

Zélia Inês Portela Lobato



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA SOROLÓGICA DE SUÍNOS IMUNIZADOS CONTRA O PARVOVÍRUS SUÍNO COM UMA VACINA INATIVADA EXPERIMENTAL E PELO MÉTODO DE "FEED BACK" (RETROINFECÇÃO)

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



103/04

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Belo Horizonte

Minas Gerais

1990

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
31/08/90
72390-08

MV-00006699-6

636.408 969 2

L796a Lobato, Zélia Inês Portela, 1963-

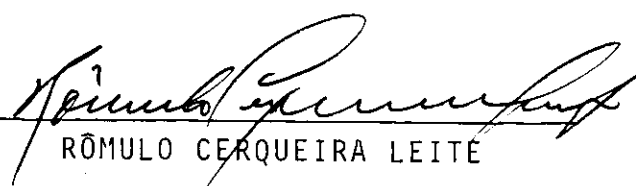
Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra o parvovírus suíno com uma vacina inativada experimental e pelo método "feed back" (Retroinfecção)/ Zélia Inês Portela Lobato. - Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1990.

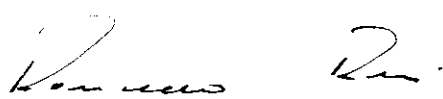
90p. : il.-

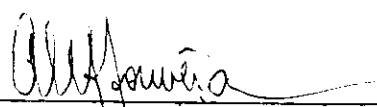
Tese (Mestrado)

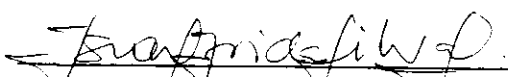
1. Parvovirose-Vacina. 2. Suínos Doenças. I. Título.

Aprovada em: 12/02/90


RÔMULO CERQUEIRA LEITE
Orientador


RONALDO REIS


AURORA MARIA GUIMARÃES GOUVEIA


ISRAEL JOSÉ DA SILVA

Aos meus pais, Odilon e Benita e à
minha avô Zélia, pelo exemplo de tra-
balho, honestidade e perseverança.

Ao meu marido Herman, com quem divi-
di todas as dificuldades deste tra-
balho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ronaldo Reis, pela importante participação e direcionamento deste trabalho.

À AGROCERES-PIC, pela inestimável ajuda prestada, especialmente na pessoa dos colegas José Henrique Piva, Mário Sérgio Nogueira e Raul Guimarães.

Aos meus colegas Chico, Roberto, Sérgio, Andrey, Márcio, Gilmar, Hamilton e Arthur, pelo constante apoio e amizade.

A Herman Sander Mansur pela elaboração dos gráficos.
A Carlos Alberto de Oliveira pela colaboração e boa vontade.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Doris, Ailton, Nádia, Agostinho, Creuza, João Tião, Olívia, Luís André, Toninho, Marília, Sandra e Beth.

Ao Prof. Ivan Barbosa Machado Sampaio pela ajuda na estatística.

Ao Prof. Ernane Fagundes do Nascimento pela ajuda prestada.

À Profª Aurora Maria Guimarães Gouveia pela iniciação científica.

Aos funcionários da biblioteca, setor de transporte e clínica, pela ajuda prestada.

Ao Prof. José Sérgio Resende pelo constante estímulo.

10.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

Ao Moura pelo serviço de datilografia.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e à Escola de Veterinária da UFMG.



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Rômulo Cerqueira Leite, mestre, amigo e exemplo de dedicação à Medicina Veterinária.

Às minhas colegas Isabella e Tetê pelo carinho e amizade que me dedicaram nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Às minhas irmãs Fafã, Mausa e Dinha que muito torceram pelo bom andamento deste trabalho.

RESUMO

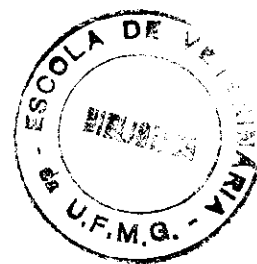
Foi desenvolvida e testada uma vacina inativada contra o parvovírus suíno. Dos 106 suínos vacinados e revacinados com a vacina experimental, com intervalos de 15 ou 21 dias, 88,68% apresentaram resposta sorológica, 15 dias após a última vacinação. Os títulos de anticorpos inibidores da hemoaglutinação induzidos pela vacina, variaram de 1:40 a 1:1280, sendo que o mais frequentemente observado (38,67% dos animais) foi de 1:80. Foi também pesquisada a eficiência da "retroinfecção" (RI) como medida de prevenção contra a parvovirose suína, através do acompanhamento sorológico de leitões pertencentes a uma granja convencional, onde este método de imunização era rotineiramente utilizado. Os resultados obtidos, 15 dias após o término da RI, demonstraram que 83,01% das leitões testadas não apresentaram soroconversão e evidenciaram que este método é pouco confiável quando não se avalia o status sorológico dos animais imunizados. A análise do perfil sorológico e da performance reprodutiva do plantel confirmaram baixa eficiência da RI nesta granja. Baseado nestas análises foi feita uma alteração na técnica inicialmente utilizada para a RI e um novo grupo de leitões foi imunizado e acompanhado sorologicamente, apresentando, 15 dias após o término da RI, 100% dos animais sorologicamente positivos para o parvovírus suíno e uma taxa de soroconversão de 90,47% da primeira para última sorologia.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Multiplicação do parvovírus suíno (PVS).....	04
2.2. Provas de hemoaglutinação e inibição da hemoaglu tinação.....	05
2.3. Vacinas.....	06
2.4. Retroinfecção (RI).....	10
2.5. Modelos epidemiológicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Vacina.....	13
3.1.1. Amostra do vírus.....	13
3.1.2. Produção da semente.....	13
3.1.3. Cultivo de células.....	14
3.1.3.1. Meio de cultura.....	14
3.1.3.2. Cultivo primário.....	14
3.1.4. Infecção das células.....	15
3.1.5. Obtenção da suspensão viral.....	15
3.1.6. Preparo da vacina.....	16
3.1.7. Teste de hemoaglutinação (HA).....	16
3.1.8. Teste de inibição da hemoaglutinação (IH)	16

	Página
3.1.9. Testes de imunofluorescência direta (FB)	17
3.1.9.1. Preparo do conjugado.....	17
3.1.9.2. Inoculação das lamínulas.....	18
3.1.9.3. Leitura e cálculo do título infeccioso.....	18
3.1.10. Testes de controle da vacina.....	19
3.1.10.1. Esterilidade.....	19
3.1.10.2. Inocuidade.....	19
3.1.10.3. Inativação.....	19
3.1.10.4. Imunogenicidade.....	19
3.1.10.4.1. Cobaias.....	20
3.1.10.4.2. Suínos.....	20
3.1.11. Partidas produzidas.....	20
3.1.11.1. Partida 1 (P_1).....	20
3.1.11.2. Partida 2 (P_2).....	22
3.1.11.3. Partida 3 (P_3).....	22
3.1.11.4. Partida 4 (P_4).....	22
3.1.12. Análise estatística.....	23
3.2. Retroinfecção (RI).....	23
3.2.1. Animais.....	23
3.2.2. Granja B.....	24
3.2.3. Técnica utilizada para execução da RI....	24
3.2.3.1. Grupos RIG1 e RIG2.....	24
3.2.3.2. Grupo RIG3.....	25
3.2.3.3. Grupo RIG4.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Vacina.....	27
4.1.1. Produção da semente e obtenção da suspensão viral.....	27

	Página
4.1.2. Cultivo celular.....	29
4.1.3. Infecção das células.....	31
4.1.4. Preparo da vacina.....	31
4.1.5. Teste de IFD.....	32
4.1.6. Teste de IH.....	32
4.1.7. Testes de controle da vacina.....	33
4.1.7.1. Inocuidade.....	35
4.1.7.2. Imunogenicidade.....	35
4.1.7.2.1. Cobaias.....	35
4.1.7.2.2. Suínos.....	36
4.2. "Retroinfecção" (RI).....	43
4.2.1. Grupos RIG1 e RIG2.....	43
4.2.2. Grupo RIG3.....	44
4.2.3. Grupo RIG4.....	44
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84



LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA I - Títulos inibidores da hemoaglutinação, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias em cobaias vacinadas e revacinadas com a partida 1, com intervalo de 21 dias (grupo P_1).....	56
TABELA II - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em leitoas vacinadas e revacinadas com a partida 2, com intervalo de 21 dias (grupo P_2).....	57
TABELA III - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias em leitoas vacinadas e revacinadas com a partida 3, com intervalo de 15 dias (grupo $P_3 G_1$).....	58
TABELA IV - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias em porcas vacinadas e revacinadas com a partida 3, com intervalo de 21 dias (grupo $P_3 G_2$).....	59

TABELA	V	- Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em leitoas vacinadas e revacinadas com a partida 4, com intervalo de 15 dias (grupo P ₄ G ₁).....	60
TABELA	VI	- Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em leitoas vacinadas e revacinadas com a partida 4, com intervalo de 21 dias (grupo P ₄ G ₂).....	61
TABELA	VII	- Médias dos títulos inibidores da hemoaglutinação obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias dos grupos P ₂ , P ₃ G ₁ , P ₃ G ₂ , P ₄ G ₁ e P ₄ G ₂	62
TABELA	VIII	- Porcentagem de resposta e títulos inibidores da hemoaglutinação obtidos aos 15 dias após a última vacinação, nos vários grupos e no total dos animais vacinados com as diferentes partidas da vacina experimental..	63
TABELA	IX	- Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação verificados na segunda e terceira sorologias e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG1.....	64
TABELA	X	- Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação verificados na primeira, segunda e terceira sorologia e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG2.....	65
TABELA	XI	- Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação, verificados na primeira, segun	

	sorologias e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observadas nos animais do grupo RIG3.....	65
TABELA XII	- Frequência dos títulos inibidores da hemaglutinação, verificados na primeira, segunda e terceira sorologias e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG4.....	67
TABELA XIII	- Performance reprodutiva de animais do primeiro ao quarto parto, sangrados para a elaboração do perfil sorológico da granja B	68

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 1 - Distribuição dos animais do grupo P_2 , segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).....	69
GRÁFICO 2 - Médias dos títulos de anticorpos obtidos pelos animais do grupo P_2 e do grupo controle no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda vacinação (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).....	70
GRÁFICO 3 - Distribuição dos animais do grupo P_3G_1 , segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).....	71
GRÁFICO 4 - Médias dos títulos de anticorpos obtidas pelos animais do grupo P_3G_1 , e do grupo controle no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).	72

