

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CONSELHO DE PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE VETERINÁRIA

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS INIBI-
DORES DA HEMOAGLUTINAÇÃO PARA O PARVOVÍRUS SÚINO NO ESTADO
DE MINAS GERAIS

Aurora Maria Guimarães Gouveia

Belo Horizonte
Minas Gerais
1982

Aurora Maria Guimarães Gouveia

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS INIBI-
DORES DA HEMOAGLUTINAÇÃO PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO NO ESTADO
DE MINAS GERAIS

Tese apresentada à Escola de Veteri-
nária da Universidade Federal de Mi-
nas Gerais, como requisito parcial pa-
ra obtenção do grau de Mestre em Me-
dicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventi-
va

Belo Horizonte
Minas Gerais
1982

G719a
1982

Gouveia, Aurora Maria Guimarães
Alterações reprodutivas e prevalência
de anticorpos inibidores da hemoaglu-
tinação para o Parvovírus Suíno no Estado
de Minas Gerais.- Belo Horizonte: Escola
de Veterinária da UFMG, 1982.
58p.: il.

Bibliografia

Tese(mestrado) UFMG. EV.

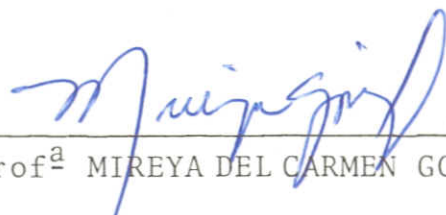
1. Parvovírus: Suínos. 2- Doenças:
Suínos. 3. Parvoviridae. I. Título

CDU: 636:4:616.988

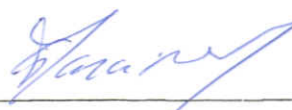
APROVADA EM: 23/04/1982



Prof. RONALDO REIS
- Orientador -



Prof^a MIREYA DEL CARMEN GOMES LILLO



Prof. ERNANE FAGUNDES DO NASCIMENTO

Aos meus pais, Gouveia e Maria Anita
e ao meu irmão Fernando,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Pelo apoio, estímulo e colaboração prestados, o autor registra os seguintes nomes:

RONALDO REIS	Professor Adjunto da Escola de Veterinária da UFMG, Orientador;
MIREYA DEL CARMEN G. LILLO	Professora Assistente da Escola de Veterinária da UFMG;
RÔMULO CERQUEIRA LEITE	Professor Assistente da Escola de Veterinária da UFMG;
IVAN BARBOSA M. SAMPAIO	Professor Assistente da Escola de Veterinária da UFMG;
SÔNIA A. MONTENEGRO HERÉDIA	College of Veterinary Medicine University of Illinois;
DORACY DE FÁTIMA REIS	Bióloga. Laboratorista da Escola de Veterinária da UFMG

e a todos aqueles que indiretamente possibilitaram a realização deste trabalho, meus agradecimentos sinceros.

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e da Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva (FEP-MVP).

RESUMO

Nos 608 soros de suínos testados pelo método de inibição da hemoaglutinação (HI) em microtítulo, 336 (55,3%) apresentaram títulos de anticorpos para o parvovírus suíno (PVS) superior a 80, demonstrando a ampla disseminação do vírus na população suína do Estado de Minas Gerais.

O perfil sorológico dos animais testados demonstrou acentuada heterogeneidade de níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS indicando infecção em evolução.

Dos 129 suínos machos examinados, 51 (39,5%) foram sorologicamente negativos para o PVS no teste de HI e, conseqüentemente, suscetíveis à infecção.

78,1% dos animais que apresentaram alterações reprodutivas (mumificação fetal, retorno ao estro, leitegadas pequenas em número), foram sorologicamente positivas para o PVS, sendo que as alterações foram mais freqüentes no primeiro e segundo partos.

De acordo com a distribuição de títulos sorológicos por faixa etária, verificou-se que somente 27,2% dos animais com idade compreendida entre 151 e 300 dias apresentaram altos níveis de anticorpos para o PVS, indicando

que uma população significativa de leitões e varrões jovens é suscetível à infecção na época do primeiro serviço.

Após três passagens sucessivas da amostra NADL-2 do PVS em cultivos celulares distintos, verificou-se que a amostra replicou-se satisfatoriamente na linhagem celular PK₁₅ com títulos hemoaglutinantes semelhantes aos obtidos em cultivos primários de rim de feto suíno.

A evidenciação do antígeno viral, através da prova de imunofluorescência direta confirmou a presença do PVS nos fetos suínos mumificados ou natimortos examinados.

SUMÁRIO

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	48
7. ANEXOS	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de falhas reprodutivas em rebanhos suínos comerciais é freqüente e suas causas podem ser dentre outras, de natureza infecciosa, nutricional, genética, tóxica ou de manejo (RASBECH, 1969). Entretanto, com o crescente desenvolvimento da suinocultura industrial, os fatores não infecciosos têm sido menos freqüentes, observando-se um papel cada vez mais relevante dos agentes infecciosos na ocorrência de alterações reprodutivas tais como abortos, natimortalidade, mumificação fetal, retorno ao serviço e morte embrionária.

KIRKBRIDE & McADARAGH (1978), ao examinarem 824 casos de abortos, natimortos e mortalidade neonatal em suínos, comprovaram infecção bacteriana e fúngica em 16,8% e infecção viral em 22% dos 38,8% casos diagnosticados. Dentre os vírus incriminados como causadores de falhas reprodutivas em suínos, podemos citar os da peste suína clássica (DUNNE & CLARK, 1968), encefalite japonesa (MA et alii, 1976), rinotraqueíte infecciosa bovina (SAXEGAARD & ONSTAD, 1967), enterovírus (DUNNE et alii, 1965), reovírus (McADARAGH & ROB, 1976), pseudorraiva (MARÉ et alii, 1976) e outros de menor freqüência.

A partir dos primeiros isolamentos feitos em suí-

nos abortados ou natimortos na Inglaterra (CARTWRIGHT & HUCK, 1967), inúmeros trabalhos têm sido dedicados ao estudo da patogenicidade do parvovírus (PVS) na incidência dos problemas reprodutivos dos suínos.

Numerosos levantamentos sorológicos, baseados no teste de inibição da hemoaglutinação (HI), demonstram a larga difusão do PVS no mundo. Porcentagens elevadas de soros suínos originários de abatedouros, de rebanhos com problemas reprodutivos e de rebanhos aparentemente normais possuem anticorpos para o PVS (VANNIER et alii, 1976).

O PVS foi isolado em diversos países e na maior parte das vezes, a partir de levantamentos realizados em áreas de alta prevalência de problemas reprodutivos, sendo freqüentemente associado à ocorrência de mumificação fetal, mortalidade embrionária ou neonatal e conseqüentemente, retornos ao estro e leitegadas pequenas em número, o que torna economicamente inviável a manutenção dos animais infectados.

Apresentando grande afinidade pelos tecidos em multiplicação ativa, o PVS não apresenta em condições naturais ou artificiais qualquer poder patogênico para suínos adultos, manifestando tropismo particular pelo embrião ou feto, o que é evidenciado clinicamente pelas alterações causadas a estes após a infecção materna.

Sabe-se que uma vez introduzido em plantéis negativos o PVS dissemina-se rapidamente envolvendo 100% dos suínos em poucos meses. A difusão do vírus é facilitada pela existência dentro da população suína de uma grande heterogeneidade de níveis de anticorpos circulantes (VANNIER et alii, 1976). O conhecimento das taxas de anticorpos e as análises individuais e de rebanho permitem conhecimento da disseminação e do poder patogênico do PVS no plantel e conseqüentemente, a adoção de medidas de controle mais adequadas à cada caso.

O teste de HI padronizado por JOO et alii (1976),

constitui-se no teste de escolha para evidenciar anticorpos anti-PVS apresentando resultados similares ao teste de soro-neutralização.

O PVS descrito em todos os continentes exceto na América Latina é hoje considerado o "agente-chave dos problemas reprodutivos dos suínos" (VANNIER & TILLON, 1979). A ocorrência relativamente freqüente de falhas reprodutivas sem causa definida, motivou a realização do presente trabalho, que objetiva os seguintes aspectos:

- a) determinar a prevalência de anticorpos para o PVS em soro de suínos no Estado de Minas Gerais;
- b) determinar a possível associação entre título de anticorpos anti-PVS e a ocorrência de problemas reprodutivos em fêmeas segundo a idade;
- c) propor estratégias de prevenção para o PVS dentro das condições de manejo em nosso meio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Patogenicidade

CARTWRIGHT & HUCK (1967) trabalhando com vísceras de fetos abortados e leitões natimortos, muco vaginal e sêmen, fizeram 111 isolamentos dos quais 87% foram de um mesmo protótipo de vírus denominado 59e/63 que se caracterizava por apresentar genoma identificado como DNA, inclusões intranucleares em cultivos primários de rim suíno e atividade hemoaglutinante frente a eritrócitos humanos tipo "0", de cobaio e de macaco rhesus.

CARTWRIGHT et alii (1969), estudando as propriedades físico-químicas da amostra 59e/63 previamente isolada, encontraram dados suficientes para classificá-la como membro do Grupo Parvovírus. Repetidos isolamentos do vírus em fetos abortados e leitões natimortos, muco vaginal e sêmen, sugeriram sua participação na ocorrência de problemas reprodutivos e sua provável transmissão venérea.

JOHNSON & COLLINGS (1969) administraram o PVS por diversas vias a primíparas e leitões sorologicamente negativos, observando viremia do 1º ao 5º dias pós - infecção com altos níveis de anticorpos evidenciáveis a partir do 6º dia. As porcas inoculadas na segunda metade da gestação produziram leitões clinicamente normais com altos níveis de

anticorpos ativos pré-colostrais.

CARTWRIGHT et alii (1971) administraram a amostra 59e/63 do PVS pelas vias oral, nasal, intracerebral ou endovenosa a porcas de diversos estágios de gestação ou no momento da inseminação, observando aumento sensível nos níveis de anticorpos circulantes sete dias após a infecção. O isolamento do vírus dos fetos retirados por histerectomia e a presença de anticorpos evidenciáveis nos leitões, sugeriu a transmissão do vírus por via transplacentária. As primíparas infectadas no momento da inseminação produziram leitegadas reduzidas e com fetos mumificados.

JOHNSON & COLLINGS (1971) administraram o PVS por via oral a porcas sorologicamente negativas em diversos estágios de gestação, encontrando anticorpos inibidores da hemoaglutinação e soroneutralizantes precolostrais nos leitões provenientes de porcas infectadas entre 58 e 80 dias de gestação.

BOURNE et alii (1974) demonstraram através da administração do PVS por via oral a porcas gestantes soronegativas, que os fetos "in utero" são capazes de desenvolver resposta imunitária após estímulo antigênico a partir do 58º dia de gestação.

