumificados e natimortos permaneceram normais na G1, apresentando elevação em marrãs e porcas de segundo e terceiro parto em G3 e em todas as categorias da G2. Apesar de algumas categorias apresentarem o índice de leitegada ≤ 7 acima dos níveis de interferência, nenhuma das porcas com leitegadas reduzidas apresentou evidências de exposição fetal (fetos soropositivos e/ou

tecidos fetais com DNA viral) compatíveis com o envolvimento do PCV2 e do PPV.

Durante a avaliação dos índices reprodutivos deste trabalho, observamos alguns valores diferentes dos fornecidos pelas granjas com relação ao número de natimortos e mumificados para cada porca. Esta situação pode ocorrer tanto por falhas no registro dos dados durante o parto quanto pela ausência na verificação das placentas após o parto na busca de fetos mumificados muito pequenos que podem ficar aderidos a esta estrutura, levando à subestimação dos índices reprodutivos. Schneider et al., (2004) acompanharam quatro granjas e registraram o número de natimortos, mumificados, nascidos vivos e nascidos totais das porcas que pariram no período do estudo, encontrando diferenças nestes índices com relação ao registro feito pelos funcionários da granja, sugerindo que talvez este seja um problema muito comum nas granjas tecnificadas. Neste estudo, conseguimos comparar os dados fornecidos pela granja e os que observamos e não encontramos diferença suficiente para alterar a avaliação e os resultados do trabalho. No entanto, o esclarecimento aos funcionários das maternidades no intuito de melhorar o registro dos dados reprodutivos das porcas é uma ação importante na busca da obtenção de valores reais dos índices reprodutivos e, conseqüentemente, da situação real das granjas.

5.2. Perfil sorológico das granjas amostradas para PCV2

O perfil sorológico e a distribuição de anticorpos anti-PCV2 podem ser vistos nas Figuras 1 e 2. As granjas apresentaram o perfil semelhante de queda de AT para PCV2. A média dos títulos de anticorpos de porcas e animais com três semanas na G1 permaneceu constante, diferentemente de G2 e G3, onde houve uma queda nas médias destas categorias (Figura 1). Esta diferença reflete uma possível variação na transmissão de anticorpos passivos da porca

Tabela 3: Frequências dos principais índices reprodutivos nas leitegadas estudadas e nas categorias de porcas acompanhadas.

Categoria	G1 436 leitões provenientes de 33 porcas			G2 869 leitões provenientes de 60 porcas			G3 606 leitões provenientes de 50 porcas		
	Mumificado ^a	Natimorto ^b	≤ 7*	Mumificado ^a	Natimorto ^b	≤ 7*	Mumificado ^a	Natimorto ^b	≤ 7*
P0	2/108 (1,8%)	4/108 (3,7%)	0/8	14/210 (6,6%)	18/210 (8,5%)	0/16	6/148 (4%)	1/148 (0,6%)	2/13 (15,3%)
P1	1/118 (0,8%)	3/118 (2,5%)	1/8 (12,5%)	8/204 (3,9%)	14/204 (6,8%)	3/16 (18,7%)	0/144	5/144 (3,4%)	1/13 (7,6%)
P2	0/87	5/87 (5,7%)	3/8 (37,5%)	5/227 (2,2%)	6/227 (2,6%)	0/14	3/147 (2%)	3/148 (2%)	0/12
P3	2/123 (1,6%)	7/123 (5,6%)	1/9 (11,1%)	8/228 (3,5%)	13/228 (5,7%)	0/14	7/167 (4,1%)	4/167 (2,3%)	0/12
Total	5/436 (1,1%)	19/436 (4,3%)	5/33 (15,1%)	35/869 (4,0%)	50/869 (5,7%)	3/60 (5%)	16/606 (2,6%)	13/606 (2,1%)	3/50 (6%)

^aFrequência de mumificados/nascidos totais de cada categoria

^bFrequência de natimortos/nascidos totais de cada categoria

* Frequência de leitegada ≤7/total de leitegadas da categoria

para os leitões, o que sugere uma diferença no manejo da colostragem. G1 e G2 apresentaram animais soronegativos desde a sétima semana, ao contrário de G3, onde isso ocorreu somente na 13ª semana (Figura 2). Nas três granjas a soroconversão ocorreu a partir da 13ª semana de vida.

De acordo com a distribuição de anticorpos entre as categorias amostradas (Figura 2), somente G3 exibiu animais soronegativos na categoria de porcas. G2 apresentou animais com títulos médios e altos, ao contrário da G1, que além desses, ainda

apresentou alguns animais com baixos títulos de anticorpos para PCV2.

A distribuição de anticorpos em animais de três semanas apresentou perfil semelhante em G1 e G2, diferentemente de G3, onde houve predomínio de animais com títulos médios. Animais com 17 semanas apresentaram porcentagens variadas de títulos de anticorpos para PCV2, e G3 foi a granja com maior quantidade de animais soronegativos para esta categoria.

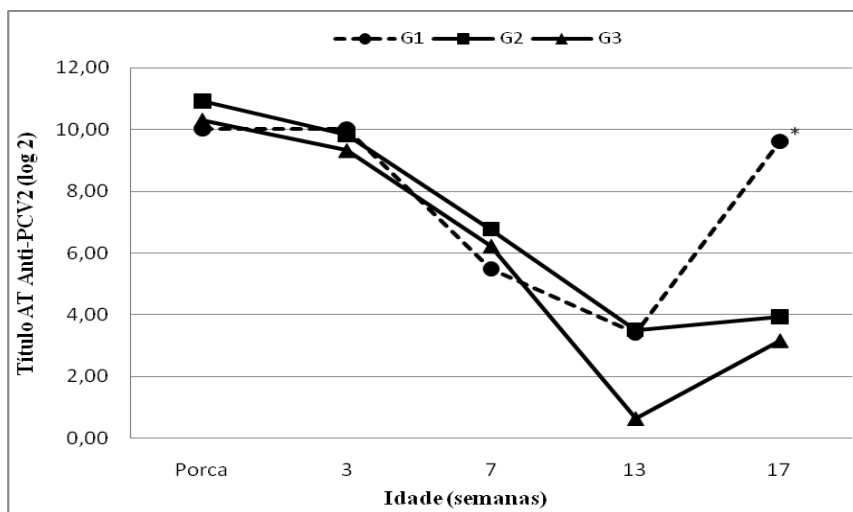


Figura 1: Perfil de anticorpos totais para PCV2 nas categorias porcas e leitões de 3, 7, 13 e 17 semanas de idade nas granjas 1 a 3.

*Diferença estatística entre granjas para a categoria relacionada.

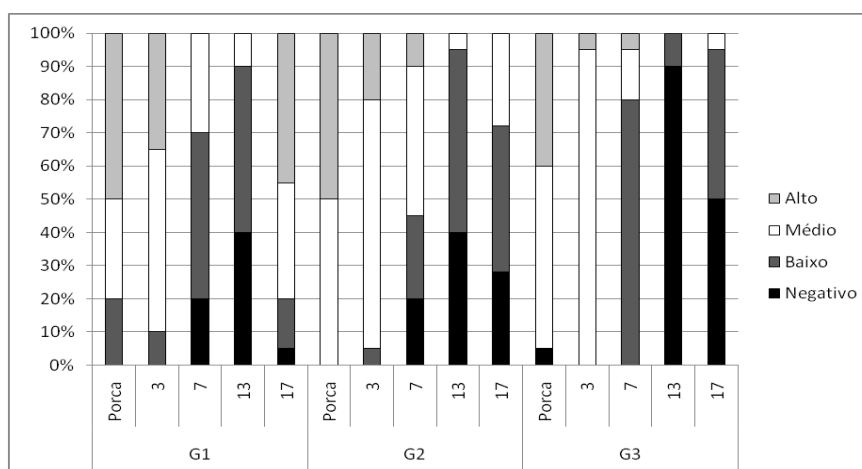


Figura 2: Distribuição de anticorpos totais para PCV2 nas categorias porcas e leitões de 3, 7, 13 e 17 semanas de idade nas granjas 1 a 3.

Houve diferença estatística entre as médias de AT nas categorias do perfil sorológico amostradas para PCV2 nas três granjas, sendo que G1 apresentou a maior média de AT e G3, a menor. As categorias do perfil também apresentaram diferença estatística ($P < 0,05$), com porcas exibindo maior média de AT e animais com 13 semanas de vida exibindo menor média, fato confirmado pela grande proporção de animais soronegativos nessa categoria.

A amostragem realizada para o perfil sorológico para PCV2 gerou resultados que mostram uma queda de anticorpos um pouco diferenciada em relação a G1 e G2/G3, mas com a soroconversão ocorrendo a partir da 13ª semana nas três granjas, sendo esta a idade de maior suscetibilidade à infecção pelo PCV2 neste estudo. Trabalho semelhante realizado por Barbosa et al., (2008) verificou a queda de anticorpos passivos ocorrendo entre sete e 13 semanas, com soroconversão a partir da 14ª semana de vida. Ao avaliarem o perfil sorológico de rebanhos em sítios únicos e múltiplos, Gerber et al., (2009) verificaram que a soroconversão como consequência da

queda de anticorpos maternos tende a ocorrer de forma mais tardia em rebanhos de sítios únicos (por volta da décima semana de vida) quando comparado a rebanhos em sítios múltiplos, nos quais a soroconversão pode ocorrer próximo da quarta semana de vida. A diferença na velocidade de queda dos anticorpos de origem materna seguida por soroconversão ativa pode estar relacionada a exposições ao vírus durante o ciclo de produção, que por sua vez estariam associadas a qualidade de manejo da granja.

5.3. Perfil sorológico das granjas amostradas para PPV

O perfil sorológico para PPV das três granjas acompanhadas pode ser visto na Figura 3. A G3 apresentou marrãs com altos títulos de AT para PPV, diferentemente de G1 e G2, onde os títulos da mesma categoria variaram de negativos a baixos e aumentaram a partir da primeira ordem de parição. Ao longo de todo o perfil os títulos mantiveram-se entre médios a altos, em sua grande maioria, indicando circulação viral nos rebanhos.

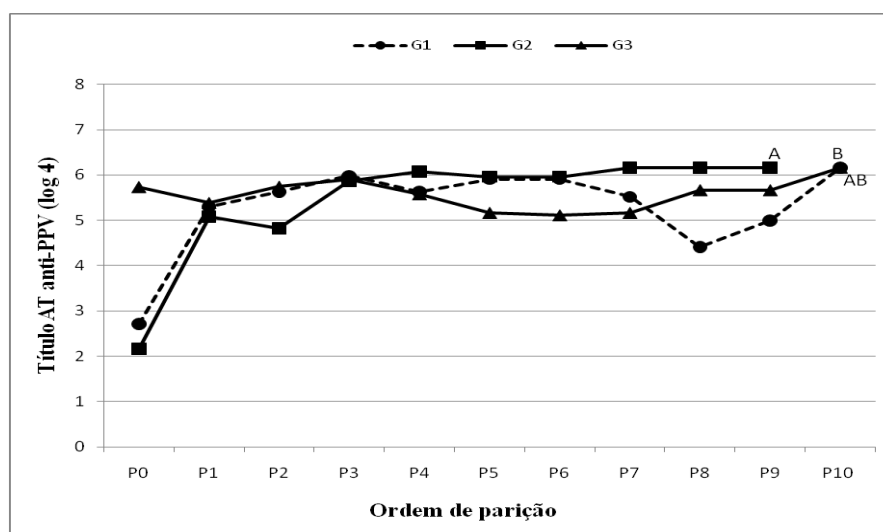


Figura 3: Perfil de anticorpos totais para PPV nas diferentes ordens de parição das três granjas estudadas.

Médias de títulos menores que 2,16 são consideradas negativas.

A, B: letras diferentes indicam diferença estatística entre as granjas

O perfil de distribuição de anticorpos para PPV apresentou diferenças entre granjas e entre categorias (Figura 4). Na G2 houve maior ocorrência de animais soronegativos para PPV, especialmente em marrãs. A maior taxa de soroconversão nesta granja ocorreu entre as marrãs e o grupo de porcas do primeiro parto, e provavelmente, maior quantidade de vírus seria encontrada nesta última categoria. Situação semelhante ocorre em G1, porém, em menor proporção. G3 apresentou apenas 2,1% de animais soronegativos. Os resultados indicam que existe um grande número de marrãs e porcas de primeiro parto suscetíveis, caso haja infecção pelo vírus em G1 e G2. De uma forma geral, as granjas apresentaram animais com títulos moderados a elevados compatíveis com títulos protetores ao longo das categorias de parição, conferindo proteção aos animais.