- GRÁFICO 5 - Distribuição dos animais do grupo P_3G_2 , segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia). 73
- GRÁFICO 6 - Médias dos títulos de anticorpos obtidos pelos animais do grupo P_3G_2 e do grupo controle, no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia)..... 74
- GRÁFICO 7 - Distribuição dos animais do grupo P_4G_1 , segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia). 75
- GRÁFICO 8 - Distribuição dos animais do grupo P_4G_2 , segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia) 76
- GRÁFICO 9 - Média dos títulos de anticorpos obtidas pelos animais dos grupos P_4G_1 , P_4G_2 e grupo controle, no dia da primeira vacinação (sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia)..... 77
- GRÁFICO 10 - Distribuição dos títulos de anticorpos encontrados quinze dias após a última vacinação, nos 106 suínos pertencentes aos grupos P_2 , P_3G_1 , P_3G_2 , P_4G_1 e P_4G_2 78

GRÁFICO 11 - Porcentagem de animais do grupo RIG2 sorologicamente positivos para o parvovírus suíno no dia do início (1ª sorologia), no dia do término (2ª sorologia) e quinze dias após o término da retroinfecção (3ª sorologia).....	79
GRÁFICO 12 - Distribuição dos títulos de anticorpos encontrados quinze dias após o término da reinfecção (3ª sorologia) dos grupos RIG1 e RIG2	80
GRÁFICO 13 - Porcentagem de animais do grupo FBG3, sorologicamente positivos para o parvovírus suíno no dia do início (1ª sorologia), no dia do término (2ª sorologia) e quinze dias após o término da retroinfecção (3ª sorologia).....	81
GRÁFICO 14 - Porcentagem de animais do grupo RIG4, sorologicamente positivos para o parvovírus suíno no dia do início (1ª sorologia), no dia do término (2ª sorologia) e quinze dias após o término da retroinfecção (3ª sorologia).....	82
GRÁFICO 15 - Perfil sorológico da granja B, representado pela distribuição dos títulos de anticorpos segundo o número do parto (P) das fêmeas do plantel.....	83

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Comparação de alguns detalhes da técnica de inibição da hemoaglutinação, descritos por diferentes autores.....	7
QUADRO 2 - Detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra o PVS e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas.....	12
QUADRO 3 - Composição dos grupos de animais inoculados com as diferentes partidas da vacina experimental	21
QUADRO 4 - Volume, título hemoaglutinante e infeccioso e grupos testados com as diferentes partidas produzida.....	34
QUADRO 5 - Índices alvo e limites de interferência de alguns itens da performance reprodutiva de leitões e porcas.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os problemas de reprodução assumem importância econômica prioritária em rebanhos comerciais, em confinamento estrito e que praticam um programa regular de melhoramento genético, baseado essencialmente numa substituição dinâmica das matrizes mais velhas, com leitoas. Estas características da suinocultura industrial moderna, praticada hoje em todo o mundo, criam condições epidemiológicas favoráveis à manutenção e expressão clínica de alguns vírus que causam problemas reprodutivos em suínos.

Dentre estes, o PVS, denominado "o agente chave dos problemas de reprodução em suínos", (VANNIER & TILLON, 1979) provoca uma infecção que se caracteriza por morte embrionária e fetal e suas conseqüências, como leitegadas pequenas em número, repetição do cio com intervalos maiores de 21 dias, mumificação fetal, natimortalidade, aborto, anestro e gestações prolongadas. Vários trabalhos têm demonstrado claramente eficiência reprodutiva melhor nos animais sem a infecção do que em animais infectados pelo PVS. Todos os índices avaliados como: total de leitões nascidos/parto, total nascidos vivos/parto, natimortos, número de partos com menos de seis leitões vivos, número de partos com mumificação e número de mumificados por parto, têm sido significativamente melhores em animais sem parvovirose (MENGELING, 1986).

O PVS está amplamente distribuído entre os suínos das várias regiões do mundo, sendo enzoótico na maioria dos rebanhos testados em todos os países estudados (MENGELING, 1986).

Na América Latina o primeiro trabalho relacionado ao PVS foi realizado por GOUVEIA (1982), que encontrou um índice médio de 55,3% de animais sorologicamente reagentes distribuídos em todos os rebanhos testados. A frequência de alterações reprodutivas foi inversamente proporcional ao número de partos: 1º = 43,8%; 2º = 34,4%; 3º = 15,2% e 4º = 6,2% e consequentemente o número de leitões nascidos vivos por leitegada foi diretamente proporcional ao número de partos: 1º = 6,3; 2º = 8,6 3º = 10,0. As leitoas entre 151 - 300 dias de idade se mostraram mais susceptíveis à infecção indicando título de anticorpos não detectáveis à idade da primeira cobertura.

MARTINS et alii (1984) estudando animais pertencentes à granjas dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, encontraram cerca de 80% dos animais sorologicamente reagentes.

A prevenção desta doença tem sido feita através da vacinação ou do método de "feed back", objetivando a imunização de todas as leitoas de rebanhos infectados, antes da primeira cobertura. Em vários países os pesquisadores têm estudado a produção e eficiência de diferentes vacinas contra a parvovirose suína (MENGELING et alii, 1979, 1981; WRATHALL et alii, 1984, 1988).

Segundo HEARD & Mc DOUGALL (1986), o termo "feed back" significa, basicamente, a administração de algum produto proveniente de suínos, dado novamente a estes ou a outros do rebanho (retroalimentação), com objetivo de "infectar" estes animais e estimular a imunidade para alguma doença específica. Geralmente, no caso da parvovirose suína, o material empregado para este propósito pode incluir fezes, restos placentários e membranas fetais, fetos mumificados e natimortos. O "feed back" é citado por muitos autores como medida rotineiramente utilizada nas granjas (ROBSON et alii, 1985; WRATHALL,

1988), porém não se conhece sua real eficiência como medida preventiva contra a parvovirose suína. Baseados na sua definição traduzimos a expressão "feed back" como retroinfecção, termo que passaremos a adotar daqui por diante.

No Brasil poucas granjas adotam a vacinação como medida preventiva e a imunização pelo método da "retroinfecção", vem se tornando cada vez mais popular, embora, sem nenhuma a-valiação de sua eficiência.

A necessidade de se estudar uma tecnologia nacional para o produção da vacina contra a parvovirose suína e de se obter maiores informações a respeito das medidas preventivas utilizadas contra esta doença, motivaram a realização deste trabalho que teve os seguintes objetivos:

- 1) desenvolver uma vacina inativada contra o parvovírus suíno;
- 2) acompanhar a seqüência dos títulos de anticorpos induzidos por esta vacina;
- 3) comparar a eficiência de dois esquemas de imunização, utilizando a vacina produzida;
- 4) avaliar sorologicamente a eficiência da "retroinfeccão", empregado como medida de imunização contra o parvovírus em uma granja convencional.



2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Multiplicação do parvovírus suíno (PVS)

CARTWRIGHT & HUCK (1967) isolaram o PVS de cultivo primário de rim de suínos jovens, obtidos de um plantel onde a infecção pelo vírus havia sido demonstrada sorologicamente.

LUCAS & NAPHTHINE (1971) prepararam um conjugado, testaram a sua especificidade e utilizaram para demonstração do PVS em cultivo de células e tecidos experimentalmente infectado com o vírus.

PIRTLE (1974) testou a susceptibilidade de uma amostra isolada do trato respiratório superior de suínos, para 15 culturas celulares derivadas de sete espécies de mamíferos. As células derivadas de suínos foram as mais susceptíveis para o vírus, sendo que os melhores títulos infecciosos foram obtidos em células de glândula tireóide de suínos adultos e de rim embrionário.

MENGELING (1975) investigando a presença do PVS nos lotes de cultivos primários de rim suíno, semanalmente preparados e fornecidos pelo National Animal Disease Center, verificou que 6,1% deles estavam contaminados com o vírus.

BACHMANN & DANNER (1976) observaram que a replicação do PVS em células SK-6, ocorreu à temperatura de 28°C, 33°C e 37°C, apresentando títulos hemoaglutinantes e infecciosos má

ximos, a 37^oC. A replicação a 40^oC resultou na formação de partículas incompletas.

RHODE III (1978) estudou partículas defectivas do parvovírus H-1 e observou que estas partículas possuíam alterações no genoma e interferiam com a síntese das proteínas do capsídeo e com a infecciosidade do vírus padrão H-1 (não deficiente).

MENGELING & PAUL (1986) demonstraram que o PVS foi transmitido por contato direto entre suínos experimentalmente infectados e suínos susceptíveis por até duas semanas após o dia da inoculação. Por outro lado os autores encontraram que o PVS permaneceu infeccioso por pelo menos 14 semanas nas baias previamente ocupadas pelos animais infectados.

CHOI et alii (1987) estudaram a influência de partículas vazias do PVS na replicação viral em cultivo celular ("in vitro") e em suínos ("in vivo"). "In vitro", a produção de vírus intra ou extracelular foi marcadamente inibida pela presença de partículas vazias, proporcionalmente à sua concentração presente na mistura. Fetos de leitões gestantes inoculadas com suspensões contendo altos níveis de partículas vazias, não apresentaram nenhuma lesão aparente.

2.2. Provas de hemoaglutinação e inibição da hemoaglutinação

MENGELING (1972) pesquisou as características bioquímicas de um vírus isolado de células nasais de suínos, classificado como PVS, estudando propriedades de hemoaglutinação, imunofluorescência, filtração, sensibilidade a solventes lipídicos e tipo de ácido nucléico.

HI (1974) cita os resultados de uma pesquisa sobre produção de hemoaglutinina em células infectadas com o PVS, propriedades físico-químicas destas aglutininas, condições ótimas e fatores relacionados com as provas de hemoaglutinação e inibição da hemoaglutinação para o PVS.

JOO et alii (1976) pesquisaram a presença de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS em várias espécies testando animais não inoculados (coelho, bovinos, suínos, cobaias, camundongos, cavalo, cão, gato, etc) e encontraram 100% das cobaias com títulos positivos sendo que dos 34 testados 16 (47,05%) apresentavam títulos IH entre 1:16 e 1:64, 17 (50%) entre 1:128 e 1:512 e 1 (1,94%) título 1:1024. Os autores comentam que estes títulos não estão relacionados com inibidores inespecíficos da hemoaglutinação, mas são provavelmente, consequência de infecção natural por parvovírus heterólogos.

O QUADRO 1 mostra, comparativamente, alguns detalhes da técnica de inibição da hemoaglutinação, descritas por diferentes autores.

2.3. Vacinas

PAUL et alii (1980), trabalhando com animais não gestantes, encontraram uma correlação entre títulos inibidores da hemoaglutinação induzido pela vacina e proteção contra replicação do vírus em alguns órgãos. O autor comenta que provavelmente esta replicação se dá nos sítios de exposições infectados durante o desafio, já que não foi observada viremia em nenhum destes animais. Como viremia é considerada pré-requisito essencial para transmissão transplacentária, se gestantes, estes animais não teriam sinais clínicos ao desafio.

SORENSEN & ASKAA (1981) testaram uma vacina inativa da em sete leitoas, que receberam duas doses da vacina com intervalo de três semanas. No dia da segunda vacinação os títulos de anticorpos variaram de 1:64 a 1:128 e duas semanas após a última vacinação, de 1:128 a 1:1024. Estes animais, quando desafiados, não apresentaram sintomas que indicasse infecção transplacentária, ao contrário do que ocorreu no grupo controle, não vacinado.