LUCAS et alii (1974) inseminaram artificialmente porcas livres de anticorpos contra o PVS com uma suspensão de sêmen e PVS, as quais foram sacrificadas 30 dias depois. De seis porcas inoculadas, uma mostrou sinais de perda embrionária com retorno ao estro, duas retornaram ao cio 22-25 dias após a inseminação artificial e três estabeleceram a gestação tendo sido isolado o vírus em grande parte de seus fetos e no muco vaginal. Um varrão foi inoculado via saco prepucial e cinco dias mais tarde o vírus pode ser isolado no pênis, prepúcio e testículo.

REDMAN et alii (1974) injetaram o PVS por via intramuscular em fetos de porcas submetidas à laparotomia no 101º dia de gestação, as quais originaram leitegadas nor-

mais. Porcas inoculadas no 62º dia de gestação apresentaram fetos mumificados e 14,6% dos leitões nascidos vivos foram sorologicamente positivos para o PVS antes de receberem o colostro, indicando infecção transplacentária.

BACHMANN et alii (1975) inocularam o PVS por via intrauterina em porcas SPF em diversos estágios de gestação, infectando um dos cornos uterinos e mantendo o outro como controle. Nenhuma das porcas apresentou sinais clínicos desenvolvendo porém, anticorpos inibidores da hemoaglutinação sete dias após a infecção. Os fetos inoculados até o 55º dia de gestação apresentaram morte e subsequente mumificação; infecção nos estágios mais tardios (entre 72º e 105º dias) não resultou em morte fetal observando-se rápida produção de anticorpos. Os leitões dos cornos uterinos não infectados apresentaram anticorpos evidenciáveis, mas sem qualquer alteração clínica.

CUTLIP & MENGELING (1975a) administram o PVS por via nasal e endovenosa a leitões neonatos os quais foram sacrificados sete dias depois. Apesar da grande quantidade de antígeno encontrada em diversos tecidos não foi observada doença clínica, o que poderia ser atribuído a um insuficiente dano das células para alterar clinicamente as funções vitais.

CUTLIP & MENGELING (1975b) inocularam o PVS por via intrauterina no líquido alantóide de fetos de porcas no 56º e 70º dias de gestação, mantendo alguns fetos inoculados. Quatorze dias após os animais foram sacrificados, observando-se mortalidade fetal naqueles inoculados aos 56 dias. A difusão intrauterina do PVS entre fetos inoculados e controles não ocorreu, indicando um isolamento individual dos fetos que poderia ser atribuído aos anticorpos maternos na membrana corioalantóide ou a um período muito curto entre a infecção e o sacrifício. Entretanto, este isolamento parece ser relativo já que outros estudos têm indicado a ocorrência da difusão do vírus em porcas imunes após a inoculação transuterina dos fetos.

MENGELING (1975) usando como parâmetro a presença de altos títulos de anticorpos anti-PVS em soros pré-colostrais de leitões histerectomizados e a presença do vírus em cultivos renais destes animais, demonstrou que a ocorrência de infecção transplacentária é relativamente baixa (3,6%).

MENGELING & CUTLIP (1975) inocularam o PVS no líquido alantóide de fetos com 34-36 dias de idade resultando em morte fetal seguida de maceração e mumificação. A grande quantidade de antígeno demonstrada em diversos tecidos uma semana após a inoculação indicou a intensa replicação vírica.

MENGELING et alii (1975) estudando um surto de mumificação fetal demonstraram a presença do PVS nestes fetos e soroconversão das porcas durante a gestação.

RODEFFER et alii (1975) observaram a soroconversão de porcas livres de anticorpos para o PVS coincidindo com a ocorrência de alterações reprodutivas após o acasalamento com machos sorologicamente positivos, indicando transmissão do vírus por via venérea ou por contato direto com varrões possivelmente portadores.

BACHMANN (1976) inoculou o PVS por via endovenosa em fetos de porcas em diferentes estágios de gestação os quais foram sacrificados 28 dias depois. Fetos infectados entre o 35º e 55º dias de gestação morreram semanas após, havendo sido isolado o vírus em todos eles. Aqueles inoculados mais tardiamente (78º ao 105º dias) desenvolveram-se normalmente, apresentando altos níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação.

CROPPER et alii (1976) examinando líquido corporal de fetos provenientes de leitegadas pequenas (1-4 leitões) e grandes (9 ou mais) detectaram anticorpos para o PVS em 30% das leitegadas pequenas que apresentaram fetos mumificados e em 11% de leitegadas pequenas sem fetos mumificados; em leitegadas grandes somente 2% apresentaram

anticorpos para o PVS.

JOHNSON et alii (1976) observando plantéis de suínos com alterações reprodutivas traçaram um perfil epidemiológico da infecção pela PVS nestes plantéis demonstrando que a susceptibilidade ao vírus é absoluta na minoria composta por plantéis negativos ou confinada a leitões e varrões jovens em plantéis cronicamente infectados.

MENGELING & CUTLIP (1976) verificaram que o momento de exposição das porcas ao PVS é fator importante na determinação das eventuais alterações de seus fetos; administrando o PVS por distintas vias a porcas primíparas sorologicamente negativas entre o 22º e 81º dias de gestação observaram que a infecção precoce resultou em morte fetal seguida de mumificação, enquanto que infecções mais tardias (67 dias ou mais) foram aparentemente toleradas pelos fetos.

VANNIER et alii (1976) observaram que a difusão do PVS de um feto infectado a outro não infectado é lenta e que a maioria dos fetos de um mesmo corno não é atingida a não ser que a infecção ocorra na metade do período gestacional.

HOGG et alii (1977) inocularam o PVS por via intrauterina a porcas sorologicamente negativas com 70 dias de gestação resultando em aborto em uma delas 12 dias após a infecção além da soroconversão das porcas, aparecimento de anticorpos inibidores da hemoaglutinação nos fetos e alterações histológicas generalizadas.

LENGHAUS et alii (1978) inocularam o PVS por via transuterina em fetos de porcas primíparas soronegativas aos 35, 50 e 60 dias de gestação, mantendo alguns fetos sem inocular. As porcas, sacrificadas 11 dias depois mantiveram-se clinicamente normais sendo o vírus isolado nos fetos inoculados e não inoculados, indicando a difusão do vírus e sua patogenicidade somente para os fetos.

RUCKERBAUER et alii (1978) encontraram em uma

unidade de inseminação artificial 50% dos varrões sorologicamente positivos para o PVS não sabendo entretanto, até que ponto estes animais poderiam conter o vírus no sêmen e por este meio infectar porcas suscetíveis.

OGASA et alii (1979) inocularam o PVS por via intratesticular em varrões de cinco meses de idade não observando qualquer alteração clínica ou patológica apreciável.

STÉPANEK et alii (1979) isolaram o PVS de 49 das 166 leitegadas estudadas, a partir de fetos mumificados e natimortos. O vírus isolado multiplicou-se bem em cultivos secundários de rim de suíno mas não replicou-se em células PK-15.

VANNIER & TILLON (1979) pesquisando o PVS em fetos mumificados, abortados e natimortos pelo método de hemaglutinação (HA) demonstraram que a proporção de fetos mumificados infectados com o PVS (43,9%) foi maior que nos fetos natimortos ou abortados (30,4%).

WRATHALL & MENGELING (1979) inseminaram artificialmente porcas primíparas sorologicamente negativas com uma mistura de sêmen e PVS as quais foram sacrificadas 10-20 dias depois. O antígeno não pode ser demonstrado nestes animais porém o sacrifício muito precoce pode ter interferido nos resultados.

BROWN et alii (1980) inocularam o PVS por via oral e nasal em suínos de seis semanas de idade não observando qualquer alteração clínica; viremia ocorreu entre o 1º e 5º dias após a infecção e anticorpos inibidores da hemaglutinação foram evidenciáveis seis dias pós-inoculação.

PAUL & MENGELING (1980) pesquisando os títulos de anticorpos HI para o PVS em leitões provenientes de porcas imunes, desmamados às quatro semanas de idade, verificaram que os anticorpos passivos decresceram regularmente até as 26 semanas quando todos os leitões eram soronegativos.

PAUL et alii (1980) desafiaram com PVS suínos vacinados, passivamente imunes e não imunes às 10 semanas de idade, observando viremia e excreção do vírus em todos os animais, sugerindo que são necessários altos níveis de anticorpos humorais para proteção contra infecção por PVS.

PARKER et alii (1981) descrevem a introdução acidental do PVS em um grupo de suínos controlados nos quais estava sendo usada a inseminação artificial e monta natural. Porcas em estágios avançados de gestação produziram leitegadas normais sorologicamente positivas, enquanto que aquelas que se encontravam na primeira metade da gestação originaram leitegadas com fetos mumificados.

2.2. Prevalência

JOHNSON & COLLINGS (1969) demonstraram uma prevalência de anticorpos anti-PVS inibidores da hemoaglutinação e soroneutralizantes variando entre 50 e 90% em suínos de diferentes faixas etárias, pertencentes a 17 granjas da Austrália que não apresentavam problemas reprodutivos postulando que a presença do PVS somente se constituiria em problema quando a infecção de porcas sorologicamente negativas ocorresse no momento da cobertura ou durante estágios precoces de gestação.

BACHMANN (1969, 1970) pesquisando anticorpos anti-PVS pelo método de inibição da hemoaglutinação (HI) encontrou 92,5% de suínos positivos às três semanas de idade, 78,3% às oito semanas, 54% em suínos de abatedouro e 0% em suínos gnotobióticos. A infecção não produziu qualquer alteração clínica nestes animais ocorrendo entretanto, infecção por contato entre animais sorologicamente positivos e negativos.

HARKNESS et alii (1971), pesquisando anticorpos anti-PVS pelo método de HI em soros colhidos em abatedouros da Grã-Bretanha encontraram 35% dos soros com títulos

superiores a 1:1024 sendo a proporção de soros positivos maior nos animais mais velhos.

COACKLEY & SMITH (1972) encontraram altos títulos de anticorpos anti-PVS em soros de suínos na Austrália, havendo sido o vírus isolado posteriormente em leitões provenientes de propriedades com problemas de mortalidade neonatal.

MENGELING (1972) encontrou nos Estados Unidos alta incidência de suínos infectados com PVS, onde 40,7% dos 423 soros examinados apresentavam títulos significativos de anticorpos anti-PVS.

JOHNSON (1973) testou 250 soros na Austrália pelos métodos de HI e soroneutralização (SN) dos quais 52% apresentaram títulos de anticorpos para o PVS superiores a 1:20.000.

HORNER & BUDDLE (1974) examinando 28 soros de porcas com problemas reprodutivos na Nova Zelândia encontraram 26 soros com títulos superiores a 1:640. Entretanto, o tamanho da amostra foi muito reduzido sendo pois, pouco conclusivo.

REDMAN et alii (1974) testaram soros de suínos provenientes de granjas e abatedouros dos Estados Unidos encontrando 77 e 82% respectivamente, de soros com títulos significativos de anticorpos inibidores da hemoaglutinação, sugerindo que a infecção com PVS é comum na população suína.