Houve diferença estatística nas médias de títulos de AT entre as três granjas ($P < 0,05$) e entre as ordens de parição. De acordo com a Tabela 4, que mostra a frequência de animais soronegativos e as médias dos títulos de anticorpos para PPV nas categorias e granjas amostradas, as marrãs apresentaram a menor média de títulos de AT e foram diferentes das demais ordens avaliadas.

Os resultados do perfil para PPV permitiram observar que G1 e G2 apresentaram considerável quantidade de animais soronegativos nas categorias de marrãs e porcas de primeiro e segundo parto (esta última categoria apenas em G2). Apesar de todas as granjas utilizarem a vacinação como principal medida de controle da parvovirose, duas delas (G1 e G3) realizavam a retroinfecção (RI) como medida adicional.

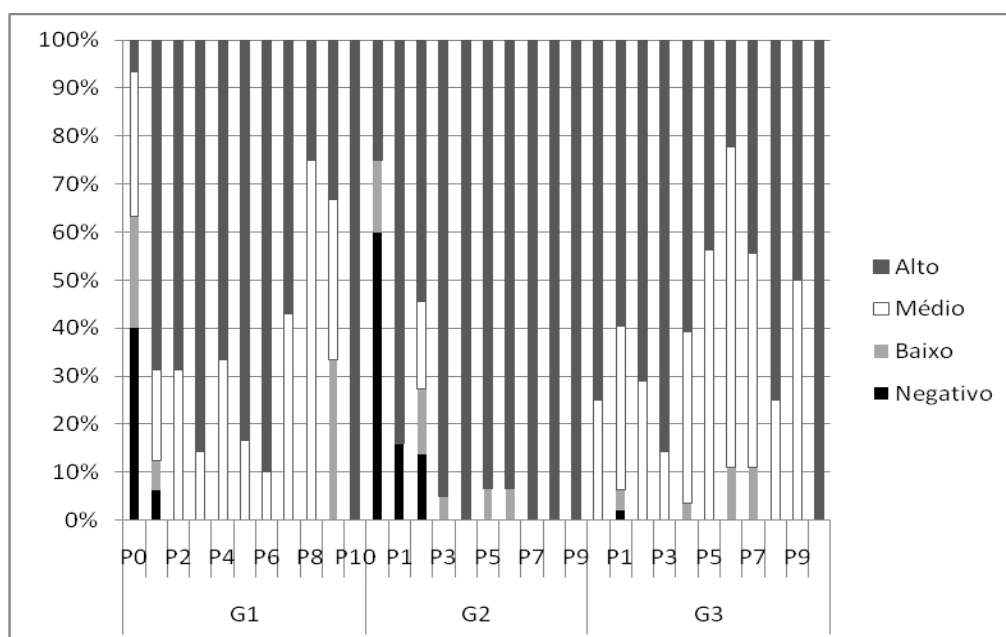


Figura 4: Distribuição de anticorpos totais para PPV em marrãs e porcas de todas as paridade de cada uma das três granjas estudadas.

Tabela 4: Frequência de animais soronegativos e médias dos títulos de anticorpos para PPV nas diferentes categorias do perfil sorológico realizado nas três granjas antes do início do estudo.

Categorias	Frequência de soronegativos	Média de AT ^{a,b}
Marrãs	18/86 (20,9%)	5,43 ^B
P1	4/81 (4,9%)	5,83 ^A
P2	0/76	5,82 ^A
P3	0/69	6,01 ^A
P4	0/60	5,89 ^A
P5	0/43	5,86 ^A
P6	0/34	5,93 ^A
P7	0/27	5,90 ^A
P8	0/16	5,88 [*]
P9	0/6	5,77 [*]
P10	0/4	6,16 [*]

^aMédia dos títulos de AT transformada em log₄

^bSobrescritos diferentes nas colunas indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos.

^{*}Não foi possível calcular a diferença entre as categorias P8, P9 e P10

A RI ainda é utilizada em alguns rebanhos visando a indução da infecção natural das marrãs com restos de materiais biológicos supostamente contaminados com o vírus (placenta, fetos mumificados e leitões natimortos). G2, que apresentou o maior número de animais suscetíveis, não utilizava esta prática de manejo. Porém não podemos afirmar que a prática da RI teve alguma influência na imunização de marrãs e porcas em G1 e G3, pois não acompanhamos estes animais antes e depois desta prática. No entanto quando observamos a Tabela 4 vemos que mesmo com o uso de duas doses das vacinas e da RI, muitas marrãs e porcas de primeiro parto continuaram soronegativas para PPV, sendo a maioria delas pertencentes a G2. As vacinas utilizadas nas granjas eram todas inativadas, com adjuvante aquoso, mas eram advindas de laboratórios diferentes, o que pode ter interferido na eficiência de imunização das porcas.

5.4. Associação entre aumento no título de anticorpos e ocorrência de falhas reprodutivas

5.4.1. PCV2

As médias dos títulos de anticorpos para PCV2 nas coletas da pré-cobertura (CPC) e do parto (CP) nas três granjas acompanhadas pode ser visto na Figura 5. Na CPC as porcas apresentaram títulos elevados de anticorpos para PCV2, sem mudança acentuada na CP. Considerando todas as porcas amostradas, não houve diferença estatística entre os dois momentos (CPC e CP) de acompanhamento para PCV2 (P>0,05).

A distribuição de anticorpos contra PCV2 nas duas coletas realizadas pode ser vista na Figura 6. Observamos que a grande maioria dos animais apresentou títulos moderados a elevados nos dois momentos estudados. No geral, a frequência de títulos baixos foi reduzida, fato que ocorreu em G1 e G2, geralmente nos animais das categorias de marrãs e porcas de primeiro parto.

A Tabela 5 mostra a frequência de animais que apresentaram títulos de anticorpos aumentados (TAA) para PCV2 durante o estudo. Dos animais amostrados, 5/60 (8,33%) porcas da G2 tiveram aumento nos

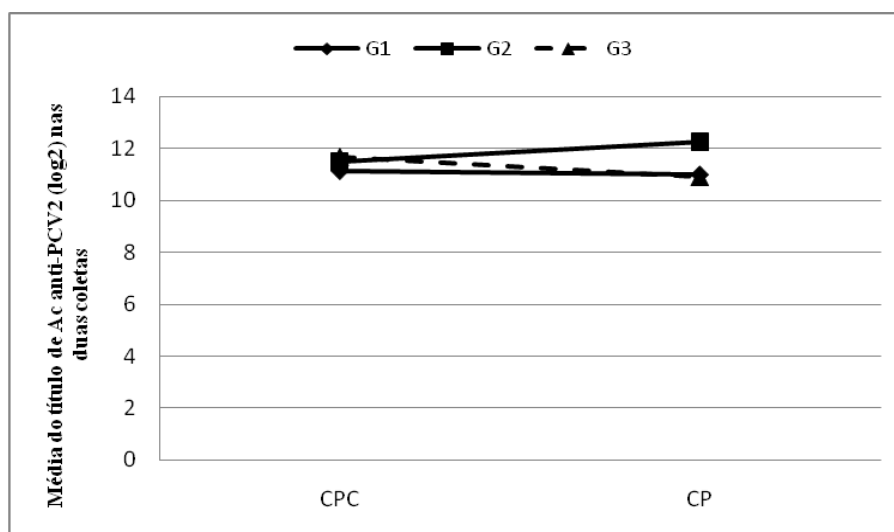


Figura 5: Médias dos títulos de AT para PCV2 na CPC e na CP para as quatro categorias estudadas.

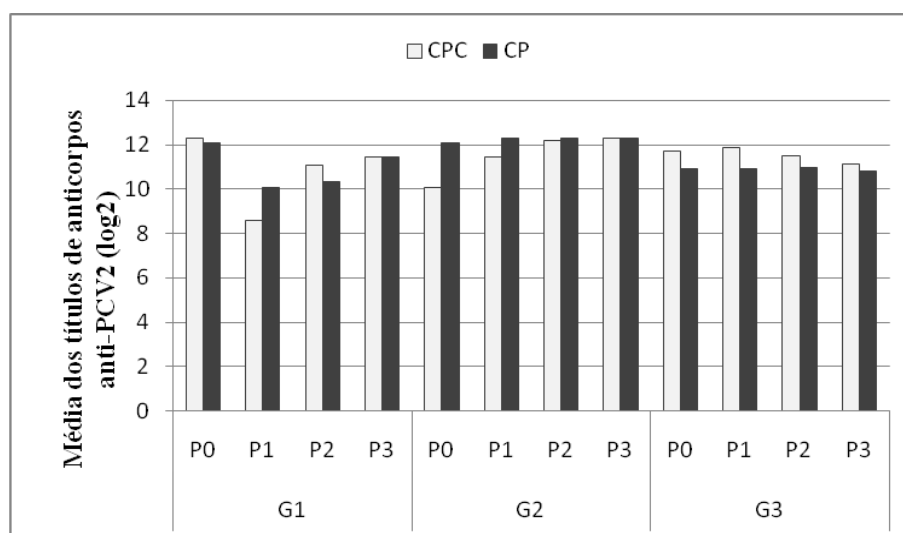


Figura 6: Distribuição de anticorpos para PCV2 por granja na CPC e CP para as quatro categorias estudadas.

títulos de anticorpos, sendo que destas, três (18,75%) eram marrãs e duas (12,5%) porcas de primeiro parto. Nenhuma porca da G3 apresentou TAA para PCV2. O alto número de porcas soropositivas para PCV2 durante o estudo sugere elevada circulação viral no rebanho, visto que a maioria dos animais apresentaram altos títulos de anticorpos anti-PCV2.

A reduzida frequência de animais apresentando aumento nos títulos de

anticorpos se deve ao fato de que a grande maioria das porcas já apresentava títulos elevados na coleta realizada antes da cobertura (CPC). No entanto, todos os animais que tiveram aumento nos títulos de anticorpos para PCV2 apresentaram falhas reprodutivas, fato que nos permite sugerir que houve associação entre as duas variáveis.

A avaliação do aumento nos títulos de anticorpos das porcas durante a gestação foi

Tabela 5: Frequência de porcas que apresentaram aumento nos títulos de anticorpos dos níveis de negativo/baixo para médio/alto para PCV2 entre as granjas e categorias estudadas.

Categoria	G1	G2	G3
P0	0/8	3/16 (18,75%)	0/13
P1	1/8 (12,5%)	2/16 (12,5%)	0/13
P2	0/8	0/14	0/12
P3	0/9	0/14	0/12
Total	1/33 (3%)	5/60 (8,33%)	0/50

uma das ferramentas que nos permitiram avaliar o envolvimento do PCV2 em desordens reprodutivas. Alguns métodos de diagnóstico poderiam ainda ser usados visando uma investigação mais criteriosa e esclarecedora da atuação deste vírus. A associação das alterações no número de leitões natimortos com lesões no miocárdio e detecção *in situ* do PCV2 são os métodos mais indicados na literatura. A associação das alterações no número de leitões natimortos com lesões no miocárdio e detecção *in situ* do PCV2 são os métodos mais indicados na literatura. Neste trabalho, todas as granjas realizavam a indução do parto e, desta forma, elevado número de porcas pariam ao mesmo tempo, impossibilitando que os fetos coletados fossem necropsiados ainda na granja. Hansen et al. (2010) avaliaram diferentes técnicas para diagnóstico do PCV2 como agente causador de falhas reprodutivas, incluindo IHC e PCR quantitativa para a detecção viral. No entanto, os autores indicam o uso da imunohistoquímica apenas para estágios agudos de falhas reprodutivas, enquanto a PCR quantitativa é considerada um método sensível por um período mais longo. Os resultados

indicaram possível associação entre o PCV2 e as desordens reprodutivas. No entanto, o perfil sorológico realizado em nosso estudo não nos permitiu verificar a suscetibilidade dos animais nas diferentes ordens de parição. Desta forma, sugerimos uma nova metodologia para a realização do perfil sorológico para PCV2 com o objetivo de verificar a circulação viral no rebanho reprodutivo. Para isto, o ideal seria a amostragem de animais por ordem de parição, assim como é feito no perfil para PPV.

5.4.2. PPV

Como pode ser observado na Figura 7, houve diferença entre os títulos de anticorpos para PPV, sendo que em G3 estas médias foram maiores para as duas coletas, sugerindo alta circulação do vírus neste rebanho.

G1 apresentou porcas negativas na CPC, o que não foi observado na CP (Anexo 1). Essa mudança na distribuição de anticorpos na G1 sugere que alguns animais tiveram contato com o PPV durante a gestação, o que poderia estar relacionado com o desenvolvimento de falhas reprodutivas. Ao

contrário da G1, a G2 apresentou animais soronegativos nas duas coletas e, portanto suscetíveis à infecção pelo PPV (Anexo 3). A presença de animais soronegativos ainda na CPC sugere que a vacinação pode não estar sendo eficiente, alertando que cuidados de manejo devem ser tomados neste rebanho. Na G3 foram observados

somente títulos altos e médios nos momentos estudados, sem nenhuma porca soronegativa.