DOUGLAS (1984) discute as medidas de prevenção pa-

QUADRO 1 - Comparação de alguns detalhes da técnica de inibição da hemaglutinação, descritos por diferentes autores

Autor	Tratamento do soro com caolim	Tratamento do soro com hemácia de cobaia/metodologia	Diluição final do soro pós tratamento	Concentração da suspensão de hemácia usada no teste	Tempo de incubação soro/virus	Tempo de condições para leitura das placas	Títulos considerados positivos
1	-	+/1 noite à 4°C	NE*	1,0%	1 hora TA**	NE	≥ 1:16
2	+	+/30 minutos à TA	1:2,5	0,5%	30 minutos à TA	NE	≥ 1:5
3	+	+/30 minutos à TA	1:10	0,5%	30 minutos à TA	2-3 horas à TA	≥ 1:20
4	+	+/1 noite à 4°C	1:10	0,55%	30 minutos à TA	1 noite à 4°C	≥ 1:10
5	+	+/30 minutos à TA	1:5	0,5%	30 minutos à TA	2 horas TA	≥ 1:10
6	+	+/30 minutos à TA	1:2,5	1,0%	1 hora à 4°C	2 horas a 4°C	≥ 1:80
7	+	+/NE	1:4	0,75%	45 minutos à TA	2-4 horas à TA	NE
8	+	+/1 noite à 4°C	1:10	25 x 10 ⁶ células/ml	1 hora a TA	1 noite a 4°C	≥ 1:400
9	-	+/1 noite à 4°C	1:10	1,0%	NE	1 noite à 4°C	≥ 1:10
10	+	+/NE	NE	NE	1,5 horas à 4°C	1,5 horas à TA	NE
11	+	+/30 minutos à TA	1:10	25 x 10 ⁶ células/ml	1 hora à TA	1 noite à 4°C	≥ 1:320
12	-	+/NE	NE	0,5%	1 hora à TA	1 noite à 4°C	≥ 1:16

* NE = Não especificado.

** TA = Temperatura ambiente.

1 = HARKNESS et alii (1971)

2 = ENGELING (1972)

3 = REDMAN et alii (1974)

4 = RUCKERBAUER et alii (1978)

5 = TIMBOL (1980)

6 = GOUVEIA (1982)

7 = LEENGOED et alii (1983)

8 = VANNIER et alii (1984)

9 = ROBSON et alii (1985)

10 = EDWARDS et alii (1986)

11 = VANNIER et alii (1986)

12 = VALENCIAK et alii (1986)

ra parvovirose suína e outras doenças importantes dentro da suí-
nocultura.

JOO et alii (1984) inoculando cobaias com vacinas inativadas preparadas a partir de suspensões virais de diferen-
tes títulos hemoaglutinantes (1:4 a 1:256/0,1 ml), diferentes
concentrações de hidróxido de alumínio gel (20 a 50%) e dife-
rentes intervalos entre as vacinações (duas, três ou quatro se-
manas), encontraram melhores resultados com vacinas que conti-
nham suspensão viral de 1:256/0,1 ml, 50% de hidróxido de alu-
mínio gel e aplicados com intervalo de três ou quatro semanas.

MOLITOR et alii (1984/85) compararam, em cobaias a
habilidade de 14 diferentes adjuvantes, administrados sozinhos
ou com outros compostos, na potencialização da resposta imune
humoral para o PVS, após duas vacinações, dadas com intervalo de
três semanas. Cinco semanas pós última vacinação, as melhores
respostas foram obtidas com o uso de DDA (dimethyl-dioctadicyl
ammonium bromide), EMA (ethylene maleic anhydride), O/W (emul-
são óleo/água) e hidróxido de alumínio gel 50%.

FLORENT et alii (1986) testaram a imunogenicidade
de uma vacina oleosa bivalente para a parvovirose suína e do-
ença de Aujeszky em nove leitões soronegativos. Os títulos de
anticorpos anti PVS variaram de 1:64 a 1:1024 e todos estes a-
nimaís, quando desafiados, não apresentaram sinais clínicos da
doença.

PARSONS et alii (1986) propuseram um modelo teórico
para avaliar os benefícios econômicos de um programa de vaci-
nação contra parvovirose suína em rabinhos dos Estados Unidos.
Suas análises indicaram que o programa traria ganhos econômi-
cos mesmo com o custo da vacinação calculado em nove dólares
por cabeça.

THACKER et alii (1986) acompanharam a resposta so-
rológica induzida por sete vacinas comerciais inativadas, em
grupos de seis leitões soronegativos. Os títulos hemoaglutinan-
tes destas vacinas variaram de 1:8 a 1:156/0,05 ml e o título
inibidor da hemoaglutinação induzido pelas vacinas cinco sema-

nas ap \tilde{o} s a vacina \tilde{c} o variou de $< 1:8$ a $1:128$, sendo que tr \tilde{e} s vacinas n \tilde{a} o induziram nenhuma resposta imune.

BENGELSOORFF (1987) comparando os t \tilde{t} ulos de anticorpos em su \tilde{i} nos e cobaias ap \tilde{o} s inocula \tilde{c} o de duas doses de uma vacina inativada contra o PVS, aplicada com o intervalo de tr \tilde{e} s semanas, mostrou que as cobaias responderam com diferentes t \tilde{t} ulos a diferentes quantidades de ant \tilde{i} geno e apresentaram boa resposta \tilde{a} primeira e \tilde{a} segunda vacina \tilde{c} o. Diante destes resul \tilde{t} ados o autor afirma que a cobaia \tilde{e} um animal eficiente para es \tilde{t} abelecer o valor de vacinas inativadas anti PVS.

EINARSON et alii (1987), estudando o status sorol \tilde{o} gico e a performance reprodutiva em quatro rebanhos vacinados e revacinados com uma vacina comercial contra o PVS com intervalo de tr \tilde{e} s a quatro semanas, observaram, antes da primeira va \tilde{c} ina \tilde{c} o, uma grande varia \tilde{c} o no n \tilde{u} mero de animais positivos e nos n \tilde{i} veis dos t \tilde{t} ulos de anticorpos anti PVS nos diferentes rebanhos, indicando diferente distribu \tilde{c} o do v \tilde{i} rus nestes plan \tilde{t} ais. Os animais vacinados apresentaram performance reprodutiva dentro dos limites especificados. Por \tilde{e} m muitos dos \tilde{i} ndices reprodutivos obtidos n \tilde{a} o foram comparados com animais n \tilde{a} o vacinados, n \tilde{a} o ficando claro se houve ou n \tilde{a} o vantagem econ \tilde{o} mica do uso da vacina. Mesmo assim, baseados no fato de que em rebanhos infectados muitas leitoas testadas eram soronegativas na \tilde{e} poca da primeira cobri \tilde{c} o, os autores recomendam a vacina \tilde{c} o de todas as leitoas antes da primeira cobri \tilde{c} o.

JERABEK et alii (1987) estudaram a resposta de coelhos, cobaias, ratos de laborat \tilde{o} rio e camundongos a uma vacina comercial inativada contra o PVS, administrada em duas doses intervaladas de 28 dias. A melhor e mais uniforme resposta imune foi obtida em ratos de laborat \tilde{o} rio, seguido das cobaias, cujos t \tilde{t} ulos inibidores da hemoaglutina \tilde{c} o, obtidos ap \tilde{o} s duas vacina \tilde{c} o \tilde{e} s, foram de $1:256$ a $1:2048$ e $1:16$ a $1:1024$, respectivamente. T \tilde{t} ulos baixos, com grande varia \tilde{c} o individual, foram encontrados em camundongos e coelhos: $1:16$ a $1:32$ e $1:8$ a $1:128$, respectivamente.

WRATHALL (1988) após avaliar o custo efetivo da utilização de uma vacina inativada em 1243 animais, pertencentes a 12 rebanhos da Inglaterra, durante o período de dois anos, concluiu que como os rebanhos variam em relação à presença ou ausência do PVS e distribuição da infecção, a vacinação deve ser usada com discriminação para que se obtenha um custo efetivo mais alto com a sua aplicação.

O QUADRO 2 mostra alguns detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra o PVS e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas.

2.4. "Retroinfecção" (RI)

ROBISON et alii (1985) fazendo um levantamento sorológico para determinar a prevalência do PVS em rebanhos de matrizes na Inglaterra, trabalharam com granjas onde a RI era adotado. De todos os rebanhos que continham simultaneamente animais positivos e negativos, 60% estavam praticando a RI, o que chama atenção dos autores para o fato de que este procedimento não resulta, necessariamente, em uma imunidade uniforme e consistente.

LEENGOED & LEEUW (1986) citam o caso de um surto de parvovirose suína em uma granja onde a RI era utilizado como medida preventiva contra esta doença.

HEARD & Mc DOUGALL (1986) comentam a metodologia e as principais enfermidades, para as quais a RI é empregado como medida de controle. Os autores discutem as limitações deste processo e citam as precauções que os proprietários das granjas devem tomar, caso optem pela sua utilização.

2.5. Modelos epidemiológicos

VANNIER et alii (1984) estudaram fatores epidemiológicos relacionados com a distribuição do parvovírus suíno dentro de diferentes plantéis, na tentativa de entender as razões

QUADRO 2 - Detalhes das técnicas empregadas por vários autores para produção de vacinas contra o PVS e os resultados obtidos com a utilização destas vacinas