PINI (1975) trabalhando com soros de suínos obtidos em plantéis que apresentavam falhas reprodutivas caracterizadas por infertilidade, natimortalidade, mumificação fetal e mortalidade embrionária, encontrou 84% de soros positivos na África do Sul e 39% na Rodésia, indicando que a alta incidência de anticorpos anti-PVS poderia estar relacionada com a ocorrência das alterações reprodutivas.

VANNIER et alii (1976) em levantamento sorológico realizado na França baseado no teste de HI, encontra-

ram 43% de suínos com títulos superiores a 1:320.

GILLICK (1977) durante um surto de mumificação fetal em rebanhos suínos da Austrália, isolou o PVS e encontrou títulos significativos de anticorpos em 97% das porcas.

ZUPANCIC (1977) examinando 741 soros de suínos na Iogoslávia encontrou 42% com títulos superiores a 1:32.

KIRKBRIDE & McADARAGH (1978) examinando 824 casos de abortos, mumificação fetal e natimortalidade em suínos, comprovaram infecção viral em 22% dos casos diagnosticados, dos quais o PVS estava presente em 4,9%.

MENGELING (1978) trabalhando a nível de abatedouro, examinou 203 úteros com mais de 60 dias de gestação encontrando embriões ou fetos mortos em 62 úteros. O PVS foi identificado como causa da mortalidade dos membros de 46 úteros, baseado na demonstração do antígeno e isolamento do vírus. A causa da morte dos membros dos 16 úteros restantes não foi determinada.

TIMBOL (1980) encontrou 56% de suínos com níveis significativos de anticorpos anti-PVS provenientes de plantéis com problemas reprodutivos, indicando alta prevalência da infecção na população suína das Filipinas.

2.3. Provas sorológicas

MENGELING (1972) pesquisando anticorpos anti-PVS usou as provas de soroneutralização (SN) e inibição da hemaglutinação (HI) obtendo títulos semelhantes com ambas as provas.

JOO et alii (1976) compararam os métodos de SN e HI testando soros previamente tratados com caolim e eritrócitos de cobaio para eliminar respectivamente inibidores inespecíficos da aglutinação e autohemaglutininas, não observando diferença significativa entre os dois métodos. Utilizando glóbulos vermelhos de diversas espécies animais

os melhores títulos foram obtidos com eritrócitos de cobaias.

2.4. Diagnóstico

CARTWRIGHT et alii (1971) testando tecidos de leitões de um dia de idade, infectados com o PVS demonstraram que o isolamento do vírus ou a imunofluorescência direta de cortes por congelação de tecidos são métodos úteis para a demonstração da infecção.

MENGELING et alii (1975) trabalhando com fetos mumificados demonstraram que tanto o isolamento do vírus como a demonstração do antígeno por imunofluorescência direta de cortes criostáticos de tecidos de fetos mumificados confirmam a infecção pelo PVS ainda que o segundo método permita melhor conhecimento da extensão da infecção e seja mais simples como método de diagnóstico de rotina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Inquérito de opinião

Após a prévia notificação do proprietário, foi aplicado um inquérito que buscou as seguintes informações:

- . local e identificação da granja;
- . população animal;
- . ocorrência de alterações reprodutivas em porcas (tamanho da leitegada, mumificação fetal, natimortos e repetição de cio);
- . manejo sanitário dos animais.

Em anexo, os modelos do questionário e ficha da vida reprodutiva das fêmeas (Anexos I e II).

3.2. Animais

Suínos provenientes de plantéis do Estado de Minas Gerais regularmente vacinados contra peste suína clássica, erisipelose e leptospirose foram divididos em seis grupos (A, B, C, D, E e F), representando granjas diferentes, exceto o F que compreendeu animais de várias propriedades agrupados para efeito descritivo.

Para o levantamento sorológico, foram testados 608 suínos, independentemente de raça, sexo ou idade.

Para o estudo clínico-sorológico foram testados 342 animais compreendendo 50 leitões (1 a 150 dias de idade) de ambos os sexos, 163 matrizes e 129 varrões.

3.3. Soros

Um total de 608 soros foi examinado. Os soros foram inativados pelo calor (56°C por 30 minutos) e adsorvidos à temperatura ambiente por 30 minutos com uma suspensão de eritrócitos de cobaio a 50% em solução salina fosfatada 0,15 M (PBS) pH 7,2 e uma suspensão de caolim a 25% em solução salina borato (pH 9,0) nas proporções de 1:1:0,5 respectivamente, para remoção de autohemoaglutininas e inibidores inespecíficos da aglutinação. Os adsorventes foram removidos por centrifugação a 1000 g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram estocados em congeladora -80°C até o momento do exame. Os soros originais foram considerados como tendo sido diluídos 1:2,5 durante o tratamento.

3.4. Cultivos celulares

3.4.1. Meios de cultivo

Para crescimento das células foram utilizados TC meio 199* (cultivos primários) ou MEM-Eagle** (linha celular) suplementados com 10% de soro bovino inativado e antibióticos (200 UI de penicilina G potássica***, 200 ug do sulfato de estreptomicina e 5 ug de anfotericina-B**** por ml). O meio de manutenção utilizado foi idêntico ao de crescimento exceto por não conter soro bovino.

* DIFCO Laboratories, Detroit 1, Michigan (USA)

** GIBCO Laboratories, Grand Island, New York (USA)

*** FONTOURA-WYETH, São Bernardo do Campo, São Paulo (Brasil)

**** SQUIBB Ind. Quím. S/A, Santo Amaro, São Paulo (Brasil)

3.4.2. Células

3.4.2.1. Cultivos primários

Cultivos primários de rins de suíno (RP) foram obtidos a partir de fetos provenientes de porcas de abate-douro com período médio de 100 dias de gestação. Os rins colhidos assepticamente foram deixados em meio de manutenção por 15 horas a 4°C. A cápsula fibrosa foi retirada e a córtex renal foi fragmentada e mantida a 37°C em solução de tripsina a 0,25%* por duas horas. A suspensão de células assim obtida foi centrifugada a 85 g por 15 minutos a 4°C. A suspensão celular foi ajustada para uma concentração de 5×10^6 células/ml de meio de crescimento e distribuída em garrafas de Roux (100 ml/garrafa). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C por 72 horas para obtenção de 75% de confluência celular sendo que uma das garrafas foi novamente tripsinizada e testada pelo método de hemoaglutinação (HA) para verificar a possível presença do PVS.

3.4.2.2. Linha celular

Foi utilizada linha celular contínua de rim de suíno (PK₁₅) cedida pelo Laboratório Nacional de Referência Animal - Pedro Leopoldo, MG. Os monoextratos celulares foram lavados com solução salina fosfatada (PBS) pH 7,2 e incubados a 37°C com solução de tripsina a 0,25% por cinco minutos. A suspensão celular assim obtida foi centrifugada a 85 g por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento celular foi diluído na concentração de 3×10^5 células/ml de meio de crescimento e a suspensão celular foi distribuída em garrafas de Roux (100 ml/garrafa). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas para obtenção de 75% de confluência celular e uma das garrafas foi novamente tripsinizada e testada pelo método de HA para ve

* DIFCO Laboratories, Detroit 1, Michigan (USA)

rificar a possível presença do PVS.

3.4.3. Infecção das células

Para produção da semente de vírus as garrafas apresentando 75% de confluência celular foram lavadas com PBS e inoculadas com 5 ml da diluição 1:10 da amostra NADL-2 do PVS recebida da Universidade de Davis, California. Após um período de 60 minutos a 37°C foi adicionado meio de manutenção e as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C por quatro dias. Depois de três ciclos de congelação e descongelação e subsequente centrifugação a 3.000 g por 15 minutos, a suspensão viral foi titulada pelo método de HA e estocada a -80°C.

3.5. Vírus

A décima passagem da amostra NADL-2 do parvovírus suínos em cultivos de RP com título hemoaglutinante de 1:256 foi utilizada como antígeno para a prova sorológica.

3.6. Eritrócitos

Sangue de cobaias sadios foi colhido em solução de Alsever e guardado a 4°C por um período máximo de sete dias. No momento da prova, os eritrócitos foram lavados três vezes em PBS e diluídos para obter-se uma suspensão a 1%.

3.7. Diluente

Em todas as provas foi utilizado como diluente solução salina fosfatada 0,15 M (pH 7,2), suplementada com 0,4% de soroalbumina bovina*.

* SIGMA Chemical Company, St. Louis, Missouri (USA)

3.8. Prova sorológica

3.8.1. Hemoaglutinação (HA)

O título das hemoaglutininas virais foi determinado através da prova de HA em sistema de microtítulo. Foi utilizada a técnica descrita por JOO et alii (1976) que consiste basicamente na adição de 0,05 ml de eritrócitos de cobaio a 1% a igual volume de cada uma das diluições duplas de vírus, em microplacas com fundo em "V"*, utilizando-se microdiluidores** e micropipetas** de 0,05 ml de capacidade. Controles apropriados de vírus e de eritrócitos foram mantidos nas mesmas condições. Após um período médio de duas horas a 4°C, as placas foram examinadas sendo o título hemoaglutinante expresso como a recíproca da maior diluição de vírus que causou hemoaglutinação completa, a qual corresponde a 1 UHA.

3.8.2. Inibição da hemoaglutinação (HI)

A presença de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS foi determinada através da técnica de HI segundo técnica padronizada por JOO et alii (1976) adaptada para o sistema de microtítulo. Utilizando-se microdiluidores** de 0,025 ml de capacidade, os soros previamente tratados foram diluídos em microplacas com fundo em "V"*. A cada diluição foram adicionados 0,025 ml de vírus (contendo 4 UHA) sendo as placas mantidas a 4°C por 60 minutos. 0,05 ml de eritrócitos de cobaio a 1% foram adicionados a cada mistura soro-vírus. Controles apropriados de soros positivo e negativo, vírus e eritrócitos foram mantidos nas

* LIMBRO Chemical Co., Inc., New Haven, Connecticut (USA)

** DYNATECH Laboratories Inc., Alexandria, Virginia (USA)

mesmas condições. As placas foram examinadas após um período médio de duas horas a 4°C, sendo os títulos inibidores da hemoaglutinação expressos como a recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a aglutinação.

Foram considerados positivos os soros que apresentaram título de anticorpos inibidores da hemoaglutinação igual ou superior a 80.

3.9. Imunofluorescência direta

A presença do PVS foi determinada através da prova de imunofluorescência direta segundo técnica descrita por LUCAS & NAPHTHINE (1971).

3.9.1. Material examinado

Foram utilizados pulmões de fetos mumificados ou natimortos, processados em cortes por congelação com 3-4 micra de espessura, colocando-se dois cortes por lâmina.

3.9.2. Coloração das lâminas

3.9.2.1. Imunofluorescência direta

Os cortes de pulmão foram fixados em acetona a -15°C por 30 minutos e corados à temperatura ambiente (25°C) por 20 minutos com anticorpos fluorescentes cedidos pela Universidade da Califórnia, Davis. Após lavagem com PBS pH 7,2 e água destilada, as lamínulas foram montadas com glicerina tamponada pH 9,0 e examinadas.