De acordo com a distribuição de anticorpos para PPV (Figura 8) apenas marrãs da G1 tiveram aumento nos títulos de anticorpos, fato que ocorreu em dois animais. No geral,

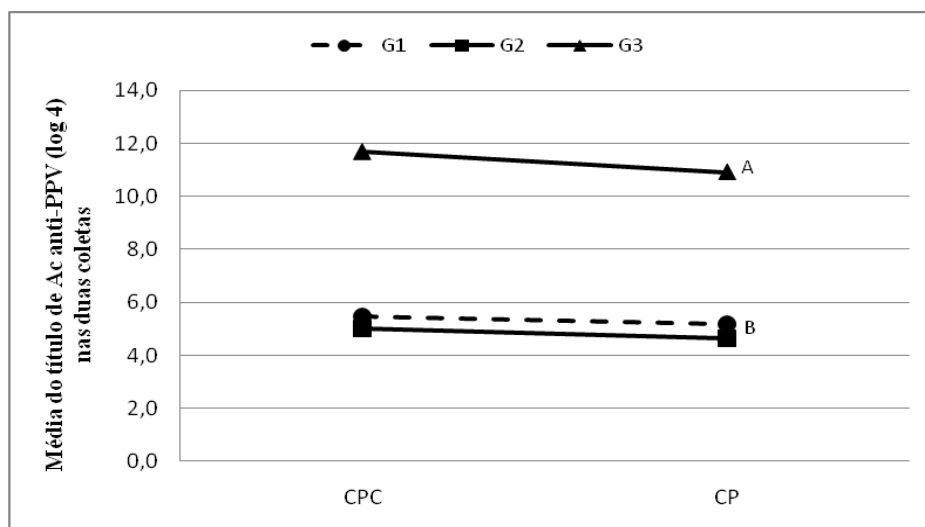


Figura 7: Médias dos títulos de AT para PPV na CPC e CP para as quatro categorias. A, B: letras diferentes indicam diferença estatística entre as granjas

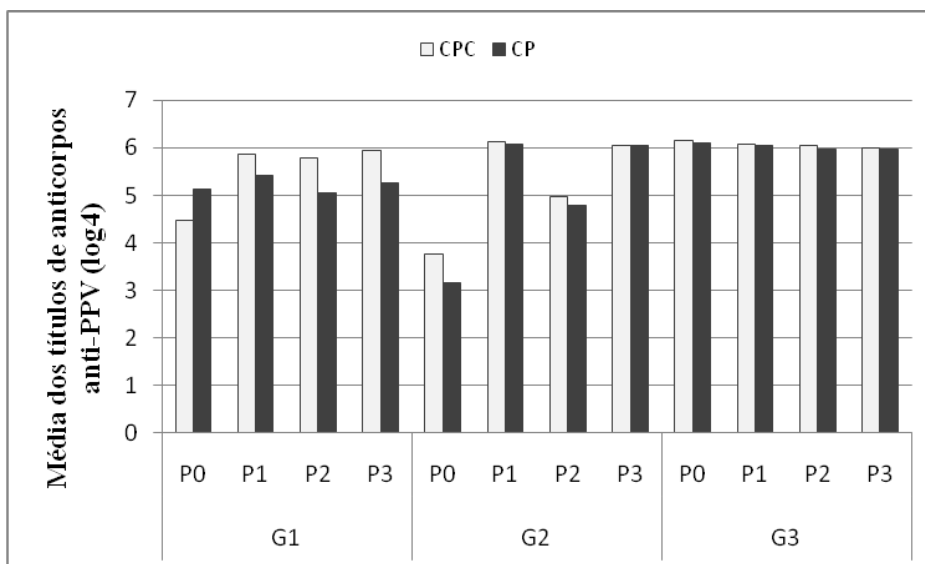


Figura 8: Distribuição de anticorpos para PPV por granja na CPC e CP para as categorias estudadas.

os títulos de anticorpos apresentaram queda ou permaneceram constantes entre as duas coletas nas demais categorias e granjas.

As médias dos títulos de anticorpos totais para PPV (Tabela 6) mostraram diferenças entre granjas e categorias nas duas coletas, o que reflete as diferenças na distribuição de anticorpos (Figura 8) e conseqüentemente, a suscetibilidade dos animais acompanhados nos diferentes rebanhos estudados. Com exceção da G3, marrãs apresentaram as menores médias nas duas coletas, especialmente em G2, onde encontramos a maior frequência de animais soronegativos.

Neste estudo investigamos a infecção de porcas gestantes pelo PPV utilizando como ferramenta o aumento dos títulos de anticorpos dos níveis negativos/ baixos para médios/ altos. O aumento destes títulos sugerindo contato com o vírus ocorreu em reduzido número de animais e não esteve associado à ocorrência de falhas reprodutivas. Esta situação mostra, talvez de forma equivocada devido à amostragem reduzida, a baixa participação do PPV em desordens reprodutivas nas granjas estudadas, visto que encontramos sugestivos de exposição fetal ao vírus em algumas leitegadas e verificamos a associação entre esta exposição e a ocorrência de falhas reprodutivas.

A ausência de associação entre o aumento no título de anticorpos para PPV e a ocorrência de falhas reprodutivas pode ser explicada pela ocorrência de exposição fetal ao vírus envolvendo leitões soropositivos e viáveis ao nascimento, e conteúdo estomacal de leitões natimortos com anticorpos anti-PPV em porcas com elevados títulos de anticorpos para PPV.

Apenas duas porcas apresentaram soroconversão a partir de títulos negativos, e destas, somente uma apresentou alguma alteração reprodutiva. Estes resultados contrariam os estudos que indicam que vacinas inativadas utilizadas para o controle da parvovirose, apesar de induzirem baixos títulos de anticorpos anti-PPV, previnem a viremia e a infecção transplacentária (Mengeling et al., 1979, Paul et al., 1986, Sørensen e Askaa, 1981). Os resultados então sugerem que as vacinas atualmente utilizadas podem não proteger as porcas contra uma possível infecção transplacentária e morte fetal. Existe um protocolo de vacinação contra PPV bem definido e utilizado pelos sistemas de produção. No entanto, alterações reprodutivas continuam a ocorrer em algumas situações, como pôde ser visto em nosso trabalho, independente do uso da vacinação.

Tabela 6: Média dos títulos de AT para PPV na CPC e na CP e comparação entre as granjas e categorias.

Categoria	Coleta Pré-cobertura			Coleta do Parto		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3
P0	4,46 ± 1,16 ^B	3,75 ± 2,30 ^B	6,16 ± 0,00 ^A	5,12 ± 0,72 ^B	3,15 ± 2,61 ^C	6,10 ± 0,18 ^A
P1	5,86 ± 0,54	6,12 ± 0,14	6,08 ± 0,28	5,41 ± 0,53 ^B	6,08 ± 0,19 ^A	6,04 ± 0,35 ^A
P2	5,78 ± 0,64 ^{AB}	4,98 ± 1,49 ^B	6,04 ± 0,35 ^A	5,04 ± 0,69 ^B	4,78 ± 1,67 ^B	5,96 ± 0,45 ^A
P3	5,95 ± 0,50	6,05 ± 0,22	5,99 ± 0,35	5,27 ± 0,89	6,05 ± 0,22	5,96 ± 0,45

Sobrescritos diferentes nas linhas indicam diferenças (P<0,05) entre os grupos.

Todas as granjas estudadas possuíam um protocolo de vacinação contra PPV, mas G2 apresentou marrãs soronegativas no decorrer da gestação, sem que houvesse soroconversão para o vírus. A presença destes animais soronegativos durante toda a gestação inclui um grande risco para a ocorrência de falhas reprodutivas, visto que estes se apresentaram suscetíveis durante todo o estudo. Nesse estudo não realizamos detecção do PPV no soro das porcas e tecidos fetais, o que nos impede de avaliar o papel direto do vírus nos casos de falhas reprodutivas encontradas nas leitegadas das porcas acompanhadas. Diante destes resultados, observamos a necessidade da adoção de métodos diagnósticos para detectar e quantificar a presença do PPV nos tecidos de fetos mumificados e leitões natimortos e avaliar o envolvimento do vírus nos casos de falhas reprodutivas.

5.5. Indicativo da viremia para PCV2 nas porcas acompanhadas atuando no desenvolvimento de falhas reprodutivas

A frequência de viremia na CPC e na CP entre as granjas e nas quatro categorias estudadas e o título médio de anticorpos para PCV2 em cada categoria pode ser visto na Tabela 7.

Porcas virêmicas apresentaram elevadas médias de anticorpos para PCV2. Ao contrário, porcas não virêmicas, possuíam na grande maioria, médias de títulos de anticorpos mais baixas. Porcas da G1 não apresentaram viremia em nenhuma coleta e G3 exibiu apenas uma porca virêmica, o que ocorreu CPC. O maior número de porcas virêmicas foi encontrado na G2 (17/60).

Dentre as 18 porcas virêmicas, quatro (22,2%) apresentaram leitões soropositivos, sugerindo que, nestes animais, houve infecção transplacentária do PCV2 gerando, no entanto, leitões viáveis ao nascimento. Resultados semelhantes foram encontrados

por Madson et al. (2009d), que observaram anticorpos anti-PCV2 em soro de leitões de porcas vacinadas e infectadas experimentalmente e que tiveram viremia detectada, confirmando o potencial da transmissão vertical para a infecção pelo PCV2.

Porcas da G1 tiveram fetos mumificados e leitões natimortos com DNA do PCV2 sem, contudo apresentarem viremia nos dois momentos de coleta. De acordo com Bolin et al., (2001) um animal pode se recuperar da infecção pelo PCV2 e, apesar disto, a resposta imune pode não eliminar completamente o vírus, podendo levar a replicação viral ativa de forma intermitente. Isto explicaria a ausência de viremia nas porcas que apresentaram leitões com tecidos contendo PCV2. Uma hipótese para explicar a ausência de porcas virêmicas na G1 seria o emprego da vacinação para PCV2 em porcas de reposição, corroborando estudos que indicam que a vacinação de porcas não impede a infecção pelo vírus, mas reduz a viremia dos animais (Gerber, 2010).

Ao contrário da G1, G2 não vacinava porcas contra PCV2 e apresentou elevada proporção de animais virêmicos, de DNA viral em amostras de tecidos fetais para PCV2 e alguns leitões soropositivos ao nascimento, o que aumenta os indícios de que a vacinação de porcas pode ter efeito positivo na redução da ocorrência de viremia e provável infecção fetal. del Campo et al., (2010) verificaram aumento nos índices reprodutivos ao avaliarem um programa de vacinação e seu efeito sobre o controle de falhas reprodutivas em um rebanho com histórico de PCV2 associado a falhas reprodutivas. No entanto, a G3 não utilizava vacina contra PCV2 em porcas e mesmo assim apresentou resultados como reduzido número de animais virêmicos, ausência de porcas soronegativas, de leitões soropositivos ao nascimento e de tecido fetal com DNA viral, fato que não permitiu

Tabela 7: Relação entre a média dos títulos de anticorpos para PCV2 nas duas coletas e a ocorrência de viremia em todas as categorias e granjas estudadas.

Categoria	Coleta Pré-cobertura						Coleta do Parto					
	G1		G2		G3		G1		G2		G3	
	AT*	DNA**	AT*	DNA**	AT*	DNA**	AT*	DNA**	AT*	DNA**	AT*	DNA**
P0	12,32±1,77	0/8	10,07±2,62	0/16	11,70±0,96	0/13	12,07±0,7	0/8	12,07±0,68	3/16 (18,7%)	10,93±1,50	0/13
P1	8,57±1,66	0/8	11,44±2,41	4/16 (25%)	11,86±1,19	0/13	10,07±2,25	0/8	12,32±0	1/16 (6,2%)	10,93±1,50	0/13
P2	11,07±3,17	0/8	12,17±0,53	3/14 (21,4%)	11,48±1,33	1/12 (8,3%)	10,32±2,82	0/8	12,32±0	1/14 (7,1%)	10,98±1,55	0/12
P3	11,4 ±1,45	0/9	12,32±0	3/14 (21,4%)	11,15±1,58	0/12	11,43±2,02	0/9	12,32±0	3/14 (21,4%)	10,82±1,24	0/12

* Média do título de anticorpos totais para PCV2

** Presença de DNA do PCV2/total de porcas

atribuir ao vírus o papel de agente causador de falhas reprodutivas. Desta forma, sugerimos que a adoção da vacinação para PCV2 visando à proteção contra falhas reprodutivas seja avaliada de acordo com a situação epidemiológica de cada granja, considerando-se os *status sorológico*, a manifestação de sinais clínicos, o manejo da granja, dentre outros.