Autor (a) utilizada	Célula	Adjuvante	Inativante	Título infeccioso antes de inativar	Título hemaglutinante	Dose vacinal	Nº de vacinações intervalo entre vacinações	Número de animais vacinados	Títulos de anticorpos encontrados 15 dias após última vacinação	Média dos títulos de anticorpos no desafio	Proteção no desafio
1 NE ^b	RFS ^c	Oleoso	Acetiletiletimina	NE	1:128/2 ml	2 ml	2/19 dias	4	1:1000 - 1:2750	1:1927/+	
2 CVL 1243	Fetos suínos	Oleoso	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	1:8192/0,2 ml	2 ml	2/14 dias	3	1:5120 - 1:20480	1:41813/+	
CVL 1243	Fetos suínos	Oleoso	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	1:8192/0,2 ml	2 ml	1	3	1:2560 - 1:51120	1:35840/+	
3 CVL 1243	PK1-LLC	Oleoso	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /ml	NE	1,6 ml	1	7	NE	1:97/+	
CVL 1243	Fetos suínos	Oleoso	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /ml	NE	1,6 ml	1	11	NE	1:1176/+	
NE	NE	HAG	Acetiletiletimina	-	NE	1,6 ml	1	12	NE	1:10,55/+	
4 MADL-2	RFS	HAG ^d	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	1:1024/0,2 ml	5 ml	2/14 dias	2	1:40 - 1:80	1:15/+	
MADL-?	RFS	HAG	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	1:1024/0,2 ml	5 ml	1	4	1:20 - 1:80	1:22,5/+	
5 PV-9	RFS	HAG	B-propilactona	NE	1:256/0,2 ml	2 ml	1	2	1:256	-	
PV-9	RFS	HAG	Formalina	NE	1:256/0,2 ml	2 ml	1	2	1:128	-	
6 893/76	PK-15	HAG	Formalina	NE	1:512/0,05 ml	2 ml	2/21 dias	3	1:160 - 1:640	1:80 - 1:320/+	
893/76	PK-15	HAG	Formalina	NE	1:2048/0,05ml	2 ml	2/21 dias	3	1:640	-	
7 MADL-2	RFS	HAG	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	1:1024/0,2 ml	4 ml	2/14 dias	8	1:160 - 1:640	1:134/+	
8 MADL-2	RFS	HAG	Acetiletiletimina	10 ^{7,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	1:512/0,2 ml	5 ml	2/14 dias	5	1:80 - 1:640	1:272/+	
9 90 HS	ESK	NE	Formalina	10 ^{5,2} DICC ₅₀ /0,2 ml	-	10 ml	2/7 dias	1	NE	1:640/+	
10 MADL-2	RFS	VVM ^e	VVM	10 ^{6,0} DICC ₅₀ /ml	1:64/0,5 ml	1 ml	1	5	1:320 - 1:1280	1:640/+	
11 HT	ESK	VVM	VVM	10 ^{4,0} DICC ₅₀ /ml	-	2 ml	1	1	NE	1:320/+	
						10 ml	1	1	NE	1:1280/+	

a = Autores

1 = VANNIER et alii (1986)

2 = WRATHALL et alii (1984)

3 = EDWARDS et alii (1986)

4 = MENGELING et alii (1979)

5 = JOO & JOHNSON (1977)

b = NE = informação não especificada no trabalho consultado.

c = RFS = rim fetal suíno.

d = HAG = hidróxido de alumínio gel.

6 = RIVERA et alii (1986)

7 = MENGELING et alii (1981)

8 = PAUL et alii (1980)

9 = FUJISAKI & MURAKAMI (1982)

10 = PAUL et alii (1980)

11 = FUJISAKI & MURAKAMI (1982)

e = VVM = vacina viva modificada.

f = DICC = dose infectante em cultivo celular.



para o aparecimento repentino de desordens reprodutivas nas granjas. Os autores concluíram que existiam duas epizootiologias diferentes nos rebanhos estudados sendo que em um deles o vírus não se espalhava entre a população da granja e no outro o vírus se disseminava permanentemente no plantel.

PERESTRELO (1987) descreve as alterações reprodutivas causadas pelo parvovírus suíno, vias de transmissão, diagnóstico e profilaxia da doença. As diferentes situações epidemiológicas encontradas em relação ao vírus nas diferentes granjas são citadas e a importância do seu conhecimento, a partir do estabelecimento do perfil sorológico de cada granja, para a adoção das medidas de profilaxia mais eficazes, são discutidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Vacina

3.1.1. Amostra do vírus

Foi utilizada a amostra NADL-2 do PVS, gentilmente cedida pela Universidade da Califórnia Davis (USA).

3.1.2. Produção da semente

Inicialmente, o vírus foi passado três vezes em cultivo primário de rim suíno e a partir daí, purificado por diluição em ponto final por mais três passagens. Em cada passagem, as células foram inoculadas com 0,2 ml de diferentes diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}) e crescidas em tubos de Leighton com lamínulas como descrito em 3.1.9.2., e após o período de incubação necessário, examinadas pela imunofluorescência direta (IFD), como descrita no item 3.1.9., para determinação da última diluição onde havia partículas infecciosas.

A semente purificada foi cultivada por mais duas vezes em rim suíno, quando foi então obtida a semente de trabalho.

3.1.3. Cultivo de células

Foi utilizado cultivo primário e secundário de rim suíno. Devido à dificuldade de obtenção de fetos suínos utilizou-se como doadores dos rins, leitões recém-nascidos, que não receberam o colostro ou provenientes de rebanho negativo para parvovirose suína, com no máximo dois dias de idade.

3.1.3.1. Meio de cultura

As células cresceram em meio 199* com 200 UI de penicilina G potássica,** 200 µg de sulfato de estreptomicina e 5 µg de anfotericina B.*** Os meios de crescimento e de manutenção possuíam, respectivamente, 10 e 2% de soro fetal bovino (SFB).****

3.1.3.2. Cultivo primário de rim suíno (RBS)

Após ser colhida uma amostra de sangue, os leitões foram sacrificados por choque elétrico e os rins imediatamente retirados e acondicionados em meio de cultura com o dobro da quantidade de antibiótico utilizada normalmente. Após a eliminação da cápsula, a córtex foi separada da medula, lavada várias vezes com solução de salina tampão fosfato (PBS), pH 7,2, cortada em pedaços de dois a três mm, os quais foram novamente lavados em PBS por mais 10-20 vezes. Tripsina Versene (STV) 0,2%, no volume 10 vezes superior ao do tecido fragmentado foi acrescentado e deixado sob agitação à 37°C por 15 a 20 minutos.

Após um período de cinco a 10 minutos para decantação das células não tripsinizadas, o sobrenadante foi filtrado

* DIFCO Laboratories - Detroit, Michigan (USA).

** FONTOURA-WYETH - São Bernardo do Campo (Brasil).

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

**** MICROBIOLOGIGA - Rio de Janeiro (Brasil).

em bequer com gase contendo SFB numa concentração final de 5% e mantido a 4°C. Um novo volume de STV foi acrescentado aos fragmentos dos rins e este procedimento foi repetido por seis a sete vezes, até que a maioria das células já estivessem tripsinizadas. Após centrifugação a 800 g por 15 minutos, as células foram suspensas em pequena quantidade de meio, contadas e diluídas em meio com 10% de SFB para uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células/ml. Após distribuição nas garrafas, a cultura foi mantida em repouso por 48 horas em estufa 37°C, quando o meio de cultura foi trocado por novo meio de crescimento.

Controle destas culturas acompanharam paralelamente as células inoculadas. A cada tripsinização, garrafas não inoculadas eram congeladas e descongeladas três vezes e o sobrenadante testado pela prova de hemoaglutinação (HA) para o PVS e reinoculado em novos cultivos. Após três passagens consecutivas, lamínulas com as culturas foram examinadas pela IFD.

Culturas não inoculadas foram observadas por sete a 10 dias para aparecimento de efeito citopático.

O soro sanguíneo obtido dos leitões doadores dos rins, foi submetido à prova de inibição da hemoaglutinação (IH) para possível detecção de anticorpos anti PVS.

3.1.4. Infecção das células

Monocamadas confluentes do cultivo primário de rim suíno foram tripsinizadas e suspensas em meio com 7% de SFB na concentração de 5×10^5 células/ml. As células foram distribuídas em garrafas Roux e imediatamente inoculadas com 5 ml da semente (produzida como descrito em 2.2.2.), diluída a 1:10. As culturas inoculadas foram deixadas em repouso por 72-96 horas quando foram congeladas e descongeladas três vezes.

3.1.5. Obtenção da suspensão viral

De cada garrafa inoculada foi retirada uma amostra

para teste de HA, segundo ítem 2.1.7. e selecionadas as que possuíam títulos 1:256/0,05 ml. Foi feito um pool das suspensões destas garrafas e o título novamente conferido pela HA (JOO & JONHSON, 1977).

3.1.6. Preparo da vacina

A suspensão viral foi clarificada por centrifugação a 3000 g por 15 minutos. Adicionou-se β -propiolactona na concentração final de 0,2% e a suspensão foi mantida sob agitação a 37°C por duas horas e por mais quatro horas a 25°C, sendo o pH ajustado para 7,2 com K_2HPO_4 1 M, sempre que necessário (JOO et alii, 1977). Amostras foram colhidas antes e após a inativação para testes de infecciosidade e atividade hemoaglutinante. Após a inativação a suspensão foi dializada em salina 0,85% por 24 horas.

Hidróxido de alumínio gel (3,0% de óxido de alumínio), numa concentração final de 40% foi acrescentado e deixado sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas (MOLITOR et alii, 1984-85). Uma amostra da mistura foi colhida, centrifugada a 1000 g/10 minutos, a proporção do adjuvante conferida e o sobrenadante testado pela HA para verificar o índice de adsorção do vírus.

Numa última etapa, o pH foi conferido e quando necessário ajustado para 7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5% e acrescentado timerosal, na concentração final de 1:20.000.

3.1.7. Teste de hemoaglutinação (HA)

O título das hemoaglutininas virais foi determinado pela prova de HA em microtítulo, segundo GOUVEIA (1982).

3.1.8. Teste de inibição da hemoaglutinação (IH)

Todos os soros submetidos à prova de IH foram tra-

tados como descrito por GOUVEIA (1982).

Os soros foram inativados pelo calor (56^oC por 30 minutos) e adsorvidos à temperatura ambiente por 30 minutos com uma suspensão de eritrócitos de cobaio a 50% em solução PBS 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^oC e o sobrenadante estocado a -20^oC até o momento do exame. Os soros originais foram considerados como tendo sido diluídos 1:2,5 durante este tratamento.

A presença de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS foi determinada através do teste da IH, segundo GOUVEIA (1982).

Foram considerados positivos os soros que apresentaram títulos \geq 1:40.

3.1.9. Teste de imunofluorescência direta (IFD)

Para o estabelecimento do título infeccioso do vírus foi utilizado o teste de IFD, baseado em MENGELING et alii (1984).

3.1.9.1. Preparo do conjugado

O conjugado foi preparado a partir de soro de suínos com títulos \geq 1:10240, determinado pela IH. Antes de tratado, o soro foi adsorvido durante 24 horas a 4^oC com uma suspensão concentrada de células renais de suínos, na proporção de 1:2, com o objetivo de eliminar reações inespecíficas. Após este período o soro foi centrifugado a 2000 g/15 minutos, as células retiradas e o sobrenadante precipitado por solução saturada de sulfato de amônia.

Após duas lavagens em PBS pH 7,2, o precipitado ob-

tido foi resuspenso em 1/6 do volume inicial do soro. A concentração de proteínas foi determinada por leitura em refratômetro e o soro conjugado por 12 horas a 4°C com 0,025 mg de isotiocinato de fluoresceína/mg de proteína (CHERRY et alii, 1966).

O conjugado foi passado por coluna de DEAE-A50, preparada em tampão fosfato pH 6,3 e a fração recuperada passada em coluna de SEPHADEX G-25-50 para retirada do isotiocianato livre.

Após titulação, realizada em lâminulas inoculadas com amostras de referência NADL-2, o conjugado foi distribuído em alíquotas e congelado a -80°C.