3.9.2.2. Inibição da imunofluorescência

Os materiais que apresentaram fluorescência positiva foram fixados em acetona a -15°C por 30 minutos, incubados a 37°C por 30 minutos com soro hiperimune para o

PVS cedido pela Universidade da Califórnia, Davis, e corados como descrito anteriormente.

3.9.3. Microscópio

A leitura das preparações foi feita em microscópio binocular "Standard WL"*, objetiva de imersão 40x com diafragma, ocular 10x, condensador de campo escuro a óleo, iluminação com lâmpada de mercúrio HBO-200 Osram, utilizando-se filtro excitador UG-2 e filtros de barreira 0/41.

3.10. Procedimentos estatísticos

3.10.1. Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi estimado por amostragem aleatória simples, baseando-se nos seguintes pontos :

- a) intensidade de fenômeno considerado, isto é, infecção por PVS, que foi estimada com 40% baseando-se nos valores obtidos por outros autores (JOHNSON & COLLINGS, 1969; MENGELING, 1972; JOHNSON, 1973; JOHNSON et alii, 1976; VANNIER et alii, 1976);
- b) grau de precisão ou margem de erro admitida entre o valor verdadeiro e o valor estimado, igual a 10%;
- c) nível de significação igual a 95%.

Aplicando a fórmula recomendada pelo CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS (1979)

$$n = \frac{p(100 - p) \cdot z^2}{d}, \text{ onde:}$$

* CARL ZEISS, Companhia Ótica e Mecânica Oberkochen (Alemanha Ocidental)

n = número de amostras a serem testadas;

p = prevalência esperada

z = grau de confiança, igual a 1,96

d = margem de erro esperada, igual a 10%, temos:

$$n = \frac{40(100-40) \cdot (1,96)^2}{\left(\frac{40 \cdot 10}{100}\right)^2} = 576 = 600 \text{ soros}$$

3.10.2. Análise estatística

Os dados quantitativos foram comparados pelo teste "t" de Student (ZUWAYLIF, 1970). As tabelas de contingência foram analisadas pelo teste de χ^2 (SPIEGEL, 1971) para avaliação da dispersão de frequências absolutas (percentual de distribuição).

4. RESULTADOS

4.1. Levantamento sorológico

Nas 608 amostras testadas, 336 (55,3%) foram sorologicamente positivas para a amostra NADL-2 do PVS (TAB. I).

TABELA I - Prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS em suínos do Estado de Minas Gerais, 1981

Títulos*	Nº de soros	%
0 - 40	272	44,7
80 - 10.240**	336	55,3
TOTAL	608	100,0

* Recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a hemoaglutinação, frente a 4 UHA de vírus

** Foram considerados positivos os soros com título igual ou superior a 80

Analisando as propriedades estudadas individualmente verificou-se que a prevalência de animais positivos

em cada uma delas foi semelhante à geral, exceto nas granjas D onde houve maior percentual de soros positivos e na granja F onde este percentual foi ligeiramente inferior (TAB. II).

TABELA II - Prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS nas propriedades amostradas no Estado de Minas Gerais, 1981

Propriedades	Animais		
	Examinados	Positivos	%
A	126	78	61,9
B	165	88	53,3
C	79	44	55,7
D	48	39	81,3
E	91	49	53,8
F*	99	38	38,4
TOTAL	608	336	55,3

* Compreende soros de distintas propriedades que, por serem em número reduzido foram agrupados para efeito de apresentação

4.2. Estudo clínico-sorológico

Verificou-se dentro da população suína examinada, grande heterogeneidade de níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS. Dentro de uma mesma granja foram encontrados animais com títulos sorológicos muito variáveis dentro da faixa considerada, ou seja, títulos variando de 0 até ≥ 10.240 (TAB. III, FIG. 2).

TABELA III - Distribuição de freqüência dos títulos de anticorpos inibidores de hemoaglutinação para o PVS em soros de suínos no Estado de Minas Gerais, 1981

Granjas	Nº soros testados	Títulos*											
		0	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	>10240
A	126	23	8	10	7	17	13	18	9	3	6	3	9
B	165	12	24	23	18	22	20	16	11	5	3	4	7
C	79	7	7	7	16	8	4	10	7	6	2	5	2
D	48	0	3	2	4	13	6	5	3	0	4	5	3
E	91	2	17	8	15	3	16	11	1	7	6	0	5
F	99	29	11	14	7	6	11	8	4	3	3	1	2
TOTAL	608	71	70	64	67	69	70	68	35	24	24	18	28

* Expresso como a recíproca de maior diluição de soro que inibiu completamente a hemoaglutinação frente a 4 UHA de PVS

4.2.1. Ocorrência de alterações reprodutivas e título de anticorpos

Dos 64 animais que apresentaram alterações reprodutivas em partes anteriores à colheita da amostra, 50 (78,1%) foram sorologicamente positivos; por outro lado, 60 (60,6%) dos 99 animais sem alteração clínica aparente foram também soropositivos indicando respectivamente, resposta em anticorpos significativa ($p < 0,025$) após contato com o PVS ou um estado imunitário já estabelecido (TAB. IV).

TABELA IV - Ocorrência de alterações reprodutivas em porcas com distintos níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS no Estado de Minas Gerais, 1981

Títulos*	Animais					
	Examinados	%	Com alteração	%	Sem alteração	%
0 - 40	53	100,0	14	26,4	39	73,6
80 - 1024	110	100,0	50	45,5	60	54,5
TOTAL	163	100,0	64	39,2	99	60,8

* Recíproca da maior diluição de soro que inibiu 100% da hemoaglutinação frente a 4 UHA de vírus

A freqüência de alterações reprodutivas nas porcas examinadas foi semelhante nas diferentes propriedades sendo que as granjas C e E apresentaram os menores percentuais de alterações (TAB. V).

TABELA V - Freqüência de alterações reprodutivas em porcas provenientes de diferentes granjas do Estado de Minas Gerais, 1981

Propriedades	Porcas		
	Examinadas	Com alteração	%
A	35	15	42,9
B	50	20	40,0
C	20	7	35,0
D	34	14	41,2
E	24	8	33,3
TOTAL	163	64	39,3

Dos 129 machos de diversas idades examinados, 78 (60,5%) apresentaram título de anticorpo HI para o PVS superior a 80 (TAB. VI).

TABELA VI - Ocorrência de machos sorologicamente positivos no teste de HI para o PVS em granjas de suínos do Estado de Minas Gerais, 1981

Propriedades	Machos				
	Examinados	Positivos	%	Negativos	%
A	24	12	50,0	12	50,0
B	33	17	51,5	16	48,5
C	26	18	69,2	8	30,8
D	31	18	58,1	13	41,9
E	15	13	86,7	2	13,3
TOTAL	129	78	60,5	51	39,5

4.2.2. Alterações reprodutivas e número de partos

A frequência de alterações reprodutivas diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a partir do terceiro parto; o percentual de animais com alterações foi maior nas porcas primíparas e de segunda cria (43,8% e 34,4% respectivamente). A diferença entre a frequência de alterações entre o primeiro e segundo partos não foi significativa (TAB. VII).

TABELA VII - Ocorrência de alterações reprodutivas* segundo o parto, em matrizes provenientes de plantéis sorologicamente positivos para o PVS no Estado de Minas Gerais, 1981

Partos	Animais			
	Com alteração	%	Sem alteração	%
1º	28	43,8	56	27,3
2º	22	34,4	88	42,9
3º	10	15,6	44	21,5
≥4º	4	6,2	17	8,3
TOTAL	64	100,0	205	100,0

* Natimortalidade, mumificação, leitegadas pequenas em número, retorno ao estro, aborto

Por ocasião de um surto de alterações reprodutivas ocorrido em uma das granjas estudadas, a análise da performance reprodutiva por parto de matrizes sorologicamente positivas para o PVS revelou que a frequência de mumificação fetal diminuiu à medida em que os partos aumentaram em número causando elevação significativa ($p < 0,05$) no número médio de leitões por leitegada e decréscimo significativo ($p < 0,05$) da porcentagem de leitões nascidos mortos por leitegada (TAB. VIII).

TABELA VIII - Performance reprodutiva segundo o parto de matrizes com problemas reprodutivos, sorologicamente positivas para o PVS provenientes de uma mesma granja. Minas Gerais, 1981

Partos	Leitegadas examinadas	Nº leitões concebidos	Nasc.vivos p/leitegada	Nasc.mortos p/leitegada	Nasc.mortos p/leitegada*
1º	10	97	6,3	34	35,1%
2º	8	87	8,1	22	25,2%
3º	5	73	14,6	8	11,0%

* Porcentagem do total de vivos e mortos

4.2.3. Associação entre idade e título de anticorpos

O levantamento sorológico por faixa etária demonstrou associação altamente significativa ($P < 0,05$) entre idade e título de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS. 62% dos leitões com idade inferior a 150 dias foram sorologicamente positivos para o PVS; dos 114 suínos com idade compreendida entre 151 e 300 dias, somente 31 (27,2%) apresentaram altos níveis de anticorpos. Dentre os suínos com idade superior a 300 dias e o percentual de animais soropositivos foi também alto (67,9%) (TAB. IX).

TABELA IX - Níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS em suínos de diferentes faixas etárias no Estado de Minas Gerais, 1981

Título*	Idade (dias)					
	1 - 150	%	151 - 300	%	> 300	%
0 — 40**	19	38,0	65	57,0	57	32,1
80 - 320***	9	18,0	18	15,8	46	25,8
≥ 640****	22	44,0	31	27,2	75	42,1
TOTAL	50	100,0	114	100,0	178	100,0

* Recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a hemoaglutinação frente a 4 UHA de vírus

** Nível de anticorpos baixo

*** Nível de anticorpos médio

**** Nível de anticorpos alto

4.3. Multiplicação "in vitro" do PVS

Os títulos hemoaglutinantes obtidos após três passagens consecutivas da amostra NADL-2 do PVS em culti -

vos primários de rim de feto suíno e na linhagem celular contínua PK₁₅ foram semelhantes. Um efeito citopático (ECP) discreto caracterizado por arredondamento das células, refringência acentuada e posterior desprendimento do monoextrato celular, somente foi observado nas células primárias (TAB. X).

TABELA X - Multiplicação da amostra NADL-2 do PVS em distintos sistemas celulares

Sistema celular	ECP	Título hemaglutinante*
Cultivo primário	+	256
PK ₁₅	-	512

* Expresso como a recíproca de maior diluição de vírus que causou hemoaglutinação completa

Na FIG. 1, as filas A, G e B correspondem respectivamente, à primeira, segunda e terceira passagens da amostra NADL-2 do PVS em cultivos primários de rim de feto suíno e as filas F, D e C correspondem à primeira, segunda e terceira passagens em células PK₁₅.

4.4. Imunofluorescência direta

Examinando pulmões de fetos mumificados a presença do antígeno foi revelada através da evidenciação de partículas fluorescentes (FIG. 3) no núcleo e/ou citoplasma das células pulmonares afetadas, cuja fluorescência foi inibida por antissoro específico (FIG. 4).