Nesse estudo investigamos a associação entre a ocorrência de viremia em porcas e a exposição fetal ao PCV2 (presença de leitões soropositivos ao nascimento e/ou fetos com DNA de PCV2). Os resultados desta associação podem ser vistos na Tabela 8.

Como pode ser visto na Tabela 8, nem todas as porcas virêmicas apresentaram leitegadas com alterações reprodutivas e a presença destas em leitegadas de porcas não virêmicas foi maior do que em leitegadas de porcas virêmicas. Com base nestas associações, podemos sugerir que a viremia pode não ser um fator determinante no desenvolvimento de alterações fetais causadas pelo PCV2 resultando em falhas reprodutivas em rebanhos suínos.

5.6. Indicativos do envolvimento do PCV2 nas alterações reprodutivas

O envolvimento do PCV2 em alterações reprodutivas foi investigado pela ocorrência da exposição fetal ao PCV2 que incluem

anticorpos anti-PCV2 no soro de leitões ao nascimento e detecção de DNA em tecidos de fetos mumificados e natimortos.

Das 543 amostras de soro de leitões coletados do cordão umbilical, 10 (1,8%) apresentaram baixos títulos de anticorpos para PCV2. Apenas G3 não apresentou leitões soropositivos para o vírus. Todos os leitões soropositivos eram provenientes de porcas com altos títulos de anticorpos nas duas fases de coleta.

Encontramos baixa frequência (1,8%) de leitões soropositivos para PCV2 ao nascimento. Esta frequência foi mais baixa na G1, que utilizava a vacinação em marrãs quando comparada a G2. Estes resultados corroboram os encontrados em um trabalho semelhante recentemente desenvolvido por Shen et al., (2010) que apesar de ter encontrado alta prevalência (21,4%) de leitões soropositivos nas cinco granjas acompanhadas, verificou a menor prevalência em uma granja que utilizava a vacinação para PCV2 em marrãs.

DNA de PCV2 foi detectado em 47/120 amostras de tecidos colhidos de fetos mumificados e natimortos. A G1 apresentou 24,2% de leitegada com fetos com DNA de PCV2 em tecidos (Tabela 9).

Tabela 8: Associação entre a ocorrência de porcas virêmicas e a exposição fetal ao PCV2 (presença de leitões soropositivos ao nascimento e/ou fetos com DNA de PCV2) nas três granjas acompanhadas durante o estudo.

	G1		G2		G3	
Viremia	Presença EF*	Ausência EF**	Presença EF*	Ausência EF**	Presença EF*	Ausência EF**
Presença	0	0	7	10	0	1
Ausência	9	24	15	28	0	49

* Número de porcas com leitegadas que apresentaram exposição fetal ao PCV2 (EF= leitões soropositivos ao nascimento e/ou fetos com DNA de PCV2)

** Número de porcas com leitegadas que não apresentaram exposição fetal ao PCV2 (EF= leitões soropositivos ao nascimento e/ou fetos com DNA de PCV2)

Tabela 9: Frequência de leitegadas com fetos mumificados e natimortos com DNA de PCV2 e número de fetos com DNA viral em cada categoria nas granjas 1 e 2.

Categoria	G1		G2	
	Leitegada com DNA*	Fetos com DNA**	Leitegada com DNA*	Fetos com DNA**
P0	2/8 (25%)	2	4/16 (25%)	18
P1	1/8 (12,5%)	1	3/16 (18,75%)	5
P2	2/8 (25%)	2	7/14 (50%)	7
P3	3/9 (33,3%)	3	4/14 (28,5%)	9
Total	8/33 (24,2%)	8	18/60 (30%)	39

* Número de porcas com leitegada contendo fetos com DNA de PCV2/total da categoria

** Número de fetos com DNA de PCV2 na categoria

G2 representou a maior frequência de leitegadas com tecidos positivos para o agente e maior número de fetos com DNA viral quando comparado a porcas da G1. Das amostras de fetos avaliadas na G3, nenhuma apresentou DNA de PCV2.

A detecção de DNA em tecido de feto mumificado ou natimorto sugere que a morte fetal pode ter ocorrido pela infecção intrauterina pelo PCV2 antes do período de imunocompetência fetal. Dados da literatura afirmam que quando ocorre viremia em porcas gestantes, o PCV2 pode atravessar a placenta e infectar fetos em diferentes estágios da gestação, causando retorno ao cio, morte fetal, aborto ou natimortos (West et al., 1999).

Os fetos mumificados e natimortos que apresentaram DNA de PCV2 pertenciam a leitegadas cujas porcas eram soropositivas e com altos títulos de anticorpos para PCV2. Ao avaliar os efeitos da infecção intrauterina aos 86, 92 e 93 dias de gestação de porcas soropositivas Johnson et al., (2002) encontraram fetos mumificados, natimortos e leitões com baixa viabilidade, sugerindo que o PCV2 pode causar danos fetais mesmo em porcas com elevados títulos de anticorpos.

A Figura 9 mostra a distribuição de porcas que apresentaram leitegadas com alterações

relacionadas à exposição ao PCV2 (fetos com DNA viral em tecidos e leitões soropositivos ao nascimento) dentro do total de falhas reprodutivas (total de mumificados, natimortos e leitegada menor ou igual a sete) ocorridas em cada granja estudada. Mais de 50% das falhas reprodutivas da G2 havia algum envolvimento do PCV2. Na G1 a participação do vírus correspondeu a 45% dos casos com desordens reprodutivas. Diferente das demais granjas, na G3 nenhum caso de alteração reprodutiva teve a participação do PCV2. Estes dados sugerem que a exposição fetal ao PCV2 apresentou associação com o desenvolvimento de desordens reprodutivas.

De acordo com Sanchez et al. (2001), a detecção de anticorpos em fetos é um bom parâmetro para o diagnóstico da infecção fetal ocorrendo aos 75 dias ou mais tardiamente. Apesar da infecção uterina após o período de imunocompetência permitir o nascimento de leitões soropositivos e viáveis ao nascimento, pode haver uma piora na conversão alimentar no período pós-desmama dos leitões infectados no período fetal em relação aos não infectados (Ha et al., 2008).

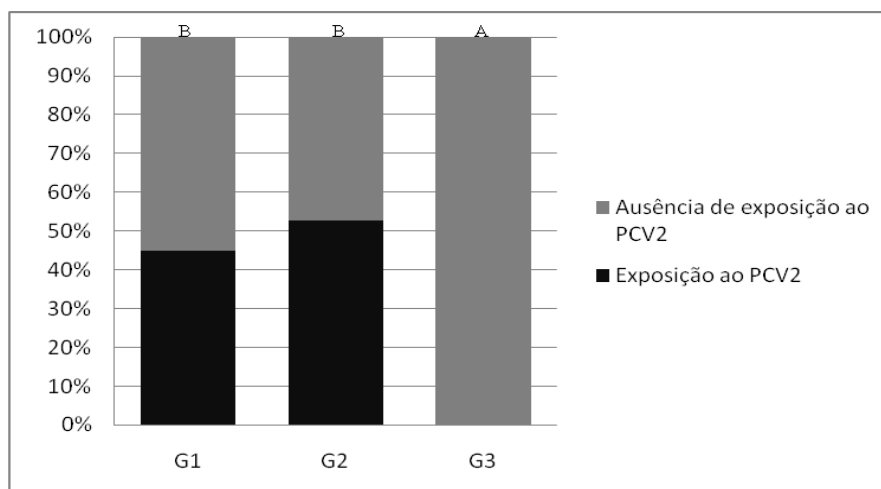


Figura 9: Distribuição de porcas que apresentaram leitegadas com exposição fetal relacionadas ao PCV2 no total de desordens reprodutivas de cada granja no período estudado.

A detecção de tecidos fetais com DNA de PCV2, especialmente na G2, e os resultados da associação entre ocorrência da exposição fetal ao PCV2 e desenvolvimento de falhas reprodutivas corrobora resultados encontrados que sugerem que a detecção do PCV2 em fetos mumificados e leitões natimortos seja um bom indicativo de infecção durante a gestação. Ritterbusch et al., (2010) investigaram a relação entre a infecção natural pelo PCV2 e a ocorrência de falhas reprodutivas por meio da detecção viral em 169 fetos abortados, mumificados e natimortos, encontrando 29 (17,1%) amostras com DNA de PCV2. Além disso, antígeno viral foi detectado por IHC em 58,6% dos fetos avaliados, mostrando a importância da infecção do PCV2 e o desenvolvimento de problemas reprodutivos.

5.7. Indicativo de envolvimento do PPV nas alterações reprodutivas

O envolvimento do PPV em alterações reprodutivas foi investigado pela detecção de anticorpos anti-PPV no soro de leitões ao nascimento e em conteúdo estomacal de fetos mumificados e natimortos.

Com relação à sorologia dos leitões ao nascimento, 14/543 (2,5%) dos animais das

três granjas estudadas foram soropositivos e viáveis ao nascimento, com baixos títulos de anticorpos para PPV, sugerindo que ocorreu transmissão vertical do vírus, com conseqüente infecção de alguns fetos na fase de imunocompetência. Este resultado está de acordo com os de Johnson (1971), que infectou marrãs oralmente na gestação e encontrou perfis de imunoglobulinas diferentes para os diferentes estágios de gestação utilizados. A inoculação antes dos 50 dias de gestação ou após 80 dias não gerou leitões com imunoglobulinas específicas para PPV; leitegadas de marrãs infectadas entre 55 e 80 dias de gestação apresentaram variado número de leitões com altos títulos de imunoglobulinas específicas.

A detecção de leitões soropositivos para PPV provenientes de porcas com altos títulos de anticorpos à cobertura sugere que pode ocorrer viremia em animais que apresentam títulos elevados de anticorpos. No entanto, a literatura sugere que baixos títulos já são protetores e, portanto, capazes de proteger os fetos da infecção intrauterina (Paul et al., 1986, Sørensen e Askaa, 1981). Os resultados encontrados indicam que, mesmo utilizando o protocolo de vacinação, que de acordo com a literatura induz títulos baixos, porém protetores

(Mengeling et al., 1979), ainda ocorreu transmissão transplacentária, sugerindo que a vacina pode não fornecer proteção necessária para evitar tal evento. Além disso, outras amostras virais da família *Parvoviridae* descritas recentemente, podem estar atuando no desenvolvimento da parvovirose (Lau et al., 2008; Cheung et al., 2010). No entanto, estudos sobre o potencial patogênico, forma de atuação e nível de proteção das vacinas atualmente utilizadas contra estas novas amostras virais precisam de maiores esclarecimentos.

A sorologia de conteúdo estomacal também foi parâmetro para avaliar a participação do PPV no desenvolvimento de falhas reprodutivas em nosso trabalho. Amostras de conteúdo estomacal de 49 leitões natimortos foram testadas para a presença de anticorpos para PPV. A maioria destes leitões apresentava mais de 16 cm, o que sugere morte fetal após o período de 70 dias de gestação. Marrãs da G2 apresentaram a menor média de títulos de anticorpos para PPV na CPC e na CP (Tabela 10) e o maior número de amostras de conteúdo estomacal com anticorpos anti-PPV foi encontrada nesta categoria (Tabela 11). Porcas com títulos de anticorpos para PPV considerados protetores, apresentaram natimortos com anticorpos anti-PPV no conteúdo estomacal. Fato semelhante ocorreu em porcas que soroconverteram a partir de títulos negativos, sugerindo contato natural com o vírus.

Das 49 amostras de conteúdo estomacal avaliadas, 17 (34,69%) demonstraram títulos de anticorpos para PPV que variaram de baixos a moderados. Adicionalmente, algumas porcas apresentaram leitões natimortos ou mumificados soropositivos e soronegativos na mesma leitegada, além de leitões viáveis soronegativos para PPV (Tabela 11). Esses resultados sugerem que a morte fetal pode ter ocorrido como consequência da infecção pelo PPV; além disso, houve diferença no acometimento entre leitões *in utero* gerando animais positivos e negativos na mesma leitegada, fato justificado pela lenta propagação do vírus no útero. Resultados semelhantes foram encontrados por Cropper et al., (1976) ao avaliarem a associação entre o tamanho da leitegada e a presença de anticorpos para o enterovírus suíno (PEV) e o PPV em fluidos corporais de fetos suínos. Para isto, utilizaram fetos de porcas prenhes em diferentes estágios da gestação e animais considerados soropositivos apresentaram títulos de anticorpos entre baixos e moderados, corroborando os resultados encontrados em nosso estudo. No entanto, Rocha et al., (2010) pesquisaram DNA viral em diversos órgãos de leitões mumificados e natimortos e no conteúdo estomacal de alguns destes animais, e encontraram 2,6% (6/230) e 2,8% (3/109) amostras positivas para DNA viral em órgãos e conteúdo estomacal, respectivamente, sugerindo baixa frequência viral nas granjas.