3.1.9.2. Inoculação das lâminulas

O volume de 0,2 ml das diluições decimais das amostras a serem tituladas foi inoculada em tubos de Leighton com lâminulas (quatro tubos por diluição), contendo suspensão de células de rim suíno na concentração de 5×10^5 células/ml. Após 72 horas a 37°C, 50% do meio foi trocado e 24 horas após as lâminulas recolhidas e fixadas em acetona por 30 minutos a -20°C. As células foram coradas com conjugado por 30 minutos a 37°C e após lavagem com PBS, pH 7,2 e água destilada foram montadas com glicina tamponada pH 9,0 e examinadas.

O controle negativo foi feito com células não inoculadas.

3.1.9.3. Leitura e cálculo do título infeccioso

As lâminulas apresentando um ou mais campos fluorescentes foram consideradas positivas.

O título infeccioso foi estabelecido de acordo com REED & MUENCH (1938).

3.1.10. Testes de controle da vacina

3.1.10.1. Esterilidade

Amostras das vacinas foram colhidas antes e após o envase e semeadas em duplicatas em tubos de caldo tioglicolato e triptose, incubados a 37⁰C e caldo Sabourraud, incubados a temperatura ambiente.

As provas foram lidas diariamente por um período de 15 dias.

3.1.10.2. Inocuidade

A prova de inocuidade foi feita pela inoculação de 0,5 ml de cada partida por via intra-muscular (IM) em duas cobaias. Os animais foram observados por 15 dias.

3.1.10.3. Controle de inativação

Para verificar a presença de vírus ativo, foram colhidas alíquotas da suspensão de vírus após a inativação e diálise. As amostras sem nenhuma diluição e nas diluições 10⁻¹ e 10⁻² foram inoculadas em tubos de Leighton com lamínulas contendo cultivo secundário de rim suíno e o mesmo procedimento descrito em 3.1.9.2., foi seguido. As lamínulas foram examinadas pela IFD (Ítem 3.1.9.) e o sobrenadante dos tubos testados por HA.

3.1.10.4. Imunogenicidade

Para dosagem dos anticorpos induzidos pela vacina foi utilizado o teste de IH, descrito no Ítem 3.1.8. Foram produzidas quatro partidas da vacina. A primeira foi testada em cobaias e as outras três em suínos, pertencentes à granja A.

3.1.10.4.1. Cobaias

As cobaias utilizadas foram oriundas de colônias de laboratórios controlados mas não SPF.

3.1.10.4.2. Suínos

Todos os suínos utilizados no teste de imunogenicidade pertenciam a granja A. Esta granja foi povoada em novembro de 1988, com leitões provenientes de rebanho de desmama precoce medicada (DPM) e continha na época 700 matrizes. Soro sanguíneo de 218 animais de diferentes idades foram testados para o PVS e os resultados indicaram que a granja era livre do vírus.

A granja adotava sistema de confinamento estrito, utilizando esquema "all in", "all out" na maternidade, creche e recria. A alimentação dos animais era feita com ração à base de milho, soja e premix.

O rebanho mantinha esquemas regulares de vacinação contra peste suína clássica, erisipela e leptospirose e era serologicamente negativa para brucelose e doença de Aujeszky.

3.1.11. Partidas produzidas

Foram produzidas quatro partidas (P_1 , P_2 , P_3 e P_4) sendo que para todas foi seguido o mesmo procedimento descrito dos itens 3.1.2. a 3.1.6. O QUADRO 3 mostra a composição dos grupos de animais inoculados com as diferentes partidas da vacina experimental.

3.1.11.1. Partida 1 (P_1)

Testada em 10 cobaias machos, de 150 g de peso que foram inoculados duas vezes com intervalo de 21 dias, com 0,5 ml da vacina pela via intramuscular (Grupo P_1).



QUADRO 3 - Composição dos grupos de animais inoculados com as diferentes partidas da vacina experimental

Partida	Identificação do grupo	Animais testados	Nº de animais testados	Intervalo entre as vacinações
P ₁	P ₁	Cobaias	10	21 dias
P ₂	P ₂	Leitoas	10	21 dias
P ₃	P ₃ G ₁	Leitoas	31	15 dias
	P ₃ G ₂	Porcas	29	21 dias
P ₄	P ₄ G ₁	Leitoas	20	15 dias
	P ₄ G ₂	Leitoas	16	21 dias

As sangrias foram feitas no dia da primeira, no dia da segunda e 15 dias após 2ª vacinação. Cinco cobaias não vacinadas, alojadas nas mesmas gaiolas das vacinadas, foram mantidas como controles e observadas durante todo o experimento.

3.1.11.2. Partida 2 (P_2)

Testada em 10 leitoas sorologicamente negativas, com idade média de 156 dias, vacinadas duas vezes com intervalo de 21 dias pela via intramuscular, com 2 ml da vacina (Grupo P_2). Cinco leitoas não vacinadas foram mantidas como controle. As sangrias foram feitas antes da primeira, na segunda e 15 dias após a segunda vacinação.

3.1.11.3. Partida 3 (P_3)

Foi testada em 60 fêmeas divididas nos grupos: P_3G_1 e P_3G_2 .

Grupo P_3G_1 = trinta e uma leitoas sorologicamente negativas para o PVS, com idade média de 170 dias foram vacinadas e revacinadas com intervalo de 15 dias, pela via intramuscular com 2 ml da vacina.

Grupo P_3G_2 = vinte e nove porcas primíparas, sorologicamente negativas para o PVS com idade variando de 280-306 dias, foram vacinados até os cinco dias após parto e revacinadas após 21 dias com 2 ml da vacina pela via intramuscular (REIS, 1981).

Cinco animais não vacinados foram mantidos como controle.

As sangrias foram feitas antes da primeira, na segunda e 15 dias após segunda vacinação.

3.1.11.4. Partida 4 (P_4)

Testada em 36 leitoas, divididas nos grupos P_4G_1 e P_4G_2 .

Grupo P₄G₁ = vinte leitoas sorologicamente negativas para o PVS, com idade média de 178,50 dias de idade foram vacinadas e revacinadas com intervalo de 15 dias, pela via IM com 2 ml da vacina.

Grupo P₄G₂ = Dezesesseis leitoas sorologicamente negativas para o PVS com idade média de 178,31 dias foram vacinadas e revacinadas com intervalo de 21 dias pela via IM com 2 ml da vacina.

Sete animais foram mantidos como controle.

As sangrias foram feitas antes da primeira, no dia da segunda e 15 dias após segunda vacinação.

3.1.12. Análise estatística

Os resultados obtidos pelos grupos P₄G₁ e P₄G₂ 15 dias após a última vacinação foram comparados pela análise de variância.

Para a análise, os títulos de anticorpos foram submetidos à transformação $\log(\text{diluição}^{-1} + 1)$, uma vez que foi observado para cada tratamento, que os valores dos desvios eram proporcionais à média (SNEDECOR & COCHRAN, 1968).

3.2. Retroinfecção (RI)

3.2.1. Animais

Os animais submetidos a RI, pertenciam à granja B. Foram acompanhados um total de 95 leitoas, divididas nos grupos RIG1, RIG2, RIG3 e RIG4, que possuíam, respectivamente, 28, 25, 21 e 21 animais.

Os grupos RIG1 e RIG2 foram submetidos à RI nos meses de maio e junho de 1989 e o grupo RIG3 em outubro de 1989. O grupo RIG4 acompanhou RIG3 mas, não recebeu a RI (grupo controle).

Em todos os grupos, as leitoas eram transferidas para os galpões reservados para a RI com média de 150 dias de idade, onde eram alojadas e distribuídas em grupos de 10-12 animais por baia de 8 m².

3.2.2. Granja B

A Granja B, com capacidade para 1500 matrizes, adotava o esquema de confinamento estrito, utilizando o sistema "all in", "all out" na creche, maternidade e recria. A alimentação do rebanho era ração à base de milho, soja e premix.

O rebanho era sistematicamente vacinado contra a peste suína clássica, erisipela e leptospirose e era sorologicamente negativo para brucelose e doença de Aujeszky.

A granja B era sorologicamente positiva para o PVS e seu perfil sorológico foi estabelecido, baseado em trabalho de VANNIER et alii (1984). Para isto, foram sangrados um total de 160 animais, assim distribuídos: leitoas (terminação) = 19; porcas de primeiro parto = 25, de segundo parto = 38; de terceiro parto = 18; de quarto parto = 14; de quinto parto = 17 e maior que sexto parto = 27 (GRÁFICO 15).

A performance reprodutiva das porcas de primeiro ao quinto parto foi calculada com base nos dados fornecidos pela granja B e foram analisados nascidos totais, nascidos vivos, porcentagem de natimortalidade, mumificação fetal e ninhadas ≤ 6 (TAB. XIII).

A Granja B utilizava rotineiramente a RI como medida de imunização de leitoas contra a parvovirose suína.

3.2.3. Técnica utilizada para execução do FB

3.2.3.1. Grupos RIG1 e RIG2

O objetivo do estudo destes dois grupos foi avaliar sorologicamente a eficiência da RI que era realizada na Granja

B. Por isso, a metodologia utilizada para imunização destes grupos foi exatamente a que já vinha sendo empregada nesta granja rotineiramente para imunização das leitoas, provenientes de outras granjas ou de reposição do próprio plantel. A eficiência do processo foi estudada pelo acompanhamento sorológico dos grupos, sangrando os animais no dia em que se iniciava RI (dia 0), no dia do término (dia 15) e 15 dias após o término (dia 30).

Após alojadas nas baias dos galpões reservados à RI, as leitoas esperavam por 3 a 5 dias antes do início do fornecimento do material, para diminuir o stress causado pela transferência, e reagrupamento dos animais.

Eram então fornecidos a eles restos de placenta, fetos mumificados e natimortos, provenientes de porcas mais velhas, geralmente acima do terceiro parto, raramente de porcas de segundo parto e nunca de porcas de primeiro parto. Este material era fragmentado, jogado no chão das baias e trocado de três em três dias. Fizes de machos ou outras fêmeas não eram utilizadas.

Os animais permaneciam nestas baias por 15 dias, quando então eram removidos para baias coletivas, junto com leitoas já imunizadas e lá esperavam pela cobertura.

Como estes galpões se destinavam apenas à RI, as baias utilizadas não eram desinfetadas para o recebimento de novos grupos de imunização.

Os machos do plantel não eram submetidos à RI.

3.2.3.2. Grupo RIG3

A metodologia utilizada para este grupo foi a mesma a descrita para os grupos anteriores, com uma única exceção: o material fornecido para a imunização das leitoas era proveniente de porcas jovens (primeiro e segundo parto).

3.2.3.3. Grupo RIG4

Os animais deste grupo foram transferidos da termi-

nação, alojados e removidos das baias de imunização simultaneamente com os do RIG3. Porém permaneceram como grupo controle, não recebendo nenhum material para imunização.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Vacina

4.1.1. Produção da semente e obtenção da suspensão viral

Durante a multiplicação do vírus observou-se alguns fatores que dificultaram a produção da semente.

a) Como a amostra NADL-2 estava congelada há 4 anos a -80°C , seu título hemoaglutinante inicial era muito baixo (1:8), evidenciando a necessidade de passagens em células para o aumento do título.

b) A partir da segunda passagem em rim suíno o título hemoaglutinante da amostra começou a diminuir ao invés de aumentar.