FIGURA 1 - Coluna CH - Controles de Hemácias

Fila A = 64 (RP)
Fila B = 256 (RP)
Fila C = 512 (PK₁₅)
Fila D = 64 (PK₁₅)
Fila E = 0 Controle negativo
Fila F = 8 (PK₁₅)
Fila G = 128 (RP)

FIGURA 2 - Coluna CS - Controles Individuais de Soro

Fila A - CV = controles de vírus com 4, 2, 1, 0
e 0 UHA/0,025 ml

SN = controle de soro negativo

SP = controle de soro padrão positivo

CH = controle de hemácias

Títulos HI dos soros em prova

Fila B = 80

Fila C = 40

Fila D = 160

Fila E = 80

Fila F = 640

Fila G = 20

Fila H = \geq 10240

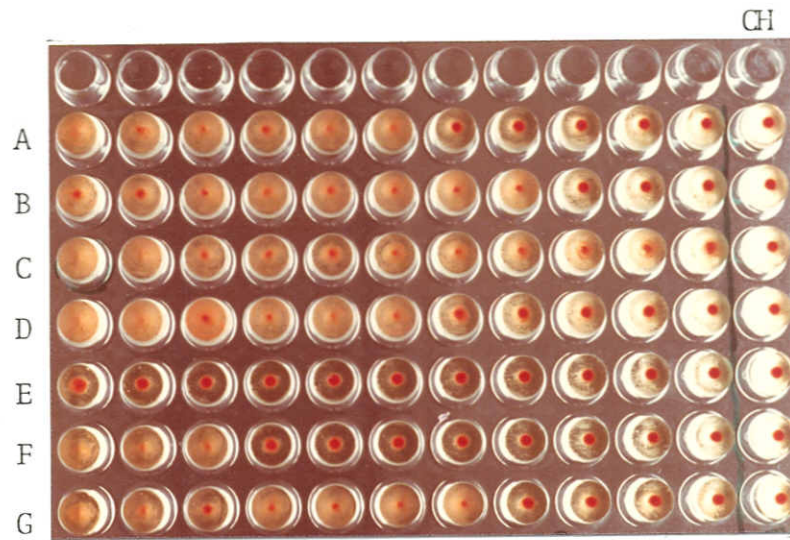


FIG. 1 - Prova de hemoaglutinação (HA) para o PVS em microtítulo

	CV						SN	SP	CH
	C	S	4	2	1	0	0		
A									
B									
C									
D									
E									
F									
G									
H									

FIG. 2 - Prova de inibição de hemoaglutinação (HI) para o PVS em microtítulo

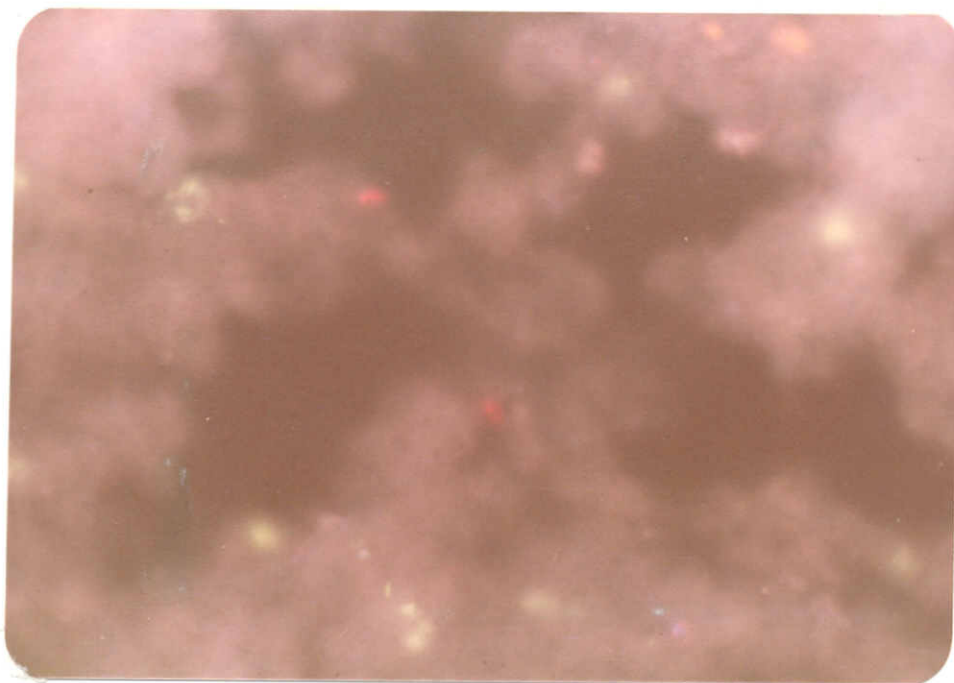


FIGURA 3 - Pulmão de feto suíno mumificado com fluorescência do antígeno viral no núcleo e citoplasma . Imunofluorescência direta, X400



FIGURA 4 - Inibição da fluorescência em corte de pulmão de feto mumificado de suíno. X400

5. DISCUSSÃO

5.1. Levantamento sorológico

Em qualquer região ou país onde não foi descrita a presença de determinado agente infeccioso, a pesquisa de anticorpos para este agente através de levantamento sorológico representa a primeira etapa para o conhecimento inicial de sua presença e possível importância.

Com referência ao PVS a existência de somente um sorotipo do vírus, cujas amostras isoladas em distintos países apresentam propriedades antigênicas idênticas (VANNIER et alii, 1976), facilita a detecção de anticorpos específicos que indicam contato com o PVS.

Não havendo sido descrita anteriormente a presença do PVS na América Latina, a alta prevalência de anticorpos inibidores de hemoaglutinação para este vírus (55,3%) demonstrou a ampla disseminação do PVS na população suína no Estado de Minas Gerais (TAB. I e II). O percentual encontrado foi semelhante aos obtidos em levantamentos realizados em países da Europa, África, Austrália e América do Norte por vários autores (JOHNSON & COLLINGS, 1969; BACHMANN, 1969, 1970; COACKLEY & SMITH, 1972; MENGELING, 1972; JOHNSON, 1973; HORNER & BUDDLE, 1974; REDMANN et alii, 1974; PINI, 1975; VANNIER et alii, 1976; GILLICK, 1977;

ZUPANCIC, 1978; TIMBOL, 1980).

O título de anticorpos necessário para que um animal seja considerado sorologicamente positivo é bastante divergente segundo os diversos autores. MENGELING (1972) ao descrever pela primeira vez a presença do PVS nos Estados Unidos considerou positivos os soros com título superior a 5. ZUPANCIC (1977) considerou positivos soros com título superior a 32, enquanto que HOGG et alii (1977) estabeleceram positividade em títulos superiores a 8. VANNIER et alii (1976) em levantamento inicial realizado na França somente consideraram positivos os soros com título inibidor da hemoaglutinação igual ou superior a 320 para evitar possíveis erros devido à presença de inibidores inespecíficos da hemoaglutinação nos soros de suínos. JOO et alii (1976) demonstraram que a adsorção dos soros com caolim e com glóbulos vermelhos de cobaio remove estes inibidores inespecíficos sem perda significativa de imunoglobulina e evita as reações falsamente negativas ocasionadas por soros autoaglutinantes.

Considerando que os soros testados foram previamente tratados com caolim e eritrócitos de cobaio, que foram mantidos controles individuais de cada soro e que tratou-se de levantamento sorológico inicial, foram considerados positivos à prova de inibição da hemoaglutinação (HI) os animais que apresentaram anticorpos em diluição de soro igual ou superior a 1:80, não querendo com isto afirmar que estes seriam níveis protetores mas somente indicativos de contato com o PVS.

Analisando as granjas amostradas individualmente (TAB. II) verificou-se que com exceção das granjas D e F, a prevalência de animais sorologicamente positivos foi semelhante indicando disseminação uniforme do PVS nas propriedades estudadas.

A granja D, caracterizada pelo predomínio de animais com idade superior a 15 meses, apresentou percen -

tual de positividade superior (81,3%) ao de outras granjas. Estes resultados confirmaram os obtidos por HARKNESS et alii (1971) os quais encontraram maior proporção de soros positivos em animais mais velhos.

A denominação propriedade "F" (TAB. II) foi dada a um grupo de soros de suínos provenientes de quatro granjas distintas que, por não constituírem individualmente número representativo das propriedades ou por não terem histórico da vida reprodutiva, foram agrupados para efeito de representação na tabela. Os seguintes soros constituíram este grupo:

- a) 36 soros de suínos jovens, os quais foram sorologicamente negativos (títulos HI variando entre 0 e 20), à exceção de um que apresentou título de 320. Estes animais na época da colheita da amostra haviam sido recentemente importados. A falta de contato anterior com o PVS poderia justificar a ocorrência de títulos negativos em 35/36 soros fato que, por falta de dados disponíveis não pode ser confirmado;
- b) 40 soros de suínos com histórico desconhecido, dos quais 26 (65%) apresentaram título de anticorpos HI superior a 80;
- c) 11 soros de leitões em lactação e porcas gestantes provenientes de uma mesma propriedade onde, até o momento da colheita dos soros, nenhuma manifestação de problemas reprodutivos foi observada; somente dois soros (18,2%) foram positivos com títulos de anticorpos HI para o PVS de 80 e 160 respectivamente. Entretanto, este percentual foi muito inferior àqueles encontrados nos soros provenientes de granjas onde a ocorrência de problemas reprodutivos indicou a possibilidade de uma infecção a PVS (TAB. II - granjas A e E). Situação semelhante foi observada por VANNIER et alii (1976);
- d) soros de dois varrões e 10 porcas que por ocasião de um surto de mumificação fetal na granja, foram remetidos

para exames laboratoriais. Nove (75%) dos 12 soros apresentaram títulos de anticorpos HI para o PVS superior a 640.

5.2. Estudo clínico-sorológico

O estudo clínico e sorológico realizado nos plantéis onde a ocorrência de alterações reprodutivas é conhecida nos permitiu analisar, dentro de certas limitações, a possível relação entre a presença do PVS nos plantéis revelada pela detecção de anticorpos específicos e a ocorrência dos problemas reprodutivos observados.

Os elementos de análise foram fundamentados no estudo da cinética dos anticorpos anti-PVS já que os plantéis apresentaram-se negativos em provas sorológicas realizadas para detecção de outros agentes patógenos mais frequentes, que poderiam estar ocasionando tais problemas.

Segundo VANNIER & TILLON (1979) a demonstração da coexistência de animais sorologicamente positivos e negativos para o PVS, associado à ocorrência de alterações reprodutivas sem causa definida, demonstra que a infecção por este vírus evidenciada pela presença de anticorpos específicos, pode estar diretamente relacionada com a ocorrência de tais alterações.