Tabela 10: Média de anticorpos para PPV nas duas coletas e frequência de leitegadas contendo fetos mumificados e leitões natimortos com anticorpos anti-PPV em conteúdo estomacal.

Categoria	Coleta Pré-cobertura ^a			Coleta do Parto ^b			CE leitões ^c		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
P0	4,22± 1,39	3,18± 2,43	6,16± 0	4,97± 0,84	2,66± 2,58	6,12± 0,13	2/8	2/16	0/13
P1	5,78± 0,58	6,12± 0,12	6,08± 0,27	5,41± 0,53	6,03± 0,22	5,96± 0,38	0/8	2/16	0/13
P2	5,59± 0,72	4,80± 1,51	6,07± 0,28	5,03± 0,69	4,23± 1,81	6,07± 0,28	2/8	0/14	0/12
P3	5,88± 0,56	5,91± 0,54	6,03± 0,31	5,27± 0,89	5,76± 0,92	6,07± 0,28	3/9	0/14	0/12

^aMédia dos títulos de anticorpos por categoria na CPC

^bMédia dos títulos de anticorpos para PPV por categoria na CP

^cFrequência de porcas com leitões soropositivos em amostras de conteúdo estomacal

A avaliação da exposição fetal ao PPV apresentou associação com a ocorrência de desordens reprodutivas na G1 e G2 (Figura 10). A G3 apresentou somente uma porca com alterações reprodutivas e indicativo de exposição fetal simultaneamente, e os dois leitões soropositivos ao nascimento eram de leitegadas nas quais não ocorreu desordens reprodutivas (Anexo 5). Desta forma, podemos sugerir que as alterações reprodutivas na G3 no período estudado

não ocorreram com a participação do PPV.

De uma forma geral, G1 e G2 apresentaram alterações relacionadas à exposição fetal por atuação do PPV. Na G1, em 35% das desordens reprodutivas havia a participação do vírus. Na G2 este valor correspondeu a 18,4%. Com base nestes resultados podemos sugerir que o PPV foi responsável por parte das alterações reprodutivas que ocorreram nas duas granjas citadas acima.

Tabela 11: Associação entre presença de anticorpos anti-PPV em conteúdo estomacal de leitões natimortos e mumificados e ocorrência de leitões soropositivos para PPV ao nascimento.

Granja	Categoria	CE	Leitões soropositivos	Mumificados	Natimortos
G1	P0	1	Não	0	2
G1	P0	1	Não	0	1
G1	P2	1	Não	0	1
G1	P2	2	Não	0	2
G1	P3	1	Não	0	1
G1	P3	1	Não	1	1
G1	P3	1	Não	0	1
G2	P0	1	Não	1	0
G2	P0	5	*	1**	2
G2	P1	2	Não	0	2
G2	P1	1	Não	0	2

* Não foram coletadas amostras de soro da leitegada da porca correspondente.

**Houve diferença entre o número de mumificados registrado pela granja e o observado durante o estudo. Valores encontrados no estudo são encontrados no Anexo 3.

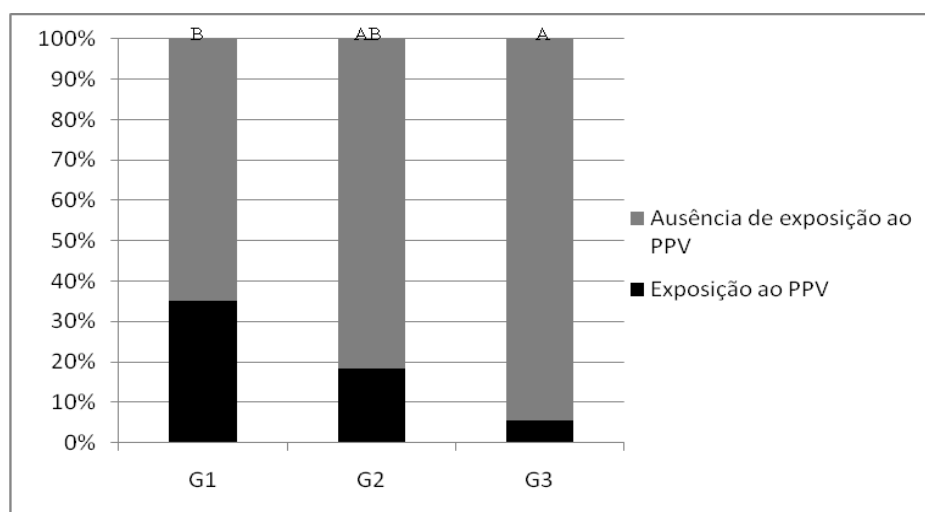


Figura 10: Distribuição de porcas que apresentaram leitegadas expostas ao PPV no total de desordens reprodutivas de cada granja no período estudado.

5.8. Envolvimento simultâneo do PCV2 e PPV nas alterações reprodutivas

A co-participação do PCV2 e do PPV no desenvolvimento de falhas reprodutivas foi investigada em nosso estudo por meio da detecção de alterações reprodutivas nas quais houvesse a ocorrência do envolvimento de ambos os vírus (leitões soropositivos ao nascimento para PCV2/PPV, leitões natimortos com anticorpo anti-PPV em conteúdo estomacal e tecido fetal com DNA de PCV2). De acordo com a Figura 11, 25% dos casos de alterações reprodutivas na G1 tiveram a participação do PCV2 e do PPV, enquanto que na G2, os dois vírus estavam presentes em 21,1% das alterações reprodutivas observadas. G3 não apresentou nenhum caso de co-participação do PCV2 e do PPV.

Estes resultados sugerem uma possível interação entre PCV2 e PPV, conforme alguns estudos indicam atualmente (Pescador et al., 2007; McDowell et al., 2009). No entanto, diagnóstico mais preciso precisaria ser feito para confirmar esta situação. Alguns trabalhos investigaram de diferentes formas os efeitos da atuação dos dois agentes concomitantemente.

Ao avaliar tecidos de fetos abortados e leitões natimortos por IHC, Pescador et al. (2007) encontraram lesões mais severas em leitões e fetos nos quais havia infecção pelo PCV2 e pelo PPV, quando comparado às lesões decorrentes da infecção de cada vírus isoladamente, indicando um sinergismo entre os dois agentes. DNA viral para PCV2 e PPV foram encontrados em tecidos de leitões natimortos e mumificados em um rebanho apresentando elevados títulos de anticorpos para PPV e com altas taxas de falhas reprodutivas (McDowell et al., 2009). Neste caso, apesar do desconhecimento do papel exato do PCV2 na ocorrência das falhas reprodutivas, os autores sugerem que o PCV2 pode ter causado infecção subclínica e, então, reduzido a eficácia vacinal para PPV, causando efeitos sinérgicos para aumentar a severidade do surto, ou causado abortos no final da gestação, o que não é típico da patogenia do PPV isolado.

A G3 não apresentou falhas reprodutivas associadas ao PCV2 e ao PPV isolados ou em associação. Desta forma, os problemas reprodutivos demonstrados pela granja no momento da seleção para o estudo não incluíam a participação dos dois agentes.

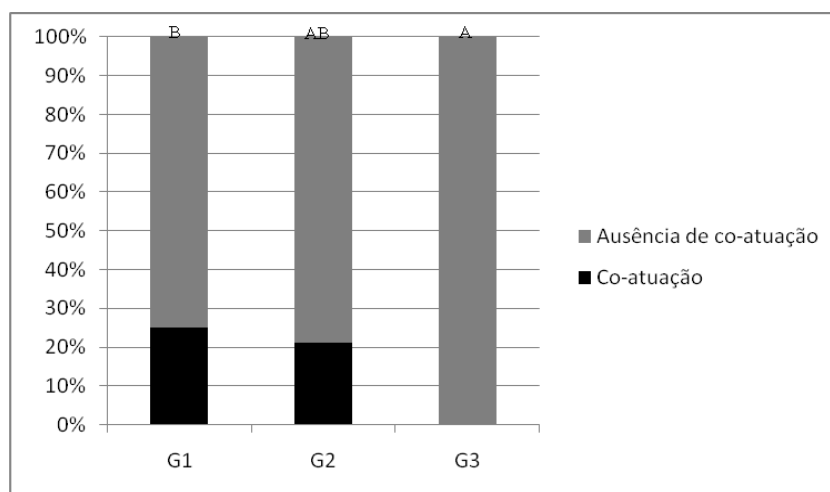


Figura 11: Distribuição de casos de alterações relacionadas à exposição fetal ao PCV2 e o PPV simultaneamente nas alterações reprodutivas nas três granjas acompanhadas.

Diversos fatores podem causar falhas reprodutivas em rebanhos suínos. Toxinas, estresse ambiental e nutricional, doenças sistêmicas e agentes virais e bacterianos estão incluídos nos grupos de agentes infecciosos e não infecciosos mais comumente responsáveis pelo desenvolvimento de desordens reprodutivas (Maldonado et al., 2005). No entanto, não foi objetivo do nosso estudo a detecção de nenhum destes fatores.

6. Conclusões

Com base nos resultados podemos concluir:

- O PCV2 foi associado a alterações reprodutivas na G1 e G2.
- PCV2 e PPV estiveram simultaneamente associados à ocorrência de transmissão transplacentária e desenvolvimento de falhas reprodutivas em alguns animais da G1 e G2.
- A vacinação das porcas contra o PPV e PCV2 não impediu a ocorrência de infecção transplacentária.
- Ocorreu infecção transplacentária pelo PCV2 e pelo PPV em porcas com títulos de anticorpos elevados, gerando leitões soropositivos e viáveis ao nascimento.
- A presença de viremia próxima à cobertura ou ao parto não correlacionou com alterações reprodutivas ou fetais.
- Alterações reprodutivas na G3 não estão relacionadas à presença do PCV2 e do PPV.

7. Referências bibliográficas

ALLAN, G. M.; ELLIS, J. A. Porcine circoviruses: a Review. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 12, p. 3-14, 2000.

ALLAN, G. M.; McNEILLY, F.; CASSIDY, J. P.; et al. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and

examination of pig fetal material. *Vet. Microbiol.*, v. 44, p. 49-64, 1995.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S; McNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Path.*, v. 121, p. 1-11, 1999.

APPLIED BIOSYSTEMS. Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR. Part number 4371090, 2003, 8p. [Manual].

BARBOSA, C.N.; LOBATO, Z.I.P.; MARTINS, N.R.S.; et al. Perfil sorológico para circovírus suíno 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.4, p. 815-820, 2008.

BIAGINI P. 2004. Human circoviruses. *Vet.y Microbiol.*, v.98, p.95-101, 2004.

BOLIN, S.R.; STOFFREGEN, W. C.; NAYAR, G.P.S.; et al. Post-weaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of cesarean-derived, colostrums-deprived piglets with type 2 porcine circovirus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 13, p. 185-194, 2001.

BONTE, P.; VANDEPLASSCHE, M.; BIRONT, P. Porcine parvovirus infection in boars: influence on fertility. *Zbl. Vet. Med. B*, v. 31, p. 391- 395, 1984.

BRUNBORG, I.M.; JONASSEN, C.M.; MOLDAL, T.; et al. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.19, p.368-75, 2007.

CALSAMIGLIA, M.; FRAILE, L.; ESPINAL, A.; et al. Sow porcine circovirus type 2 (PCV2) status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Res. Vet. Sci.*, v.82, 3 p. 299-304, 2007.

CARASOVA, P.; CELER, V.; TAKACOVA, K.; et al. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. *Res. Vet. Sci.*, v.83, p.274-8, 2007.

CARTWRIGTH, S.F.; HUCK, R.A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Veterinary Record*. 81: 196- 197, 1967.

CASTRO, A.M.; KANASHIRO, T.M.; SALGADO, V.R.; SOUZA, S.O.; CRUZ, T.F.; FERRARI, K.L.; PESSOA, J.J.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. PCV2 subtype and co-agents involved in reproductive failure occurring in PCV2-positive swine farms in São Paulo state, Brazil. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.

CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of a etiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.*, v. 168, p. 41-49, 2004.

CHEUNG, A.K.; WU, G.; WANG, D.; BAYLES, D.O.; LARGER, K.M.; VINCENT, A.L. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Arch. Virol.*, v. 55, p. 801-806, 2010.