Analisando os dados, conclui-se tratar provavelmente da contaminação da amostra com "partículas incompletas" (RHODE, 1978) e tentou-se uma purificação do vírus com o objetivo de eliminá-las ou diminuí-las. Após a purificação por diluições em ponto final durante três passagens (item 1.1) e mais duas passagens em cultivo primário de um suíno (CPRS), a amostra apresentou títulos hemoaglutinantes de 1:512 a 1:1024 (semente trabalho) e foi distribuída em alíquotas e congelada a -80°C .

Quando inoculou-se as sementes para obtenção da suspensão viral, observou-se uma variação no título hemoaglutinante obtido. O sobrenadante das garrafas inoculadas com sementes de título hemoaglutinante 1:1024 apresentou em sua maioria títulos de 1:256 e 1:512/0,05 ml.

Conclui-se que apesar de melhorar o título da semente, a purificação do vírus não foi suficiente para eliminar as partículas defectivas nela presentes, já que garrafas inoculadas com semente com título de 1:1024 apresentaram títulos até de 1:256.

CHOI et alii (1987), estudando a inibição da replicação do PVS por partículas virais vazias, observaram que esta ocorria "in vitro" e "in vivo" e que esta inibição era proporcional à concentração de partículas vazias. Na multiplicação "in vitro" ocorrida na linhagem celular ST, os autores observaram que o título hemoaglutinante da amostra caiu de 1:512 para até 1:4, quando foi usada a proporção de 0:1 a 10:1 de partículas vazias/partículas cheias. O aumento de partículas defectivas no inóculo também diminuiu em até 85% o número de focos fluorescentes positivos.

Um fator limitante para o processo de purificação utilizado no presente trabalho foi a dificuldade de obtenção de leitões para o cultivo primário, para a realização das diversas passagens sucessivas exigidas. Havia um intervalo variável no fornecimento dos animais, o que levava à interrupção do processo por falta de células para a multiplicação viral. Pela mesma razão, o número de passagens ficou limitado em apenas três. Acredita-se que, pelo menos no caso da amostra utilizada, uma técnica mais rigorosa de purificação seria necessária.

EDWARDS et alii (1986), cita a purificação de uma amostra virulenta (CVL-1243) para ser utilizada como semente na produção de uma vacina oleosa, por seis passagens em diluições por ponto final.

CHOI et alii (1987), baseado na diferença de densidade, separou em gradiente de cloreto de césio partículas cheias

e vazias, que bandearam na densidade de 1,39 a 1,42 g/ml e 1,30 a 1,34 g/ml, respectivamente. Os autores concluíram que este método é altamente eficiente para este fim.

Nas suspensões virais utilizadas nas vacinas, os títulos infecciosos não foram sempre paralelos aos títulos hemoaglutinantes. Enquanto o título hemoaglutinante das suspensões foi sempre 1:256/0,05 ml, os títulos infecciosos variaram: $2,13 \times 10^6$ DICC₅₀/0,2 ml (P₁); $5,49 \times 10^6$ DICC₅₀/0,2 ml (P₂); $2,13 \times 10^6$ DICC₅₀/0,2 ml (P₃) e $1,58 \times 10^6$ DICC₅₀/0,2 ml (P₄) (QUADRO 4). RIVERA et alii (1986) e HI (1974), também observaram este fenômeno.

Esta variação pode ter ocorrido pela impossibilidade de se evidenciar títulos hemoaglutinantes entre as diluições 1:256 e 1:512. A suspensão de P₂, que apresentou o maior título infeccioso, pode ter tido um número real de partículas virais mais próximas da diluição 1:512 do que da diluição 1:256. Como títulos hemoaglutinantes foram expressos como a recíproca da maior diluição do vírus que causou hemoaglutinação completa, suspensões virais que não apresentavam 100% de aglutinação na diluição 1:512, mesmo demonstrando uma aglutinação parcial nesta diluição, foram lidas com 1:256 (chamada por alguns autores como 1:512 incompleto) (MENGELING, 1972).

O número de partículas defectivas presentes em cada suspensão viral pode também causar uma variação na relação título hemoaglutinante/título infeccioso, já que estas podem aglutinar hemácias, mas não podem fazer um ciclo infeccioso completo em uma célula (CHOI et alii, 1987).

4.1.2. Cultivo celular

O CPRS não apresentou dificuldades na sua execução. Após as primeiras 48 horas de incubação a 37°C o meio se apresentava bastante ácido e com muitas células em suspensão, mas a monocamada mostrava, geralmente 60-80% de confluência celular e 24-48 horas após a troca do meio, estava completa.

As primeiras tripsinizações foram feitas com tripsina 0,25%, mas observou-se que as células soltavam-se em grumos, o que diminuía a qualidade do cultivo. Passamos então a utilizar STV 0,2%, com bons resultados.

Julgou-se importante destacar duas desvantagens da utilização do CPRS, para crescimento e produção de vacina de PVS. A primeira se refere à dificuldade de obtenção de leitões doadores dos rins. Inicialmente tentou-se trabalhar com fetos provenientes de matadouros, porém, observou-se que a frequência de porcas gestantes, principalmente na fase final da gestação era muito pequena. Identificada a granja A, negativa para o PVS, começou-se a trabalhar com leitões de até dois dias, provenientes dela. Porém, esta se localizava a 200 km de Belo Horizonte, o que dificultou o fornecimento regular destes animais.

A segunda desvantagem se refere ao risco de trabalhar com células naturalmente infectadas com PVS ou outros vírus. CARTWRIGHT & HUCK (1967) descrevem o isolamento do PVS de culturas primárias de rins de leitões jovens, obtidos de uma granja onde a evidência da infecção por este vírus havia sido sorologicamente demonstrada. MENGELING (1975) descreve a presença do PVS em cultura de células preparadas a partir de tecido fetal suíno.

Neste trabalho, a sorologia dos leitões doadores dos rins e controles não inoculados que acompanhavam todo o cultivo foram feitos para aumentar a segurança da utilização destas células.

Algumas linhagens contínuas e outras células de cultivo primário têm sido descritas para a multiplicação do PVS (PIRTLE, 1974; HI, 1974; CHOI, 1987). Porém, dois pesquisadores comprovam a possibilidade de obtenção de bons títulos virais utilizando células de linhagem contínua: BACHMANN & DANNER (1976) obtiveram bons títulos hemoaglutinantes (1:1024) e infecciosos ($10^{6,3}$ DICC₅₀/0,2 ml) utilizando linhagem celular de rim suíno (SK6) e RIVERA et alii (1986) trabalhando com uma amostra virulenta, adap-

tada em linhagem celular PK15 (rim suíno) conseguiram em sistema de cultura rotacional títulos hemoaglutinantes de até 1:4056 e infecciosos de 10^9 DICC₅₀/0,2 ml.

Alguns autores (WHATHALL et alii, 1984, EDWARDS et alii, 1986) obtiveram suspensões virais para produção da vacina a partir de fetos inoculados com amostras patogênicas. As vacinas produzidas com esta metodologia têm estimulado altos títulos de anticorpos anti-PVS.

4.1.3. Infecção das células

Nas culturas inoculadas foi observado, com intensidade variável, efeito citopático (ECP) que iniciava, geralmente, 36 horas após infecção com um ligeiro arredondamento de células. Quarenta e oito horas após a infecção já se observava um aumento no número de células se despreendendo de algumas regiões da monocamada, evoluindo com o tempo para o resto da camada celular. Este efeito foi classificado de uma (+) a quatro cruces (++++).

Tentou-se utilizar a presença do ECP para estabelecer o título infeccioso das amostras. Porém, especialmente nas diluições terminais, o efeito era vago e inconclusivo e adotou-se então a IFD para este fim. Esta observação parece concordar com as de outros autores (MENGELING, 1986; LUCAS & NAPHTHINE, 1971) que também tendo dificuldades para identificar o ECP em diluições altas, utilizaram a IFD para a titulação do PVS.

4.1.4. Preparo da vacina

A β propiolactona empregada foi eficiente para inativação do vírus. Em nenhuma das amostras testadas como descritas em 3.1.9. foram observadas células fluorescentes e em nenhum dos sobrenadantes dos tubos foi detectado partículas hemoaglutinantes.

Devido à alta concentração do inativante utilizado

foi necessário para sua remoção, diálise por pelo menos 24 horas. Este procedimento, assim como a etapa de centrifugação das células da cultura não se mostrou prático, principalmente quando se trabalhou com volumes maiores de suspensão viral.

O uso de hidróxido de alumínio gel (HAG) na proporção de 40% foi eficiente para adsorção de todo o vírus contido na suspensão viral pois todos os sobrenadantes testados após adsorção com o adjuvante foram negativos no teste de HA. A concentração do gel não causou problemas de entupimentos da agulha, porém antes de ser adicionado à suspensão viral, o gel concentrado foi filtrado em gaze para eliminar partículas mais grossas, insolúveis.

4.1.5. Teste do IFD

Ao exame das lamínulas coradas com conjugados, foi observado uma fluorescência em grânulos finos e desuniformes, que em algumas células se apresentavam dispersos no núcleo, outras no citoplasma e outras no núcleo e citoplasma. Porém, a localização mais comumente observada foi no citoplasma, o que parece concordar com MENGELING (1972) que encontrou com maior frequência a presença de grânulos fluorescentes apenas no citoplasma das células, quando estas eram inoculadas logo após a tripsinização e apenas no núcleo quando as células eram infectadas em monocamada previamente formada.

4.1.6. Teste de IH

A IH é o teste sorológico mais frequentemente descrito pela maioria dos autores para evidenciação de anticorpos para o PVS, provavelmente por ser um teste simples, rápido, de boa repetibilidade.

Porém, a presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação, de natureza protéica, mucoproteínas e hemoaglutininas naturais existentes nos soros dos suínos, têm levado os

pesquisadores a utilizarem diferentes técnicas na tentativa de eliminá-los. Geralmente, para este fim, são empregados o caolin e a hemácia de cobaios, em diferentes proporções e concentrações que variam entre autores, fazendo variar também a diluição final do soro após estes tratamentos e o título mínimo, a partir do qual o autor considera o soro como positivo.

Estas e outras diferenças técnicas observadas, dificultam a comparação e a interpretação dos resultados obtidos pelos diferentes pesquisadores que estudam o PVS.

O QUADRO 1 mostra algumas diferenças encontradas em trabalhos onde a IH é utilizada.

No presente trabalho, teve-se a oportunidade de trabalhar com animais da granja A os quais foram adotados como controles negativos. Fez-se sorologia de um total de 218 animais e mesmo após o tratamento realizado nos soros (Ítem 3.1.8) obteve-se os seguintes resultados: título < 1:5 = 184 soros (84,40%); 1:5 = 1 soro (0,45%); 1:10 = 21 soros (9,63%); 1:20 = 12 soros (5,50%) \geq 1:40 = nenhum soro.