O perfil sorológico das granjas demonstrou que os níveis de anticorpos dentro de um mesmo plantel foram variáveis (TAB. III, FIG. 2), caracterizando uma infecção em evolução; a coexistência de animais imunes contra o PVS que podem excretar o vírus por mais de 21 dias (CARTWRIGHT et alii, 1971) e de animais não imunizados cria as condições favoráveis ao desenvolvimento da infecção dentro do plantel e ao aparecimento de problemas reprodutivos.

Grande parte dos animais testados eram fêmeas gestantes, com títulos de anticorpos também variáveis, fator ainda mais importante quando aliado ao fato de que o

PVS somente é patogênico para as porcas gestantes, com posterior transmissão do agente por via transplacentária. VANNIER & TILLON (1979) mostram que, assim que a infecção se estabiliza no rebanho todos os animais e, em particular as porcas reprodutoras, possuem boa imunidade humoral para o PVS, impedindo a contaminação transplacentária dos fetos durante a gestação.

JOHNSON et alii (1976) demonstraram que o PVS uma vez introduzido em um plantel negativo, dissemina-se envolvendo 100% dos suínos em aproximadamente três meses. Entretanto, o isolamento estrito ao qual os animais são submetidos no regime de criação em confinamento impede que a disseminação do vírus dentro da granja seja uniforme acarretando conseqüentemente, esta heterogeneidade de níveis de anticorpos, ocasionando muitas vezes uma imunidade dispersa nas porcas e varrões adultos. GILLICK (1977) encontrou este mesmo perfil sorológico ao testar suínos criados em regime de confinamento.

Aliado a este tipo de manejo, deve-se considerar a alta taxa de renovação do plantel não permitindo a formação de uma população uniformemente imune mas sim a coexistência de animais suscetíveis, imunes e ativamente infectados com eliminação do vírus.

Esta heterogeneidade de anticorpos assume papel ainda mais importante ao se considerar as inúmeras fontes de infecção e disseminação dentro da granja e entre granjas.

O PVS é extremamente resistente a condições adversas, podendo resistir em baias desocupadas por mais de 20 semanas. As maiores concentrações de vírus existem nas baias das porcas gestantes, mas a maior parte das áreas de propriedades infectadas podem estar contaminadas (JOHNSON et alii, 1976), representando fonte de infecção constante se as condições higiênicas e de manejo não forem adequadas.

Leitões que se infectaram in utero são fonte de infecção por pelo menos nove semanas (JOHNSON & COLLINGS, 1971)

embora o estado de portador não tenha sido ainda demonstrado conclusivamente.

A exposição direta ou indireta é importante na transmissão do PVS. O vírus multiplica-se primariamente em tecidos com altos índices mitóticos mas pode ser encontrado na maioria das secreções e excreções durante a fase aguda da infecção.

Um importante reservatório são os fetos infectados, já que o vírus resiste à inativação por semanas em tecidos macerados e mumificados de fetos que morrem pela infecção.

O PVS é disseminado entre as granjas pela transferência de porcas e varrões no momento da infecção ativa, os quais excretam o vírus nas fezes por 3-14 dias após a infecção (JOHNSON et alii, 1976).

A transmissão do PVS através de fomites e pessoas não deve ser descartada, já que o vírus é tão resistente e infectante.

MENGELING et alii (1975) descrevem a ocorrência de infecção com PVS em porcas primíparas vacinadas durante a gestação com um lote de vacina para a gastroenterite transmissível dos leitões (TGE) produzida em cultivos celulares provavelmente contaminados com PVS, relevando a importância dessa via de disseminação do vírus.

Na TAB. IV observou-se que dos 110 animais sorologicamente positivos para o PVS somente 50 (45,5%) apresentaram alterações reprodutivas em alguma fase da vida. Estes dados indicam com clareza que os animais podem tornar-se soropositivos através de contato com o PVS fora do período de gestação sem apresentar qualquer tipo de alteração clínica evidente.

Da mesma forma dos 53 animais sorologicamente negativos, 39 (73,6%) não apresentaram problemas reprodutivos, possivelmente por falta de contato com o vírus ocasionada pelo confinamento. Os 14 (26,4%) restantes foram soronegativos para o PVS apesar de haverem apresentado al-

terações o que poderia ser explicado pela ocorrência de tolerância imunológica em suínos que tiveram contato muito precoce com o PVS durante a vida intrauterina e que, posteriormente, apresentam pouca ou nenhuma resposta sorológica frente a desafios subsequentes (JOHNSON & COLLINGS, 1971). A participação simultânea de vários agentes infecciosos na etiologia dos problemas reprodutivos é freqüente (KIRKBRIDGE & McADARAGH, 1978). Apesar da evidenciação sorológica da ausência de peste suína clássica e leptospirose nesses animais, a presença de outros agentes não testados como os enterovírus do grupo SMEDI de ocorrência mundial e de difícil controle não deve ser descartada.

A proteção conferida pela presença de anticorpos HI para o PVS no soro foi demonstrada pela associação de maior proporção de animais sorologicamente positivos (110/163), com baixo percentual de animais com alteração (39,2%) (TAB. IV).

Uma vez determinado o perfil sorológico de uma granja, deve-se procurar alcançar maior homogeneidade possível de níveis de anticorpos ativos para o PVS pois o aumento na proporção de animais soropositivos acarretará em diminuição na ocorrência de problemas reprodutivos.

Vários fatores influenciam o aparecimento de problemas reprodutivos após a infecção pelo PVS e sendo assim, muitas vezes a infecção não pode ser detectada através da presença de respostas clínicas visíveis. As manifestações de falhas reprodutivas causadas por vírus são influenciadas pelo período de gestação em que ocorreu a infecção intrauterina; segundo CROPPER et alii (1976) a gestação em suínos somente se estabelece se quatro ou mais embriões viáveis ocupam o útero. Logo, leitegadas pequenas em número (menos de quatro leitões) somente ocorrem quando algum fator ou agente destruiu alguns embriões após o estabelecimento da gestação.

A administração do PVS a suínos de diferentes

idades (CUTLIP & MENGELING, 1975a; OGASA et alii, 1979; BROWN et alii, 1980) e em distintos estágios de gestação (JOHNSON & COLLINGS, 1969; CARTWRIGHT et alii, 1971; BOURNE et alii, 1974; REDMAN et alii, 1974; BACHMANN et alii, 1975; CUTLIP & MENGELING, 1975b; MENGELING & CUTLIP, 1975; BACHMANN 1976; MENGELING & CUTLIP, 1976; LENGHAUS et alii, 1978; PARKER et alii, 1981), demonstrou definitivamente que o PVS não apresenta qualquer poder patogênico para leitões e suínos adultos. A ação patogênica do vírus é exercida essencialmente sobre o embrião ou feto e está relacionada com o estágio de gestação no qual ocorreu a infecção.

Na maioria dos casos, desde que o PVS infecte o blastocisto ou embrião antes do 30º dia de gestação e que esta infecção cause a morte de todos os embriões, a porca retorna ao cio por mecanismos fisiológicos normais. Se pelo menos um embrião sobrevive entre o 14º e 30º dia de gestação os embriões mortos são absorvidos mas a gestação continua normalmente e conseqüentemente a leitegada será pequena em número.

Se os fetos se infectam após o 31º dia de gestação, a calcificação do esqueleto impede a absorção completa, mas produz-se desidratação conduzindo-os à mumificação. Entretanto, as porcas que levam estes fetos não apresentam qualquer alteração clínica.

A maioria dos trabalhos estabelece o início da competência imunológica dos fetos no 60-62º dias de gestação a partir do que os fetos perdem sua sensibilidade ao vírus; BACHMANN et alii (1975) demonstraram que infecção após o estabelecimento da imunocompetência não altera o estado dos leitões que nascem aparentemente normais e sorologicamente positivos, ainda que o PVS possa ser isolado dos fetos ou leitões infectados.

Na TAB. IV observou-se que dos 99 animais que não apresentaram qualquer tipo de alteração clínica visível 60 eram sorologicamente positivos, indicando que os fetos destes animais tiveram contato com o PVS antes do es-

tabelecimento da imunocompetência.

Nas granjas testadas a percentagem de machos sorologicamente positivos para o PVS foi de 60,5% (TAB.VI) e a possibilidade destes animais, se em infecção ativa transmitirem o PVS a porcas suscetíveis não deve ser descartada. Este resultado foi semelhante ao encontrado por RUCKERBAUER et alii (1978) em uma unidade de inseminação artificial de suínos. Como 51 (39,5%) dos animais testados foram sorologicamente negativos, um posterior contato com o PVS poderia resultar em infecção. A patogenicidade do PVS para varrões adultos não foi esclarecida totalmente até o momento, ainda que o vírus tenha sido isolado do sêmen de varrões (CARTWRIGHT et alii, 1969) e de ovários císticos em porcas inférteis (JOHNSON, 1973) e em ambos os casos tenha sido associado a baixa fertilidade.

As vias mais comuns de infecção pelo PVS são a oral e nasal mas a importância da via venérea na infecção natural não está totalmente esclarecida. Experimentalmente, a infecção de porcas sorologicamente negativas para o PVS com sêmen infectado resultou em infecção fetal (LUCAS et alii, 1974). CARTWRIGHT & HUCK (1967) e CARTWRIGHT et alii (1971) sugerem que a infecção de porcas através do sêmen no momento da cobertura pode contribuir para o aparecimento de retorno ao estro e leitegadas reduzidas, porém WRATHALL & MENGELING (1979) nestas mesmas condições não observaram qualquer alteração. RODEFFER et alii (1975) descrevem o aparecimento de problemas reprodutivos acompanhados de soroconversão das porcas após a introdução de novos varrões no plantel.

JOHNSON et alii (1976) descrevem o caso de um varrão adulto comprovadamente livre de anticorpos HI para o PVS em presença de infecção contínua, que originou repetidamente leitegadas anormais quando cobria porcas sensíveis, sugerindo que a falta de resposta fosse devida à existência de tolerância imunológica neste animal após in-

fecção muito precoce in utero com persistência do vírus no trato genital.

Não foi possível averiguar a provável associação existente entre o aparecimento de alterações reprodutivas nas fêmeas cobertas por machos soropositivos e futuros trabalhos neste sentido deverão ser desenvolvidos. A maior parte dos varrões soropositivos apresentou títulos de anticorpos HI superiores a 640, indicando imunidade ativa por contato com o PVS.

As granjas C e E (TAB. VI) com 69,2% e 86,7% respectivamente de machos sorologicamente positivos para o PVS foram as que apresentaram menores percentuais de ocorrência de problemas reprodutivos (TAB. V) indicando que deve-se procurar obter a maior homogeneidade de anticorpos possível dentro do plantel, evitando desta forma uma provável contaminação venérea.

Mesmo que a transmissão venérea não ocorra, um varrão em infecção ativa, eliminando vírus através das fezes, pode contaminar por via oral ou nasal outros animais e particularmente as fêmeas que estarão em contato estrito com ele no momento da cobrição.