CLARK, L.K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. *An. Reproduc. Scien.*, v. 42, p. 447- 454, 1996.

CROPPER, M.; DUNNE, H.W.; LEMAN, A.D. Prevalence of antibodies to porcine enteroviruses and porcine parvovirus in body fluids of fetal pigs. 1976.

CUTLER, R.S.; MOLITOR, T.W.; LEMAN, A.D.; SAUBER, T.E. Effect of porcine parvovirus serostatus on the reproductive performance of mated gilts in an infected herd. *Am. Jour. Vet. Res.*, v.43 (6), p. 935-937, 1982.

DARWICH, L; SEGALÉS, J.; MATEU, E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch. Virol.*, v. 149, n. 5, p. 857-874, 2004.

del CAMPO, C.M.; AGUILAR, F.; ESPINOZA, S.; GARCIA-CAMACHO, L.A.; QUINTERO, V. Immunization program to control PCV2-associated reproductive failure in sows using a commercial vaccines. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.

DELISLE, C.; DELISLE, G.; BRIDOUX, N.; THIBAUT, J.C.; LONGO, S.; JOISEL, F.; Results of sow vaccination against PCV2 with Circovac in France: Improvement of reproduction parameters. In Proceedings of 20th International Pig Veterinary Society Congress. 2008, Durban, Anais..., Durban, 2008.

EBBESEN, T.; KUNTSMANN, L. Effect of sow vaccination with Circovac on stillborn piglets. In Proceedings of 20th International Pig Veterinary Society Congress. 2008, Durban, Anais..., Durban, 2008.

ENRIQUEZ, K.; QUINTERO, V.; RANGEL-RODRIGUEZ, I.C.; ROMERO, Y.; PEREZ-RAZO, M.A.; GARCIA-CAMACHO, L.A. Relationship of histopathology and PCV2 detection in fetal and neonatal myocardium from cases of reproductive failure in sows. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.

- FARNHAM, M.W.; CHOI, Y.K.; GOYAL, S. M.; et al. Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. *Can. J. Vet. Res.*, v. 67, p. 108-113, 2003.
- FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; HAQSHENAS, G.; et al. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J. Virol.* v.76, n. 2, p. 541-51, 2002.
- FINSTERBUSCH, T.; MANKERTZ, A. Porcine circoviruses – small but powerful. *Virus Res.* v. 143, p. 177-183, 2009.
- 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. *Vaccine*, v. 27, n.30, p.4031-7, 2009.
- FRAILE, L.; CALSAMIGLIA, M.; MATEU, E.; ESPINAL, A.; CUXART, A.; SEMINATI, C.; MARTIN, M.; DOMINGO, M.; SEGALÉS, J. prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 73, p. 308-312, 2009.
- GAVA, D.; STRECK, A.F.; SOUZA, C.K.; GONÇALVES, K.R.; CANAL, C.W.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Atualização sobre a parvovirose na suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, supl. 1, p105-115, 2009
- GAVA, D.; ZANELLA, E.L.; MORÉS, N.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by sêmen and viral distribution in different piglet tissues. *Pesq. Vet. Bras.*, v.28 (1), p. 70-76, 2008.
- GERBER, P.; GARROCHO, F.; LOBATO, Z. Porcine circovirus type 2 (PCV2) in útero seroconversion, early viremia, and serological profile in naturally infected piglets. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- GERBER, P.F. Estudo da transferência passiva de imunoglobulinas e infecção precoce de leitões por circovírus suíno 2. 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GERBER, P.F.; GALINARI, G.C.; 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.*, v.87, n.3, p.488-91, 2009.
- GERBER, P.F.; GARROCHO, F.M.; LANA, A.M.G.; LOBATO, Z.I.P. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *The Veterinary Journal* (2010), doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.023.
- GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; et al. Porcine circovirus 2 and porcine circovirus-associated disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.23, n.6, p.1151-63, 2009.
- GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* (2008), doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.018.
- GOUVEIA, A.M.G.; GOMES, M.C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para parvovírus suíno no Estado de Minas

Gerais. *Pes. Vet. Bras.*, v.4 (1), p.17- 22, 1984.

GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal* (2010), doi: 10.1016/j.tvjl.2010.01.018.

GRAU-ROMA, L.; HJULSAGER, C.K.; SIBILA, M.; et al. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet. Microbiol.*, v.135, p.272–82, 2009.

HA, Y.; LEE, Y.H.; AHN, K.K.; et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Vet. Pathol.*, v.45, n.6, p.842-8, 2008.

HANSEN, M.S.; HJULSAGER, C.K.; BILLE-HANSEN, V.; HAUGEGAARD, K.D.; HØGEDAL, P.; KUNSTMANN, L.; LARSEN, L. Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures. *Vet. Microbiol.* (2010), doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.038.

HIJISAKA, M.; ABE, K.; WIN, K.M.; SHIMIZU, Y.K.; KEICHO, N.; YOSHIKURA, H. Identification of a new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Japanese Journal on Infection and Disease*, v. 54, p. 244- 245.

JOISEL, F.; BRUNE, A.; SCHADE, A.; LONGO, S.; CHARREYRE, C. Improvement of reproduction performance induced by PCV2 vaccination of sows and gilts with Circovac in 277 German sow farms. In Proceedings of 20th International

Pig Veterinary Society Congress. 2008, Durban, Anais..., Durban, 2008.

JONHSON, C.S.; JOO, H.S.; DIREKSIN, K.; et al. Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* v.14, p. 507-512, 2002.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C. R.; JOHNSON, R. H. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. *Arch. Virology*, v. 51, p. 123-129, 1976.

KEKARAINEN, T.; McCULLOUGH, K.; FORT, M.; FOSSUM, C.; SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M. Immune responses and vaccine-induced immunity against porcine circovirus type2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, in press, 2010.

KIM, L.; CHUNG, H. K.; JUNK, T.; et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J. Vet. Med. Sci.*, v.64, p.57-62, 2002.

LARROCHELE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; et al. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 4629-4632, 2000.

LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y.; TSE, H.; FU, C.T.Y.; AU, W.; CHEN, X.; TSOI, H.; TSANG, T.H.F.; CHAN, J.S.Y.; TSANG, D.N.C.; LI, K.S.M.; TSE, C.W.S.; NG, T.; TSANG, O.T.Y.; ZHENG, B.; TAM, S.; CHAN, K.; ZHOU, B.; YUEN, K. Identification of novel porcine reproductive and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *Viral Immunology*. v. 89, p. 1840- 1848, 2008.

LIPEJ, Z.; NOVOSEL, D.; BALATINEC, J.; ROIC, B. Investigation of reproductive failures caused by porcine circovirus type 2 in large pig production units Croatia. In:

21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.

LOBATO, Z.I.P. Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra o parvovírus suíno com uma vacina inativada experimental e pelo método de “feed back” (retroinfecção). 1990, 90p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOBATO, Z.I.P.; GERBER, P. F.; BORGES, I. A.; et al. PCV2 circulation and serological profiles of swine in Brazilian farrow-to-finish barns with and without PMWS. In: 5th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 2007, Krakow, Anais ... Krakow, 2007.

LUCAS, M.H.; CARTWRIGTH, S.F.; WRATHAL, A.E. Genital infection of pigs with porcine parvovirus. *J. Comparative Pathology*. v. 84, p. 347- 350, 1974.

MADEC, F.; ROSE, N.; EVENO, E.; MORVAN, P.; LAROUE, G.; JOLLY, J.P.; LE DIGUERHER, G.; CARIOLET, R.; LEDIMA, M.; BLANCHARD, P.; JESTIN, A. PMWS: on farm observations and preliminary analytic epidemiology. In Proceedings of the ssDNA Viruses Plants, Birds, Pigs and Primates Meeting, p. 86-87, 2001.

MADSON, D.; PATTERSON, A.; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X.F.; OPRIESSNIG, T. Reproductive effects associated with PCV2 in naïve sows artificially inseminated with spiked boar semen. In: AMERICAN ASSOCIATED SWINE VETERINARIANS, Dallas, 2009, Anais... Texas, p. 151-152a.

MADSON, D.M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S.; et al.. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus 2 (PCV2) immunity on fetal

infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. *Theriogenology*, v.72, n.6, p.747-54, 2009b.

MADSON, D.M.; RAMAMOORTHY, S.; KUSTER, C.; et al. Infectivity of porcine circovirus 2 DNA in semen from experimentally-infected boars. *Vet. Res.*, v.40, n.1, p.10, 2009c.

MADSON, D.M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S.; et al. Effect of porcine circovirus 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. *Clin. Vacc. Immunol.*, v.16, n.6, p.830-834, 2009d.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *Vet. J.* v. 169, p. 454-456, 2005.

MATEUSEN, B.; MAES, D.G.; van SOOM, A.; et al. Effect of a porcine circovirus 2 infection on embryos during early pregnancy. *Theriogenology*, v.68, n.6, p.896-901, 2007.

MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.; VAN SOOM, A.; MEERTS, P.; MAES, D.; NAUWYNCK, H. Interaction of porcine circovirus type 2 (PCV2) with pig embryos. In: 4th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASES, 2003, Rome, Anais... Rome, 2003.

MCDOWELL, E.J.; WOODS, A.L.; HOLTKAMP, D.; GILLESPIE, T.G. Diagnostic investigation into a reproductive failure associated with porcine parvovirus and porcine circovirus coinfection. In: AMERICAN ASSOCIATED SWINE VETERINARIANS, Dallas, 2009, Anais... Texas, p. 67-74.

- McINTOSH, K.A.; HARDING, J.C.; ELLIS, J.A.; et al. Detection of porcine circovirus 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *C. J. Vet. Res.*, v.70, n.1, p.56-61, 2006.
- McINTOSH, K.A.; TUMBER, A.; HARDING, J.C.; et al. Development and validation of a SYBR green real-time PCR for the quantification of porcine circovirus type 2 in serum, buffy coat, feces, and multiple tissues. *Vet. Microbiol.*, v.133, p.23-33, 2009.
- McKEWON, N.E.; OPRIESSNIG, T.; THOMAS, P.; et al. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) maternal antibodies on experimental infection of piglets with PCV2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.12, p.1347-1351, 2005.
- MEERTS, P.; MISINZO, G.; LEFEBVRE, D.; et al. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV-2-associated disease. *BMC Vet. Res.*, v.2,6 p. 1-11, 2006.
- MENGELING, W. L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, v. 33, p.2239- 2248, 1972.
- MENGELING, W. L.; BROWN, T. T.; PAUL, P. S.; GUTEKUNST, D.E. Efficacy of an inactivated virus vaccine to prevention of porcine parvovirus- induced reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.*, v. 40, p. 204- 207, 1979.
- MENGELING, W.L.; PAUL, P.S.; BROWN, T.T. Transplacental infection and embryonic death following maternal exposure to porcine parvovirus near the time of conception. *Arch. Of Virol.*, v. 65, p. 55-62, 1980.
- MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *An. Reprod. Scien.*, v.60-61, p. 199-210, 2000.
- MULLER, V.; PERREUL, G.; HERIN, J.; VILA, T.; JOISEL, F. Clinical case: porcine circovirus type 2 (PCV2) and mycotoxine presence in an abortion case. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- NIELSEN, J.; RØNSHOLT, L.; SØRENSEN, K.J. Experimental in utero infection of pig fetuses with porcine parvovirus (PPV). *Vet. Microb.*, v. 28, p.1-11, 1991.
- NOIRIT, M.; FIFY, B.; PERREUL, G.; HERIN, J.; DELVECCHIO, A.; VENET, J.; JOISEL, F. Improvement of reproductive parameters in gilts after CIRCOVAC vaccination in a farrow-to-finish farm in France. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; et al. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in multisite swine production unit. *Can. Vet. J.*, v. 42, n.7, p. 551-553, 2001.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X-J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 19, p. 591-615, 2007.
- OPRIESSNIG, T.; PATTERSON, A.R.; ELSENER, J.; et al. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from