Com base nestes resultados passou-se a considerar como negativos os soros com títulos \leq 1:20, aceitando-se tratar ainda, de inibição inespecífica da hemoaglutinação. A possibilidade de se tratar de baixos títulos de anticorpos passivos foi levantada, já que a maioria dos animais testados eram leitoas com idade de 150 a 180 dias, porém nenhum teste foi realizado para a comprovação desta hipótese.

RIVERA et alii (1986) trabalhando com soro de suínos SPF, também descrevem que ocasionalmente, foram encontrados títulos inibidores da hemoaglutinação > 1:10. Ao contrário, estes títulos não foram confirmados, quando os mesmos soros foram testados pela soroneutralização

4.1.7. Testes de controle da vacina

O QUADRO 4 mostra o volume, título hemoaglutinante e infeccioso e os grupos testados com cada partida produzida.

QUADRO 4 - Volume, título hemoaglutinante e infeccioso e grupos testados com as diferentes partidas produzidas

Partida	Volume produzido	Título hemoaglutinante	Título infeccioso	Grupo testado
P ₁	30 ml	1:256/0,05 ml	2,13 x 10 ⁶ DICC ₅₀ /0,2 ml	P ₁
P ₂	60 ml	1:256/0,05 ml	5,49 x 10 ⁶ DICC ₅₀ /0,2 ml	P ₂
P ₃	3.200 ml	1:256/0,05 ml	2,13 x 10 ⁶ DICC ₅₀ /0,2 ml	P ₃ G ₁ P ₃ G ₂
P ₄	2.700 ml	1:256/0,05 ml	1,58 x 10 ⁶ DICC ₅₀ /0,2 ml	P ₄ G ₁ P ₄ G ₂

4.1.7.1. Inocuidade

As vacinas inoculadas em cobaias ou em suínos não demonstravam nenhuma manifestação indesejável durante o período de observação.

4.1.7.2. Imunogenicidade

4.1.7.2.1. Cobaias

Grupo P₁

Os resultados do Grupo P₁, detalhados na TAB. I, mostram que 15 dias após a última vacinação, oito das dez cobaias tiveram aumento no título hemoaglutinante, indicando que a vacina estimulou a produção de anticorpos anti PVS. Duas cobaias não apresentaram aumento significativo de anticorpos, quando comparados com os controles não vacinados, que mantiveram títulos constantes durante as três sorologias.

Os títulos de anticorpos obtidos não podem ser comparados com os de outros autores, porque as cobaias possuíam, antes das vacinações, anticorpos reagentes para o vírus. No entanto houve aumento destes títulos com a inoculação da vacina, o que sugere sua atuação como "booster".

JOO et alii (1976) pesquisando a presença de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS em várias espécies animais, sem prévia inoculação do vírus, encontraram 100% das cobaias positivas, sendo que 50% delas apresentavam títulos de 1:128 a 1:512. Os autores atribuem a presença destes anticorpos à infecção natural por parvovírus heterólogo.

JOO et alii (1984) comentam o trabalho acima citado, ressaltando a importância da utilização de cobaias SPF para este tipo de teste.

O estudo da utilização de animais de laboratórios para testes de vacinas de PVS é importante por dois motivos.



1) Devido à ampla distribuição do vírus nos rebanhos do Brasil (GOUVEIA, 1982; MARTIS et alii, 1984) e do mundo (MENGELING, 1986), torna-se difícil a obtenção de suínos soro-negativos para serem utilizados nos testes de inocuidade, imunogenicidade e potência das vacinas.

2) O custo da aquisição e manutenção dos animais de laboratórios é muitas vezes menor que dos suínos.

Vários autores têm estudado o uso de cobaias e outros animais de laboratório para estabelecer a eficiência de vacinas inativadas contra o PVS (JOO et alii, 1984; MOLITOR et alii, 1984/85; BENGELSCORFF, 1987; JERABEK et alii, 1987).

4.1.7.2.2. Suínos

No total foram vacinados 106 suínos com as partidas 2, 3 e 4, todos inicialmente com títulos de anticorpos $\leq 1:20$. A TAB. VIII e o GRÁF. 10 mostram os resultados obtidos com estes animais, 15 dias após a última vacinação.

A média de títulos de anticorpos obtidos do total dos animais, 15 dias após a última vacinação foi de 1:115,09.

Grupo P₂

Os resultados obtidos com os animais do Grupo P₂ estão detalhados na TAB. II e no GRÁF. 1.

As leitoas vacinadas com P₂ mostraram 100% de resposta à vacina. A boa performance desta partida deve-se provavelmente à presença de uma maior quantidade de partículas virais por dose, demonstrada pelo maior título infeccioso de sua suspensão viral ($5,49 \times 10^6$ DICC₅₀/0,2 ml).

Além disso, P₂ foi a partida de menor volume (60 ml) comparado com 3.200 ml de P₃ e 2.700 ml de P₄. Apesar da técnica de preparação das diferentes partidas e dos reagentes utilizados terem sido exatamente os mesmos, consideramos que as inúmeras variáveis existentes nas diferentes etapas da produ-

ção da vacina, podem ter sido melhor controladas na partida de menor volume que conseqüentemente poderia ter obtido melhor qualidade final.

Grupos P_3G_1 e P_3G_2

Os resultados obtidos com os animais do Grupo P_3G_1 , estão descritos na TAB. III e representados no GRÁF. 3. Quinze dias após a última vacinação, 30 (96,77%) das 31 leitoas de P_3G_1 apresentaram resposta à vacinação com títulos que variaram de 1:40 a 1:320 (TAB. VIII).

Os resultados obtidos com os animais do grupo P_3G_2 , estão descritos na TAB. IV e representados no GRÁF. 5. Quinze dias após a última vacinação, 23 (79,3%) das 29 porcas deste grupo, responderam à vacinação com títulos que variaram de 1:40 a 1:640 (TAB. VIII).

As médias obtidas na primeira, segunda e terceira sorologia dos grupos P_3G_1 e P_3G_2 , estão descritas nas TAB. VII e representadas nos GRÁF. 4 e 6, respectivamente.

Apesar do intervalo entre as vacinações de P_3G_1 e P_3G_2 serem diferentes, acredita-se que a diferença no número de animais reagentes após a última vacinação (96,77 e 79,31%, respectivamente) deve-se à época em que os animais de P_3G_2 foram vacinados, que foi até cinco dias pós-parto e 21 dias após, próxima à época da desmama. Parto e desmama são dois fatores de stress que envolvem a liberação de hormônios que diminuem a resposta imune destes animais e estes fatores poderiam ter influenciado diretamente nos resultados obtidos.

Apesar disto, as médias dos dois grupos, 15 dias após a segunda vacinação foram próximas, mostrando que estes fatores estavam relacionados com a inibição da resposta individual dos animais e não com a qualidade da resposta à vacina.

Grupos P_4G_1 e P_4G_2

Os resultados obtidos com os animais de P_4G_1 , estão descritos na TAB. V e representados no GRÁF. 7. Quinze dias após a última vacinação, 17 (85%) das 20 leiteiras apresentaram resposta à vacinação, com títulos variando de 1:40 a 1:160 (TAB. VIII).

Os resultados obtidos com os animais de P_4G_2 , estão descritos na TAB. VI e representados no GRÁF. 8. Quinze dias após a última vacinação 14 (87,5%) das 16 leiteiras vacinadas apresentaram resposta à vacinação, com títulos variando de 1:40 a 1:1280 (TAB. VIII).

As médias obtidas na primeira, segunda e terceira sorologia dos grupos P_4G_1 e P_4G_2 , estão descritas na TAB. VII e representadas no GRÁF. 9.

Analisando os resultados obtidos com os animais de P_4G_1 e P_4G_2 , onde a única diferença entre os grupos foi o intervalo de 15 a 21 dias entre vacinações, observa-se que a média dos títulos no grupo P_4G_2 , 15 dias após a última vacinação foi 3,97 vezes maior que no grupo P_4G_1 (1:262,5 e 1:66, respectivamente).

Apesar de ser observada uma tendência para obtenção de melhores resultados utilizando-se o intervalo de 21 dias entre as vacinações, a análise estatística não revelou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os resultados dos dois grupos.

Esta tendência também foi observada nos outros grupos vacinados com intervalo de 21 dias (P_2 e P_3G_2), porém devido à diferença entre variáveis (número da partida utilizada para vacinação dos grupos e diferença na idade dos animais vacinados) não pode-se compará-los estatisticamente. O Grupo P_2 apresentou uma média de anticorpos de 1:248, e o Grupo P_3G_2 , mesmo com 20,7% dos animais não respondendo à vacinação, apresentou média semelhante à média obtida pelo Grupo P_3G_1 , onde 96,17% dos animais responderam positivamente à vacina, 15 dias após última vacinação (1:103 e 1:102, respectivamente).

Observa-se também que na última sorologia, 65,78% dos animais que apresentaram títulos $\geq 1:160$ e 93,75% dos que apresentaram títulos $\geq 1:320$, pertenciam a grupos vacinados com intervalos de 21 dias (TAB. VIII). Porém para obtermos resultados mais seguros, novos trabalhos com maior número de animais por grupos devem ser realizados.

A porcentagem de suínos que responderam à vacinação nos grupos P_4G_1 e P_4G_2 foi próxima, sendo 85% e 87,5%, respectivamente. Estes resultados sugerem que o intervalo de 21 dias entre as vacinações tendem a proporcionar títulos mais altos que 15 dias, com porcentagem semelhante de resposta à vacina.

Os resultados obtidos concordam com os de JOO et alii (1984), que vacinando cobaias com intervalo de duas, três e quatro semanas, verificaram uma resposta imune melhor, quando a segunda dose da vacina foi feita na terceira ou quarta semana após a vacinação inicial.

Comparando os resultados dos grupos P_4G_1 e P_4G_2 , observamos que a média de anticorpos e número de animais reagentes no dia da segunda vacinação foi menor em P_4G_2 (TAB. V, VI e VII). Como os animais destes dois grupos foram vacinados no mesmo dia e como no momento da segunda sangria nenhum deles havia recebido a segunda vacinação, estes resultados sugerem uma tendência de queda nos títulos de anticorpos dos 15 para os 21 dias pós primeira vacinação.

Hipoteticamente, uma explicação para estes resultados poderia ser baseada nos achados de HI (1974). Este autor relata que as classes de imunoglobulinas envolvidas na resposta imune para o PVS seriam: IgM, uma semana pós infecção (p.i); IgM e IgG, duas semanas p.i. e IgG, três semanas p.i. Assim, 15 dias pós primeira vacinação os anticorpos detectados seriam das classes IgM e IgG, o que proporcionariam títulos de anticorpos mais altos e detectáveis em maior número de animais. Vinte e um dias pós vacinação os anticorpos da classe IgM já teriam desaparecidos, restando apenas os da classe IgG.