Na suinocultura industrial a primeira cobrição e conseqüentemente o primeiro parto ocorrem muito precocemente e muitas vezes as leitoas não apresentam níveis de anticorpos ativos suficientes para proteção de suas progênes contra uma infecção transplacentária pelo PVS. Logo, as maiores freqüências de alterações reprodutivas (78,2%) ocorreram no 1º e 2º partos sendo que, a partir do 3º parto este percentual diminuiu significativamente ($p < 0,05$) (TAB. VII) comprovando os resultados obtidos por MENGELING (1978). Os mesmos resultados foram observados durante um surto de alterações reprodutivas em uma das granjas estudadas, quando verificou-se decréscimo significativo ($p < 0,05$) na freqüência de mumificação fetal e conseqüentemente aumento significativo ($p < 0,05$) no nú-

mero médio de leitões por leitegada à medida em que os partos aumentaram em número (TAB. VIII). A maior frequência de alterações reprodutivas nos 1º e 2º partos está estreitamente relacionada aos níveis de anticorpos ativos e idade à primeira cobertura além das taxas de renovação do plantel.

PAUL & MENGELING (1980) demonstraram que leitões amamentados por porcas imunes apresentam altos níveis de anticorpos passivos (≥ 640) para o PVS que diminuem progressivamente até a ausência de anticorpos em torno da 26ª semana de vida. Este fato foi confirmado pela ocorrência de 62% de leitões sorologicamente positivos com título de anticorpos passivos igual ou superior a 80 na faixa etária de 1 a 150 dias de idade (TAB. IX). Os animais soronegativos não tiveram contato com o PVS in utero e foram amamentados por porcas soronegativas para o PVS. Nesta faixa etária, os leitões que se infectaram in utero após o estabelecimento da competência imunológica apresentam altos níveis de anticorpos ativos (> 1280) que segundo JOHNSON & COLLINGS (1971) persistem por mais de oito meses, perfeitamente diferenciados dos anticorpos passivos e normalmente apresentam-se em níveis mais baixos.

Na faixa etária de 151 a 300 dias o percentual de leitões soropositivos (título ≥ 80) decresceu para 43,0% por ser esta uma fase caracterizada pela queda da imunidade passiva já que o aumento de anticorpos ativos somente ocorrerá em idade mais avançada. À medida que a idade aumenta os níveis sorológicos sobem progressivamente; 67,9% dos animais com mais de 300 dias de idade mostraram-se soropositivos para o PVS com título de anticorpos ativos HI igual ou superior a 80.

Não se sabe exatamente quais seriam os níveis protetores de anticorpos HI para o PVS. PAUL et alii (1980) demonstraram a necessidade de altos níveis de anticorpos (≥ 640) para proteção contra uma infecção por este vírus. Somente 27,2% dos animais com idade compreendida entre 151

e 300 dias apresentaram título sorológico igual ou superior a 640 (TAB. IX) demonstrando que uma proporção significativa de leitoas é suscetível à infecção na época do primeiro serviço. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por REDMAN et alii (1974) os quais verificaram que a maioria das leitoas eram sorologicamente negativas para o PVS na época de entrada para a reprodução.

Os distúrbios reprodutivos são a maior manifestação clínica da infecção por PVS em suínos. Conseqüentemente constitui-se em fator importante o estabelecimento de um estado imunitário uniforme antes do cruzamento em todo o plantel e particularmente das fêmeas gestantes atuando como barreira para a infecção transplacentária dos fetos.

Em granjas infectadas pelo PVS, o maior problema reside no uso de leitoas e varrões antes que estes apresentem imunidade ativa, caracterizada por altos níveis de anticorpos que segundo JOHNSON et alii (1976) mantêm-se elevados pelo menos quatro anos.

De acordo com nossos achados, grande parte dos animais jovens (151 a 300 dias de idade) são suscetíveis ao PVS, sendo que seria aconselhável a utilização destes animais para serviço somente após os 10 meses de idade ou quando os testes sorológicos demonstrassem a presença de altos níveis de anticorpos ativos para este vírus.

A exposição destes animais ao PVS 30-60 dias antes do cruzamento através do uso de vacinas ou de técnicas de manejo que permitissem um contato entre animais infectados e animais não imunes, permitiria o desenvolvimento de títulos de anticorpos ativos suficientes para impedir a infecção no momento da cobertura quer seja por contato direto ou por via venérea. A ocorrência de 57,0% de animais soro-negativos para o PVS entre 151 e 300 dias de idade (TAB. IX) constituiria por si só número suficiente para a indicação do uso de vacinas nestes plantéis; entretanto, somente a determinação de até que ponto estas alterações estariam a-

fetando o performance reprodutivo de cada propriedade indicaria a importância econômica da vacinação necessitando todavia maiores estudos neste sentido.

A falta de contato entre os animais de um mesmo plantel decorrente dos sistemas de criação em confinamento impede exposição homogênea ao PVS e conseqüente homogeneidade imunitária. Aliado a este fato, sabe-se que a alta e constante renovação do plantel atingindo taxas de até 30% ao ano ocasiona a eliminação das matrizes com idade mais avançada as quais são substituídas por animais jovens com grande probabilidade de serem ainda suscetíveis ao PVS.

Sendo o PVS extremamente infectante (JOHNSON et alii, 1976), devem ser mantidas medidas estritas quanto à entrada de animais. Se esta entrada é necessária, os animais devem ser mantidos em quarentena permitindo assim um contato com a infecção já existente na granja no caso destes serem soronegativos, além de evitar a introdução de animais apresentando infecção ativa com o PVS.

A aquisição de animais com mais de 12 meses de idade que apresentem títulos de anticorpos HI para o PVS não constituiria maior problema já que nenhum estado de portador foi detectado. Obviamente que qualquer animal de um plantel infectado deve ser considerado como transportador mecânico do vírus na superfície da pele devido à acentuada resistência do PVS.

Em contraste com os resultados obtidos por STĚPANEK et alii (1979) o PVS replicou-se satisfatoriamente na linhagem celular contínua PK₁₅ com títulos hemoaglutinantes semelhantes aos obtidos em cultivos primários de rim de feto suíno (TAB. X, FIG. 1). Estes resultados assumem importância prática se associados à prática do uso de vacinas para suínos produzidas em cultivos celulares homólogos. A presença do PVS em cultivos celulares de rins de suíno aparentemente não afeta a replicação de outros

vírus (MENGELING, 1975) e muitas vezes o PVS pode estar presente em níveis muito baixos para causarem efeito citopático visível. Assim, o uso de cultivos primários ou de linhagens celulares contínuas somente deve ter lugar após a demonstração da ausência do PVS nestas células evitando possível introdução do vírus em plantéis suscetíveis como foi descrito por MENGELING et alii (1975).

A demonstração do antígeno viral em quantidades variáveis, através da prova direta de imunofluorescência pode confirmar a presença do PVS nos fetos mumificados e natimortos examinados (FIG. 3 e 4).

Não sendo conhecida qualquer relação antigênica entre o PVS e outros vírus de suínos a demonstração do antígeno através deste método consitui-se em evidência segura de infecção pelo PVS, oferecendo inúmeras vantagens como método diagnóstico de rotina, tais como a obtenção dos resultados em poucas horas e eliminação da possibilidade de contaminação endôgena de culturas celulares utilizadas para isolamento do vírus além da extrema estabilidade do antígeno o qual se mantém reagente mesmo após a morte fetal.

O perfil sorológico encontrado associado à demonstração do antígeno por imunofluorescência direta demonstrou a larga disseminação do PVS em forma endêmica na população suína estudada. O aparecimento brusco em um plantel, de alterações reprodutivas caracterizadas pela ocorrência de fetos mumificados, retornos ao estro e leitegadas reduzidas, poderá ser esclarecido pela evidenciação de anticorpos HI no soro precolostral dos leitões ou pela demonstração do antígeno através da técnica de imunofluorescência direta incriminando com certeza o PVS como responsável pelos problemas observados.

Dentro deste contexto epidemiológico desfavorável, o estudo minucioso das condições sorológicas do rebanho, nos indicará as medidas de controle mais adequadas à cada caso especificamente, evitando-se as possíveis perdas

econômicas advindas das alterações reprodutivas causadas -
pelo PVS.

6. CONCLUSÕES

1. A alta prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS (55,3%) demonstrou a ampla disseminação do vírus na população suína estudada.

2. A prevalência de animais sorologicamente positivos no teste de inibição da hemoaglutinação foi semelhante entre as diversas granjas estudadas, indicando disseminação uniforme do PVS.

3. O perfil sorológico dos animais testados demonstrou acentuada heterogeneidade de níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS indicando infecção em evolução.

4. No sistema de criação em confinamento os baixos níveis de anticorpos para o PVS à primeira cobertura e as altas taxas de renovação dos plantéis constituem fator importante na maior ocorrência de alterações reprodutivas nos 1º e 2º partos (78,2%).

5. 39,5% dos suínos machos examinados foram sorologicamente negativos para o PVS no teste de inibição da hemoaglutinação e conseqüentemente suscetíveis à infecção.

6. 62% dos leitões com idade inferior a 150 dias foram sorologicamente positivos para o PVS com título de anticorpos passivos igual ou superior a 80.

7. Somente 27,2% dos suínos com idade compreendida entre 151 e 300 dias apresentaram título de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS igual ou superior a 640, demonstrando que uma população significativa de leitões é suscetível à infecção na época do primeiro serviço.

8. Dentre os suínos com idade superior a 300 dias o percentual de animais soropositivos foi também alto (67,9%) indicando níveis satisfatórios de proteção neste grupo etário.

9. A amostra NADL-2 do PVS replicou-se satisfatoriamente na linhagem celular contínua PK₁₅ com títulos hemoaglutinantes semelhantes aos obtidos em cultivos primários de rim de feto suíno.

10. A demonstração do antígeno viral através da prova direta de imunofluorescência confirmou a presença do PVS nos fetos examinados.