- experimental infection with PCV2. *Clin. Vac. Immunol.*, v.15, n.3, p.397-401, 2008.
- OPRIESSNIG, T.; YU, S.; THACKER, E.L.; et al. Derivation of porcine circovirus type 2 negative pigs from positive sow herd. *J. Swine Health Prod.*, v.12, p.186-191, 2004.
- OSTANELLO, F.; CAPRIOLI, A.; DI FRANCESCO, A.; et al. Experimental infection of 3 week old conventional colostrums fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet. Microbiol.*, v.108, p. 179-186, 2005.
- PARK, J.S.; HA, Y.; KWON, B.; et al. Detection of porcine circovirus 2 in mammary and other tissues from experimentally infected sows. *J. Comp. Pathol.*, v.140, p.208-11, 2009.
- PARK, J.S.; KIM, J.; HA Y.; et al. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. *J. Comp. Pathol.*, v.132, p. 139-144, 2005.
- PAUL, P.S.; MENGELING, W. L.; BROWN, T.T. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, v.41, p. 1368- 1371, 1980.
- PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; PIRTLE, E.C. Duration and biological half-life of passively acquired colostrum antibodies to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*, v.43, p. 1376-1379, 1982.
- PENSAERT, M.B.; SANCHEZ Jr., R.E.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; et al. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet. Microbiol.*, v.98, p.175-183, 2004.
- PERREUL, G.; FILY, B.; LONGO, S.; VILA, T.; HERIN, J.; VENET, J.; JOISEL, F. Porcine circovirus type 2 (PCV2) prevalence in abortions in France. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M.; CASTRO, L.A.; ANTONIASSI, N.A.B.; RAVAZZOLO, A.P.; SONNE, L.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* v. 27, p. 425-429, 2007.
- PITTMAN, J.S. Reproductive failure associated with porcine circovirus 2 in gilts. *J. Swine Health Prod.*, v.16, n.3, p.144-148, 2008.
- QUINTERO, V.; ROMERO, Y.; ENRIQUEZ, K.; GARCIA-CAMACHO, L.A. Reproductive failure associated to PCV2 and its distribution in the Mexican Republic. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- RITTERBUSCH, G.A.; ROCHA, C.S.; MORES, N.; SIMON, N.L.; CIACCIZANELLA, J.R. Natural infection of porcine circovirus type 2 (PCV2) in fetuses from sows with reproductive failures. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- RITZMANN, M.; WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; ETSCHMANN, B.; BOGNER, K.H.; SELBITZ, H.J.; HEINRITZI, K.; TRUYEN, U. Prevalence and association of PCV2, PPV and PRRSV in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets, *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 112, 348-351, 2005.

- ROCHA, C.S.; SIMON, N.L.; RITTERBUSCH, G.A.; VIANCELLI, A.; MORES, N.; AMARAL, A.L.; ESTEVES, P.A.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Research of porcine parvovirus (PPV) in organs and stomach fluid of stillbirth, mummified and aborted fetuses and phylogenetic analyses of PPV isolated from fetal tissue. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- RODEFFER, H.E.; LEMAN, A.D.; DUNNE, H.W.; CROOPER, M.; SPRECHER, J. Reproductive failure in swine associated with maternal seroconversion for porcine parvovirus. *JAVMA*, v. 166, p. 991-992, 1975.
- RODRIGUEZ, C.A.R.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, Estado do Pará. *Arq. Inst. Biol.*, v.70, n.4, p. 501-503, out./dez., 2003.
- SAHA, D.; LEFEBVRE, D.J.; VAN DOORSSELAERE, J.; ATANASOVA, K.; BARBÉ, F.; GELDHOF, M.; KARNIYCHUK, U.U.; NAUWYNCK, H.J. Clinical and virological outcome of experimental PCV2a and PCV2b infections in mild-gestacional porcine fetuses. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- SALMON, H.; BERRI, M.; GERDTS, V.; MEURENS, F. Humoral and cellular factors of maternal immunity in swine. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 33, p. 384-393, 2009.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. Cap.8 Appendix, p. 8.1- 8.55.
- SANCHEZ Jr, R.E.; NAUWYNCK, J.H.; McNEILLY, F.; et al. Porcine circovírus 2 infection in swine fetus inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.*, v. 83, p. 169-176, 2001.
- SANCHEZ Jr., R.E.; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H.J.; et al. Change of porcine circovírus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet. Microbiol.*, 95, 15-25, 2003.
- SCHNEIDER, L.G.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BORCHARDT NETO, G. Erros de anotações na elaboração de índices de produção em granjas industriais de suínos no Sul do Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.1, p.81-85, 2004.
- SEGALES, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. *Anim. Health Res. Rev.*; 6:119-142, 2005
- SHARMA, R.; SAIKUMAR, G. Porcine parvovirus and porcine circovirus 2-associated reproductive failure and neonatal mortality in crossbred Indian pigs. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.42, p. 512-522, 2010.
- SHEN, H.; WANG, C.; MADSON, D.M.; OPRIESSNIG, T. High prevalence of porcine circovírus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *PREVET* (2010), doi:10.1016/j.prevetmed.2010.09.020.
- SHIBATA, I.; OKUDA, Y.; YAZAWA, S.; et al. PCR detection of porcine circovírus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swabs nasal and feces from experimentally infected pigs and field cases. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 65, p. 405-408, 2003.
- SOARES, R.S.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; MARTINS, V.G.; BACCI, M.; FERNANDES, F.M.C.; RICHTZENHAIN,

- L.J. genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analyses of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J. General Virology*. V.84, p.1505-1515, 2003.
- SOBESTIANSKY J, BARCELLOS D. Doenças de Suínos. Goiania: *Canone Editorial*, 770p, 2007.
- SØRENSEN, K.J.; ASKAA, J. fetal infection with porcine parvovirus in herds with reproductive failure. *Acta vet. Scand.*, v.22, p. 162-170, 1981.
- STEINER, E.; BALMELLI, C.; HERRMANN, B.; et al. Porcine circovirus 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, v.378, n.2, p.311-22, 2008.
- STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. Diseases of Swine, 8th edition, Iowa State University Press, 1999.
- SYDLER, T.; BRUGNERA, E.; ENGELS, M.; BUERGI, E.; SIDLER, X. PCV2 associated mummification and stillbirth in gilts. In: 21th International Pig Veterinary Society Congress, 2010, Canadá, Anais..., Canadá, 2010.
- VAN LEENGOED, L.A.; VOS, J.; GRUYS, E.; RONDHUIS, P.; BRAND, A. Porcine parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. *The Vet. Quarterly*, v. 5 (3), 1983.
- WEST, K.H.; BYSTROM, J.M.; WOJNAROWICH, C.; et al. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 11, v. 6, p. 530-532, 1999.
- WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; SELBITZ, H. J.; TRUYEN, U. Real time protocol for detection of porcine parvovirus in field samples. *J. Virological Methods*, v. 134, p. 257-260, 2006.
- WOODS, A.L.; McDOWELL, E.J.; HOLTKAMP, D.; POGRANICHNIY, R.M.; GILLESPIE, T.G. Reproductive failure associated with porcine parvovirus and possible porcine circovirus type 2 co-infection. *J. Swine Health and Prod.*, july.-august, 2009.
- YOON, K.J.; JESPER, R.J.; POGRANICHNIY, S.S.; STAMMER, R.; EVANS, L.E. A novel approach to intrauterine viral inoculation of swine using PCV type 2 as a model. *Theriogenology*, v. 61, p. 1025-1037, 2004.
- YU, S.; OPRIESSNIG, T.; KITIKOON, P.; et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.115, p.261-272, 2007.
- ZANELLA, J. R. C. Doenças emergentes na suinocultura brasileira: circovirose suína. Disponível em http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Palestras2001/Janice_Ciacci_Zanella_1.pdf. Acesso em 14/05/2009.
- ZEEUW, E.J.L.; LEINECKER, N.; HERWIG, V.; SELBITZ, H. J., TRUYEN, U. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, v. 88, p. 420-427, 2007.
- ZIMMERMANN, P.; RITZMANN, M.; SELBITZ, H. J.; HEINRITZI, K.; TRUYEN, U. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 295- 301, 2006.

Anexo 1 (Dados dos testes sorológicos para PPV e do desempenho reprodutivo da G1 durante o estudo)

Animal	Categoria	CPC	CP	Sorologia Conteúdo Estomacal	Sorologia leitões	Mumificados	Natimortos	≤ 7
1	P0	640	1280	-	-	0	0	0
2	P0	1280	640	NT	-	2	1	0
3	P0	640	640	NT	-	0	0	0
4	P0	5120	2560	+	-	0	1	0
5	P0	320	160	NT	-	0	0	0
6	P0	640	5120	NT	-	0	0	0
7	P0	20	320	+	-	0	2	0
8	P0	20	2560	NT	-	0	0	0
9	P1	5120	2560	-	-	0	0	0
10	P1	5120	2560	NT	+	0	0	0
11	P1	1280	640	NT	-	0	1	0
12	P1	5120	1280	NT	-	0	0	0
13	P1	2560	2560	-	-	0	2	0
14	P1	640	5120	NT	-	0	0	0
15	P1	5120	640	NT	-	0	0	1
16	P1	5120	2560	NT	-	1	0	0
17	P2	5120	5120	-	-	0	1	0
18	P2	2560	1280	NT	-	0	0	1
19	P2	1280	320	NT	-	0	0	0
20	P2	5120	640	-	-	0	1	1
21	P2	5120	1280	NT	-	0	0	0
22	P2	5120	2560	+	-	0	1	0
23	P2	1280	320	NT	-	0	0	1
24	P2	320	1280	+	-	0	2	0
25	P3	5120	640	NT	-	0	0	0
26	P3	640	160	NT	-	0	0	1
27	P3	5120	2560	-	-	1	1	0
28	P3	5120	640	NT	-	0	0	0
29	P3	1280	640	NT	-	0	1	0
30	P3	5120	5120	+	-	1	1	0

31	P3	5120	5120	NT	-	0	2	0
32	P3	5120	5120	+	-	0	1	0
33	P3	5120	2560	+	-	0	1	0

- = Ausência de anticorpos para PPV no conteúdo estomacal ou no soro de leitões viáveis

NT= não testado

+ = Presença de anticorpos para PPV no conteúdo estomacal ou no soro de leitões viáveis

Títulos de anticorpos menores que 40 são considerados negativos

Anexo 2 (Dados dos testes sorológicos, da detecção de DNA viral para PCV2 em soro de porcas e tecidos fetais e desempenho reprodutivo da G1 durante o estudo)

Animal	Categoria	Sorologia Porcas		Viremia		Sorologia Leitões	Tecidos fetais com DNA de PCV2	Mumificados	Natimortos	≤ 7
		CPC	CP	CPC	CP					
1	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
2	P0	5120	5120	-	-	-	+	2	1	0
3	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
4	P0	5120	5120	-	-	-	-	0	1	0
5	P0	5120	1280	-	-	-	NT	0	0	0
6	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
7	P0	5120	5120	-	-	-	+	0	2	0
8	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
9	P1	320	5120	-	-	-	NT	0	0	0
10	P1	80	80	-	-	-	NT	0	0	0
11	P1	80	5120	-	-	-	-	0	1	0
12	P1	1280	320	-	-	-	NT	0	0	0
13	P1	1280	1280	-	-	-	-	0	2	0
14	P1	320	320	-	-	-	NT	0	0	0
15	P1	1280	1280	-	-	-	NT	0	0	1
16	P1	320	5120	-	-	-	+	1	0	0
17	P2	320	20	-	-	-	-	0	1	0
18	P2	1280	5120	--	-	-	NT	0	0	1
19	P2	5120	1280	-	-	-	NT	0	0	0
20	P2	5120	5120	-	-	+	+	0	1	1
21	P2	5120	1280	-	-	-	NT	0	0	0
22	P2	5120	5120	-	-	+	-	0	1	0
23	P2	1280	5120	-	-	-	NT	0	0	1
24	P2	1280	320	-	-	-	+	0	2	0

25	P3	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
26	P3	1280	5120	-	-	-	+	0	0	1
27	P3	320	80	-	-	-	-	1	1	0
28	P3	1280	5120	-	-	-	NT	0	0	0
29	P3	5120	5120	-	-	-	-	0	1	0
30	P3	5120	5120	-	-	-	+	1	1	0
31	P3	5120	1280	-	-	-	-	0	2	0
32	P3	5120	5120	-	-	-	-	0	1	0
33	P3	5120	5120	-	-	-	+	0	1	0

NT= não testado

- = Ausência de anticorpos no soro de leitões viáveis, de DNA de PCV2 em tecidos fetais e/ou no soro de porcas

+ = Presença de leitões soropositivos ao nascimento, de tecidos fetais positivos para PCV2 e/ou de porcas virêmicas

Títulos de anticorpos menores que 20 são considerados negativos

Anexo 3 (Dados dos testes sorológicos para PPV e do desempenho reprodutivo da G2 durante o estudo)

Animal	Categoria	CPC	CP	Sorologia Conteúdo estomacal	Sorologia leitões	Mumificados	Natimortos	≤ 7
1	P0	-	-	NT	-	0	0	0
2	P0	20	10	-	-	0	1	0
3	P0	-	-	NT	-	0	0	0
4	P0	20	-	-	-	5	3	0
5	P0	20	-	NT	-	0	0	0
6	P0	40	10	NT	-	2	1	0
7	P0	80	80	+	-	1	0	0
8	P0	80	80	-	-	0	3	0
9	P0	-	-	NT	-	0	0	0
10	P0	2560	2560	NT	-	1	0	0
11	P0	2560	80	NT	-	0	1	0
12	P0	2560	5120	+	-	1	2	0
13	P0	5120	2560	NT	-	0	5	0
14	P0	-	-	NT	-	3	0	0
15	P0	5120	5120	-	-	1	1	0
16	P0	5120	5120	NT	-	0	1	0
17	P1	5120	2560	NT	-	0	0	0
18	P1	5120	2560	+	-	0	2	0
19	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
20	P1	5120	5120	NT	-	0	0	1
21	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
22	P1	5120	2560	+	-	0	2	0

23	P1	5120	5120	-	-	2	3	0
24	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
25	P1	5120	5120	-	+	0	2	1
26	P1	5120	2560	NT	-	1	2	0
27	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
28	P1	5120	5120	NT	-	2	1	0
29	P1	5120	5120	NT	-	2	0	0
30	P1	2560	5120	NT	-	0	0	0
31	P1	5120	5120	-	-	1	1	1
32	P1	5120	5120	NT	-	0	1	0
33	P2	5120	2560	NT	-	0	1	0
34	P2	80	10	-	+	0	1	0
35	P2	80	20	NT	-	0	1	0
36	P2	20	10	NT	-	0	0	0
37	P2	160	40	NT	-	1	0	0
38	P2	640	320	NT	-	1	0	0
39	P2	320	80	NT	-	1	0	0
40	P2	5120	320	NT	-	0	1	0
41	P2	5120	5120	NT	-	0	1	0
42	P2	5120	5120	NT	-	1	1	0
43	P2	5120	5120	NT	-	1	0	0
44	P2	80	80	NT	-	0	0	0
45	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
46	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0

47	P3	320	40	NT	-	1	0	0
48	P3	5120	2560	NT	-	0	0	0
49	P3	5120	5120	NT	+	0	0	0
50	P3	5120	5120	NT	-	1	0	0
51	P3	5120	2560	NT	-	1	1	0
52	P3	5120	5120	NT	+	0	0	0
53	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
54	P3	5120	5120	NT	-	3	1	0
55	P3	5120	5120	-	+	1	3	0
56	P3	2560	5120	NT	-	0	0	0
57	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
58	P3	2560	2560	NT	-	0	0	0
59	P3	2560	2560	NT	-	0	0	0
60	P3	5120	5120	NT	-	1	0	0

- = Ausência de anticorpos para PPV no conteúdo estomacal ou no soro de leitões viáveis

NT= não testado

+ = Presença de anticorpos para PPV no conteúdo estomacal ou no soro de leitões viáveis

Títulos de anticorpos menores que 40 são considerados negativos

Anexo 4 (Dados dos testes sorológicos, da detecção de DNA viral para PCV2 em soro de porcas e tecidos fetais e desempenho reprodutivo da G2 durante o estudo)

Animal	Categoria	Sorologia porcas		Viremia PCV2		Sorologia leitões	Tecidos fetais com DNA de PCV2	Mumificados	Natimortos	≤ 7
		CPC	CP	CPC	CP					
1	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
2	P0	80	5120	-	-	+	-	0	1	0
3	P0	5120	5120	-	+	-	NT	0	0	0
4	P0	5120	5120	-	-	-	5+	5	3	0
5	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
6	P0	1280	5120	-	-	-	4+	2	1	0
7	P0	80	5120	-	-	-	-	1	0	0
8	P0	1280	1280	-	-	-	2+	0	3	0
9	P0	5120	1280	-	-	-	NT	0	0	0
10	P0	1280	5120	-	-	-	NT	1	0	0
11	P0	320	5120	-	-	-	-	0	1	0
12	P0	5120	5120	-	-	-	7+	1	2	0
13	P0	20	5120	-	-	-	-	0	5	0
14	P0	1280	5120	-	+	-	-	3	0	0
15	P0	320	5120	-	+	-	-	1	1	0
16	P0	5120	5120	-	-	-	-	0	1	0
17	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
18	P1	5120	5120	-	-	-	-	0	2	0
19	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
20	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	1
21	P1	5120	5120	+	-	+	NT	0	0	0
22	P1	5120	5120	+	-	+	-	0	2	0
23	P1	5120	5120	-	-	-	-	2	3	0
24	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
25	P1	5120	5120	-	-	-	+	0	2	1
26	P1	5120	5120	-	+	-	-	1	2	0
27	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
28	P1	5120	5120	+	-	-	2+	2	1	0
29	P1	80	5120	+	-	-	2+	2	0	0
30	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
31	P1	5120	5120	-	-	-	-	1	1	1

32	P1	20	5120	-	-	-	-	0	1	0
33	P2	5120	5120	+	-	-	NT	0	1	0
34	P2	5120	5120	-	-	-	+	0	1	0
35	P2	5120	5120	-	-	-	+	0	1	0
36	P2	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
37	P2	1280	5120	-	-	-	-	1	0	0
38	P2	5120	5120	+	-	+	+	1	0	0
39	P2	5120	5120	-	-	-	+	1	0	0
40	P2	5120	5120	-	-	-	+	0	1	0
41	P2	5120	5120	-	-	-	+	0	1	0
42	P2	5120	5120	-	-	-	+	1	1	0
43	P2	5120	5120	-	-	-	-	1	0	0
44	P2	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
45	P2	5120	5120	-	+	-	NT	0	0	0
46	P2	5120	5120	+	-	-	NT	0	0	0
47	P3	5120	5120	+	+	+	+	1	0	0
48	P3	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
49	P3	5120	5120	-	-	+	NT	0	0	0
50	P3	5120	5120	-	+	-	+	1	0	0
51	P3	5120	5120	-	-	-	-	1	1	0
52	P3	5120	5120	-	+	-	NT	0	0	0
53	P3	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
54	P3	5120	5120	-	-	-	4+	3	1	0
55	P3	5120	5120	-	-	-	3+	1	3	0
56	P3	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
57	P3	5120	5120	+	-	-	NT	0	0	0
58	P3	5120	5120	+	-	-	NT	0	0	0
59	P3	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
60	P3	5120	5120	-	-	-	-	1	0	0

NT= não testado

- = Ausência de anticorpos no soro de leitões viáveis, de DNA de PCV2 em tecidos fetais e/ou no soro de porcas

+ = Presença de leitões soropositivos ao nascimento, de tecidos fetais positivos para PCV2 e/ou de porcas virêmicas

Títulos de anticorpos menores que 20 são considerados negativos

Anexo 5 (Dados dos testes sorológicos para PPV e do desempenho reprodutivo da G3 durante o estudo)

Animal	Categoria	CPC	CP	Sorologia estomacal	Conteúdo Sorologia leitões	Mumificados	Natimortos	≤ 7
1	P0	5120	5120	-	-	0	1	0
2	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
3	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
4	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
5	P0	5120	5120	NT	-	0	0	1
6	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
7	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
8	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
9	P0	5120	5120	NT	+	1	0	0
10	P0	5120	5120	NT	-	0	0	0
11	P0	5120	2560	NT	-	0	0	0
12	P0	5120	5120	NT	-	0	0	1
13	P0	5120	5120	NT	-	5	0	0
14	P1	5120	1280	-	-	0	1	0
15	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
16	P1	5120	5120	NT	-	0	2	0
17	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
18	P1	5120	2560	NT	-	0	0	0
19	P1	5120	5120	NT	-	0	1	0
20	P1	5120	5120	NT	-	0	1	0
21	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
22	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
23	P1	5120	5120	NT	-	0	0	0
24	P1	5120	5120	NT	-	0	0	1
25	P1	1280	1280	NT	-	0	0	0
26	P1	5120	5120	NT	+	0	0	0
27	P2	5120	5120	NT	-	1	1	0
28	P2	5120	5120	NT	-	0	2	0
29	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
30	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
31	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
32	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
33	P2	5120	5120	NT	+	0	0	0

34	P2	1280	1280	NT	-	0	0	0
35	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
36	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
37	P2	5120	5120	NT	-	2	0	0
38	P2	5120	5120	NT	-	0	0	0
39	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
40	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
41	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
42	P3	5120	5120	NT	-	2	2	0
43	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
44	P3	5120	5120	NT	-	3	1	0
45	P3	5120	5120	NT	-	1	0	0
46	P3	5120	5120	NT	-	0	0	0
47	P3	1280	1280	NT	-	0	0	0
48	P3	5120	5120	NT	-	1	0	0
49	P3	5120	5120	-	-	0	1	0
50	P3	2560	5120	NT	-	0	0	0

- = Ausência de anticorpos para PPV no conteúdo estomacal ou no soro de leitões viáveis

NT= não testado

+ = Presença de anticorpos para PPV no conteúdo estomacal ou no soro de leitões viáveis

Títulos de anticorpos menores que 40 são considerados negativos

Anexo 6 (Dados dos testes sorológicos, da detecção de DNA viral para PCV2 em soro de porcas e tecidos fetais e desempenho reprodutivo da G3 durante o estudo)

Animal	Categoria	Sorologia porcas		Viremia PCV2		Sorologia leitões	Tecidos fetais com DNA PCV2	Mumificados	Natimortos	≤ 7
		CPC	CP	CPC	CP					
1	P0	1280	1280	-	-	NT	-	0	1	0
2	P0	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
3	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
4	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
5	P0	1280	320	-	-	-	NT	0	0	1
6	P0	1280	320	-	-	-	NT	0	0	0
7	P0	5120	1280	-	-	-	NT	0	0	0
8	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
9	P0	5120	1280	-	-	-	-	1	0	0
10	P0	1280	1280	-	-	-	NT	0	0	0
11	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
12	P0	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	1
13	P0	5120	5120	-	-	-	-	5	0	0
14	P1	5120	5120	-	-	-	-	0	1	0
15	P1	1280	320	-	-	NT	NT	0	0	0
16	P1	5120	5120	-	-	NT	NT	0	2	0
17	P1	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
18	P1	320	320	-	-	NT	NT	0	0	0
19	P1	5120	1280	-	-	NT	NT	0	1	0
20	P1	5120	1280	-	-	NT	NT	0	1	0
21	P1	5120	5120	-	-	NT	NT	0	0	0
22	P1	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
23	P1	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
24	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	1
25	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
26	P1	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
27	P2	5120	1280	-	-	NT	NT	1	1	0
28	P2	1280	5120	-	-	NT	NT	0	2	0
29	P2	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
30	P2	5120	5120	-	-	NT	NT	0	0	0
31	P2	5120	5120	-	-	NT	NT	0	0	0

32	P2	320	320	-	-	-	NT	0	0	0
33	P2	5120	1280	-	-	-	NT	0	0	0
34	P2	1280	320	+	-	-	NT	0	0	0
35	P2	1280	1280	-	-	-	NT	0	0	0
36	P2	5120	5120	-	-	-	NT	0	0	0
37	P2	5120	5120	-	-	-	-	2	0	0
38	P2	5120	5120	-	-	NT	NT	0	0	0
39	P3	1280	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
40	P3	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
41	P3	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
42	P3	5120	5120	-	-	NT	NT	2	2	0
43	P3	1280	5120	-	-	NT	NT	0	0	0
44	P3	5120	1280	-	-	NT	NT	3	1	0
45	P3	320	1280	-	-	NT	NT	1	0	0
46	P3	320	320	-	-	NT	NT	0	0	0
47	P3	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0
48	P3	5120	5120	-	-	NT	NT	1	0	0
49	P3	1280	5120	-	-	-	-	0	1	0
50	P3	5120	1280	-	-	NT	NT	0	0	0

NT= não testado

- = Ausência de anticorpos no soro de leitões viáveis, de DNA de PCV2 em tecidos fetais e/ou no soro de porcas

+ = Presença de leitões soropositivos ao nascimento, de tecidos fetais positivos para PCV2 e/ou de porcas virêmicas

Títulos de anticorpos menores que 20 são considerados negativos

Anexo 7 (Manejo reprodutivo das granjas estudadas)

Categoria	Intervalo entre inseminações após detecção do estro		
	G1	G2	G3
Marrãs	12hs/ 24hs/ 36hs	12hs/ 24hs/ 36hs	0hs/ 12hs/ 24hs
IDC* 0- 6 dias	12hs/ 24hs/ 36hs	24hs/ 36hs	12hs/ 24hs/ 36hs
IDC* $\geq$ 7 dias	0hs*/ 24hs/ 36hs	12hs/ 24hs/ 36hs	0hs/ 12hs/ 24hs

*Intervalo entre desmame e estro em dias