ANEXO 1

INQUÉRITO DE OPINIÃO

Data: .../.../... N° da ficha Entrevistador

1. LOCALIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

1. Município
2. Nome do criador
3. Nome da propriedade
4. Endereço rural
5. Endereço urbano Fone
6. Área total da propriedade

2. POPULAÇÃO ANIMAL

Leitões em lactação	Leitões desmamados	Machos/Fêmeas (6-12 meses)	Porcas + 12 meses	Machos + 12 meses	Total
---------------------	--------------------	----------------------------	-------------------	-------------------	-------

3. PERFORMANCE REPRODUTIVA

	Partos				
	Primíparas	2º	3º	4º	5º

Leitões nascidos vivos
 Leitões mumificados
 Leitões natimortos
 Abortos

% média de fertilidade do rebanho

% média de repetição de cio no rebanho

4. MANEJO SANITÁRIO DE ANIMAIS

1. Esquema de vacinação

<u>Vacina contra</u>	<u>Frequência</u>
----------------------	-------------------

Erisipela
 Peste suína clássica
 Leptospirose
 Outras

2. Aplica quarentena aos animais adquiridos?

Sim Não

ANEXO II

Propriedade:

Legenda: VU = varrões usados
 NV = nascidos vivos
 NM = mumificação
 NM = nascidos mortos
 Ab = abortos
 DC = data da cobertura
 DP = data do parto
 RC = repetição do cio

Tatuagem/ brinco da porca	1º parto					2º parto					3º parto					4º parto																
	VU	NV	NM	NM	Ab	DC	DP	RC	VU	NV	NM	NM	Ab	DC	DP	RC	VU	NV	NM	NM	Ab	DC	DP	RC	VU	NV	NM	NM	Ab	DC	DP	RC

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACHMANN, P.A. Vorkommen und Verbreitung von Picodna (-Parvo) Virus beim Schwein. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B, Hamburg, 16(4):341-5, 1969.
2. BACHMANN, P.A. Parvoviren beim Schwein. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B, Hamburg, 17(1):192-4, 1970 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 46(9):658, 1976.
3. BACHMANN, P.A. Virological and serological investigations in experimental Parvovirus infection in pigs. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.DD-3.
4. BACHMANN, P.A.; SHEFFY, B.E.; VAUGHAN, J.T. Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. Infect. Immun., Washington, 12(3):455-60, 1975.
5. BOURNE, F.J.; CURTIS, J.; JOHNSON, R.H.; COLLINGS, D.F. Antibody formation in porcine foetuses. Res. Vet. Sci., London, 16(2):223-7, 1974.
6. BROWN, T.T. Jr.; PAUL, P.S.; MENGELING, W.L. Response of conventionally raised weanling pigs to experimental infection with a virulent strain of porcine parvovirus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 41(8):1221-4, 1980.

7. CARTWRIGHT, S. & HUCK, R.A. Viruses isolated in Association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. Vet. Rec., London, 81(8):196-7, 1967.
8. CARTWRIGHT, S.; LUCAS, M.; HUCK, R.A. A small hemagglutinating DNA virus. I) Isolation and properties. J. Comp. Pathol., London, 79(3):371-7, 1969.
9. CARTWRIGHT, S.; LUCAS, M.; HUCK, R.A. A small hemagglutinating DNA virus. II) Biological and serological studies. J. Comp. Pathol., London, 81(1):145-55, 1971
10. CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. Procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires, 1979. 35p. (Nota Tecnica 18, Rev. 1).
11. COACKLEY, W. & SMITH, V.W. Porcine parvovirus in Western Australia. Aust. Vet. J., Brunswick, 48(9):536, 1972.
12. CROPPER, M.; DUNNE, H.W.; LEMAN, A.D.; STARKEY, A.L.; HOEFLING, D.C. Prevalence of antibodies to porcine enteroviruses and porcine parvovirus in body fluids of fetal pigs from small vs large litters. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 168(3):233-5, 1976.
13. CUTLIP, R.C. & MENGELING, W.L. Experimentally induced infection of neonatal swine with porcine parvovirus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 36(8):1179-82, 1975a .
14. CUTLIP, R.C. & MENGELING, W.L. Pathogenesis on in utero infection: experimental infection of eight-and ten-week old porcine fetuses with porcine parvovirus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 36(12):1751-4, 1975b.
15. DUNNE, W.H. & CLARK, C.D. Embryonic death, fetal mummification, stillbirth and neonatal death in pigs of gilts vaccinated with attenuated live-virus hog cholera vaccine. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 29(4):787-96, 1968.
16. DUNNE, W.H.; GOBBLE, J.L.; HOKANSON, J.F.; KRADEL, D.C.; BUBASH, G.R. Porcine reproductive failure associated

- with a newly identified "SMEDI" group picorna viruses. Am. J. Vet. Res., Chaumburg, 26(115):1284-97, 1965 .
17. GILLICK, J.C. An outbreak of swine foetal mummification associated with porcine parvovirus. Aust. Vet. J., Brunswick, 53(2):105-6, 1977.
 18. HARKNESS, J.W.; CHAPMAN, M.S.; DARBYSHIRE, J.H. A survey of antibodies to some respiratory viruses in the sera of pigs. Vet. Rec., London, 88(17):441-7, 1971.
 19. HOGG, G.G.; LENGHAUS, C.; FORMAN, A.J. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. J. Comp. Pathol., London, 87(4):539 - 49, 1977.
 20. HORNER, G.W. & BUDDLE, J.R. Serological evidence of porcine parvovirus in New Zealand. N. Z. Vet. J., Wellington, 22(4):61, 1974.
 21. JOHNSON, R.H. Isolation of swine parvovirus in Queensland. Aust. Vet. J., Brunswick, 49(3):157-9, 1973.
 22. JOHNSON, R.H. & COLLINGS, D.F. Experimental infection of piglets and pregnant gilts with parvovirus. Vet. Rec., London, 85(14):446-7, 1969.
 23. JOHNSON, R.H. & COLLINGS, D.F. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci., London, 12(6):570-2, 1971.
 24. JOHNSON, R.H.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOO, H.S.; ALLENDER, V. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. Aust. Vet. J., Brunswick, 52(2):80-4, 1976 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 46(9):653-60, 1976.
 25. JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. Aust. Vet. J., Brunswick, 52(9):422-4, 1976.
 26. KIRKBRIDGE, C.A. & McADARAGH, J.P. Infectious agents

- associated with fetal and early neonatal death and abortions in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 172(4):480-3, 1978.
27. LENGHAUS, C.; FORMAN, A.J.; HALE, C.J. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig fetuses with porcine parvovirus. Aust. Vet. J., Brunswick, 54(9):418-22, 1978.
28. LUCAS, M.H.; CARTWRIGHT, S.F.; WRATHALL, A.L. Genital infection of pigs with porcine parvovirus. J. Comp. Pathol., London, 84(3):347-50, 1974.
29. LUCAS, M.H. & NAPHTHINE, P. Fluorescent antibody technique in the study of three porcine viruses. J. Comp. Pathol., London, 81(2):111-7, 1971.
30. MA, C.H.; CHANG, L.C.; LEE, G.Y.; WUNG, S.C. The effect of vaccination with the local attenuated strain of J. E. virus, TW-21 on stillbirths in gilts in Taiwan. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.DD-2.
31. MARÉ, C.J.; KLUGE, J.P.; BERAN, G.W. Reproductive failure in swine infected with pseudorabies (Aujeszky's) virus. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.G-1.
32. McADARAGH, J.P. & ROB, M.G. Experimental reovirus infection of pregnant sows. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL CONGRESS, 4., Ames, 1976. Proceedings. Ames, International Pig Veterinary Society, 1976. p.DD-1.
33. MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the U.S.A. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 33(4):2239-48, 1972.
34. MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: frequency of naturally occurring transplacental infection and viral

- Contamination of fetal porcine kidney cell cultures.
Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 36(1):41-4, 1975.
35. MENGELING, W.L. Prevalence of porcine parvovirus-induced reproductive failure: An abattoir study. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 172(11):1291-4, 1978.
36. MENGELING, W.L. & CUTLIP, R.C. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 36(8):1173-7, 1975.
37. MENGELING, W.L. & CUTLIP, R.C. Reproductive diseases experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 37(12):1393-400, 1976.
38. MENGELING, W.L.; CUTLIP, R.C.; WILSON, R.A.; PARKS, J. B.; MARSHALL, R.F. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 166(10):993-5, 1975.
39. OGASA, A.; YOKOK, Y.; FUJISAKY, Y.; MURAKAMI, Y. Reproductive disorders in boars infected experimentally with porcine parvovirus. JPN. J. Anim. Reprod., Tokyo, 24(2):73-6, 1979 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 50(5):387, 1980.
40. PARKER, B.N.; WRATHALL, A.E.; CARTWRIGHT, S.F. Accidental introduction of porcine parvovirus and Talfan virus into a group of minimal disease gilts and their effects on reproduction. Br. Vet. J., London, 137(3):262-7, 1981.
41. PAUL, P.S. & MENGELING, W.L. Persistence of passively acquired colostral antibodies to porcine parvovirus. In: PROCEEDINGS CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASE, 61, Chicago, 1980. Proceedings. Chicago, Annual Meeting Research of Workers in Animal Disease, 1980. Abst. 207 p.38.

42. PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; BROWN, T.T. Jr. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 41(9):1368-71, 1980.
43. PINI, A. Porcine parvovirus in pig herds in Southern Africa. J.S. Afr. Vet. Assoc., Pretoria, 46(3):241-4, 1975.
44. RASBECH, N.O. A review of the causes of reproductive failure in swine. Br. Vet. J., London, 125(12) : 599-616, 1969.
45. REDMAN, D.; BOHL, E.M.; FERGUSON, L.C. Porcine parvovirus: Natural and experimental infections of the porcine fetus and prevalence in mature swine. Infect. Immun., Washington, 10(4):718-23, 1974.
46. RODEFFER, H.E.; LEMAN, A.D.; DUNNE, W.H.; CROPPER, M.; SPRECHER, D.J.; Reproductive failure in swine associated with maternal seroconversion for porcine parvovirus. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 166(10) : 991-2 , 1975.
47. RUCKERBAUER, G.M.; DULAC, G.C.; BOULANGER, P. Demonstration of parvovirus in Canadian swine and antigenic relationships with isolates from other countries. Can. J. Comp. Med., Ottawa, 42(3):278-85, 1978.
48. SAXEGAARD, F. & ONSTAD, O. Isolation and identification of IBR-IPV virus from cases of vaginitis and balanitis and from healthy swine. Nord. Veterinaermed., Copenhagen, 19(1):54-7, 1967 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 46(9) :658, 1976.
49. SPIEGEL, M.R. O teste do Qui-quadrado. In: _____ Estatística, 13.ed., São Paulo, McGraw Hill eds., 1979.p. 331-61.
50. STÉPANEK, J.; MACHATY, Y.; MENSIK, J. Isolation of parvovirus from stillborn piglets from sows with disorders

- during pregnancy. Vet. Med., Prague, 24(3):149-58, 1979 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 49(10):763, 1979
51. TIMBOL, C.R. Studies on porcine parvovirus. Philipp. J. Vet. Med., Quezon City, 19(1):81-91, 1980.
 52. VANNIER, P. & TILLON, J.P. Reliable diagnosis of parvovirus infection in reproductive disorders in swine. Recl. Med. Vet., Paris, 155(2):151-8, 1979.
 53. VANNIER, P.; LEUNEN, J.; TILLON, J.P. Rôle du parvovirus dans les troubles de la reproduction chez le porc. Recl. Med. Vet., Paris, 152(9):509-16, 1976 .
 54. WRATHALL, A.W. & MENGELING, W.L. Effect of inseminating seropositive gilts with semen containing porcine parvovirus. Br. Vet. J., London, 135(5):420-5, 1979.
 55. ZUPANCIC, Z. Detection of hemagglutination inhibition antibodies to 59E/69 parvovirus in serum of pigs in Croatia. Vet. Arh., Zagreb, 47(3):143-52, 1977 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 48(3):215, 1978.
 56. ZUWAYLIF, F.H. Estimating the population mean from a sample. In: General applied statistics. 2.ed., Northridge, Addison-Wesley Inc. eds., 1970 p.116-44.