Considerando os 106 suínos vacinados, observamos que

a segunda dose da vacina funcionou como "booster" em 80 (75,47%) deles (TAB. II, III, IV, V e VI).

A porcentagem de suínos que apresentaram alguma resposta 15 ou 21 dias após a primeira e 15 dias após a segunda vacinação, foi respectivamente, de 40 e 100% em P_2 , 29 e 96% em P_3G_1 , 3,44 e 79,3% em P_3G_2 , 33,33 e 85% em P_4G_1 e 6,25 e 87,5% em P_4G_2 .

A análise destes dados sugere que a aplicação de uma segunda dose foi importante para aumentar a eficiência da vacina. Estes achados concordam com JOO & JOHNSON (1977), MENGELING et alii (1979), PAUL et alii (1980), WRATHALL et alii (1984) e RIVERA et alii (1986). Porém, discordam de MENGELING et alii (1981), que não observaram aumento na média dos títulos obtidos 15 dias após a primeira e segunda vacinação de dois grupos de 8 leitões inoculados com vacina inativada bivalente para parvovirose suína e doença de Aujeszky.

A porcentagem de animais que responderam à segunda dose, aumentando, pelo menos duas vezes o título obtido após primeira vacinação foi mais alta nos animais vacinados com intervalo de 21 dias: $P_2 = 100\%$; $P_3G_2 = 79,31\%$; $P_4G_2 = 81,25\%$ (grupos vacinados com intervalo de 21 dias) e $P_3G_1 = 67,74\%$ e $P_4G_1 = 65\%$ (grupos vacinados com intervalo de 15 dias), o que sugere que a segunda dose da vacina funcionou melhor como "booster" nos animais vacinados com intervalo de 21 dias.

Existe uma variação muito grande nos títulos inibidores da hemoaglutinação, obtidos com a inoculação das vacinas desenvolvidas por diferentes autores. A comparação destes títulos, é difícil devido às variações de técnicas de produção e controle existentes entre eles, como quantidade de antígeno viral utilizado por dose de vacina, tipo e porcentagem de adjuvante empregado, diferença entre as cepas vacinais, intervalo entre vacinações, número de animais utilizados nos testes e técnicas da IH. O QUADRO 2 mostra algumas destas diferenças.

No presente trabalho, considerando os 106 suínos vacinados encontramos, 15 dias após a segunda vacinação, títulos

variando de 1:40 a 1:1280 (GRÁF. 10), o que concorda com os títulos obtidos por outros autores que utilizaram HAG como adjuvante (QUADRO 2).

Mesmo considerando as inúmeras variáveis existentes entre os trabalhos dos autores descritos no QUADRO 2, podemos observar que as vacinas oleosas induziram, 15 dias após a última vacinação (independente de uma ou duas doses) títulos inibidores da hemoaglutinação que variaram de 1:1000 e 1:20480 e as vacinas com HAG, títulos de 1:20 a 1:640. Observa-se que nestes exemplos, o maior título obtido pelas vacinas com HAG, não alcançou o menor título obtido pelas vacinas oleosas.

Analisando a TAB. II, que descreve os resultados dos animais vacinados com P₂, observamos que 75 dias após a segunda vacinação, todos os animais testados tiveram uma queda no título de anticorpos que variou de duas a quatro vezes. Estes resultados concordam com SORENSEN & ASKAA (1981) e MENGELING et alii (1978, 1981) que obtiveram resultados semelhantes. Ao contrário, WRATHALL et alii (1984) e VANNIER et alii (1986), não observaram queda nos títulos de anticorpos dos animais vacinados com vacinas experimentais desenvolvidas por eles, por pelo menos sete meses após o início da vacinação. Estas diferenças, provavelmente, podem ser atribuídas ao uso de diferentes adjuvantes: HAG, no primeiro caso e adjuvante oleoso no segundo.

Estes dados confirmam as observações de autores (WRATHALL et alii, 1984), que afirmam que vacinas oleosas induzem uma resposta imune mais forte e duradoura em suínos.

Embora as vacinas com hidróxido de alumínio induzam títulos inibidores da hemoaglutinação mais baixos que vacinas oleosas e vacinas vivas, elas são amplamente usadas por serem de mais fácil industrialização que as oleosas e não apresentarem os inconvenientes de vacinas vivas para a vacinação de porcas gestantes, rebanhos negativos, varrões doadores de sêmen.

Em 12 (11,32%) dos 106 animais vacinados neste trabalho não foi detectada resposta à vacina 15 dias após a segun

da vacinação. Destes, seis (50%) pertenciam ao grupo P_3G_2 , cujas possíveis causas da alta porcentagem de animais que não responderam à vacina, já foram discutidas, um (8,33%) a P_3G_1 , três (25%) a P_4G_1 e dois (16,66%) a P_4G_2 .

Trabalhou-se com um número grande de suínos por grupo: $P_3G_1 = 31$; $P_3G_2 = 29$; $P_4G_1 = 20$; $P_4G_2 = 16$ e o menor grupo $P_2 = 10$, totalizando 106 animais. Assim, a presença de animais negativos após a última vacinação já era esperada, já que a resposta imune está relacionada, além da qualidade e quantidade de imunógeno, com a resposta individual de cada animal.

Entre os fatores que podem estar relacionados com a falta de resposta à vacina destacamos a possível presença de baixos títulos de anticorpos passivos. Das leitoas vacinadas que apresentaram títulos de anticorpos considerados inespecíficos (1:5 a 1:20) antes da primeira vacinação, 12,5% não responderam à vacina e 25% apresentaram títulos baixos (1:40) (TAB. II a TAB. VI).

De acordo com a literatura consultada, os seguintes títulos inibidores da hemoaglutinação protegeram os animais ao desafio, impedindo a infecção uterina: 1:10; 1:20 (MENGELING et alii, 1979), 1:40 a 1:640 (MENGELING et alii, 1981); 1:2560; 1:81920; 1:40960; 1:5120; 1:20480 (WRATHALL et alii, 1984), 1:6,46; 1:7,46; 1:10,55; 1:64; 1:194; 1:1176, 26 (EDWARDS et alii, 1986), 1:80 a 1:320 (RIVERA et alii, 1986).

Observa-se que títulos tão baixos quanto 1:6,76 e tão altos quanto 1:81920, protegeram os animais desafiados. Para analisar estes dados deve-se lembrar que existem algumas diferenças na técnica de detecção de anticorpos, dificultando o estabelecimento de um título mínimo protetor contra a infecção uterina. Porém, estes resultados mostram claramente que a ineficiência da vacina em induzir altos títulos inibidores da hemoaglutinação não indica, necessariamente, pouca proteção contra morte fetal.

No presente trabalho analisou-se apenas sorologicamente a resposta à uma vacina inativada. Não foi realizado, nes-

ta etapa, o desafio dos animais vacinados. Porém, considerando os resultados de outros autores que obtiveram sucesso no desafio com títulos iguais ou menores que os nossos (1:40 a 1:1280), fez-se uma inferência da porcentagem de proteção conferida pela vacina estudada. Em P_2 obteria-se uma proteção de 100%, em P_3G_1 , 96,17% e em P_3G_2 , 79,31%; em P_4G_1 , 85% e em P_4G_2 , 87,5% dos animais (TAB. VIII).

Apesar de alguns autores descreverem títulos $\leq 1:20$ como protetores ao desafio, consideramos como título negativo, por razões já discutidas anteriormente.

4.2. "Retroinfecção" (RI)

4.2.1. Grupos RIG1 e RIG2

De um total de 53 leitoas testadas nestes dois grupos, 44 (83,01%) não apresentaram soroconversão 15 dias após o término da RI, uma (1,88%) apresentou título de 1:80; uma (1,88%) título de 1:160; uma (1,88%) título de 1:320 e uma (1,88%) título de 1:640; três (5,66%) título de 1:1280 e duas (3,77%) título de 1:2560 (GRÁF. 12).

Os resultados obtidos com os animais do grupo RIG1 estão descritos na TAB. IX. Neste grupo não foi feita a primeira sangria, mas podemos observar que 15 dias após o término da RI apenas 14,28% das leitoas submetidas ao processo de imunização apresentavam títulos hemoaglutinantes para o PVS. Da segunda para terceira sangria não houve soroconversão de nenhum animal.

Os resultados obtidos com os animais do grupo RIG2, estão descritos na TAB. X. Neste grupo, uma (4%) das 25 leitoas já era positiva no dia do início da RI e 15 dias após seu término cinco (20%) tinham anticorpos anti PVS, o que indica uma taxa de soroconversão de 16% da primeira para última colheita. Dois (50%) dos quatro animais que soroconverteram, o fizeram da primeira para segunda colheita e 50% da segunda para terceira,

o que indica que estes últimos tiveram contato com o vírus nos dias finais da RI (GRÁF. 11).

4.2.2. Grupo RIG3

Os resultados obtidos com os animais de RIG3 estão descritos na TAB. XI. Observa-se que no dia do início do FB, dois animais (9,52%) apresentavam título de anticorpos para o PVS; 18 (85,71%) no último dia e 21 (100%) 15 dias após o término. Quando comparamos o número de animais positivos no início e no término da RI observamos que a taxa de soroconversão durante o processo de imunização foi de 90,47%, sendo que 76,19% foi observada da primeira para segunda sangria e 14,28% da segunda para terceira sangria (GRÁF. 13).

4.2.3. Grupo RIG4

Os resultados obtidos com os animais de RIG4 estão descritos na TAB. XII. Neste grupo, 10 (47,61%) das 21 leitões apresentavam anticorpos contra o PVS na primeira sorologia e 12 (57,15%) na segunda e na terceira. Quando comparamos o número de animais positivos no início e no fim da RI, observamos que a taxa de soroconversão foi de 9,53% e ocorreu da primeira para segunda sangria (GRÁF. 14).

Dos animais que soroconverteram nos três grupos imunizados, 77,4% apresentaram títulos altos na última sangria ($\geq 1:640$), o que normalmente é esperado na infecção natural pelo PVS (VAN LEENGOED, 1983).

Em nosso meio, a RI é principalmente utilizada na prevenção da parvovirose suína, sendo o material administrado às fêmeas não gestantes, 30 a 15 dias antes da primeira cobertura e das enterites por *E. coli*, onde fêmeas gestantes são expostas ao material específico entre 28 e 14 dias antes da data do parto, com o objetivo de induzir imunidade adequada, que passada através da ingestão do colostro irá proteger os leitões

contra doença aguda na primeira semana de vida.

No Brasil vários produtores têm optado por este método de imunização, porém nenhum estudo da sua eficiência tem sido realizado.

Como vantagens da RI, podemos citar a facilidade de execução e baixo custo deste processo, o que o torna acessível a qualquer produtor e aplicável a qualquer tipo ou tamanho de rebanho. Porém, este método apresenta sérias limitações que devem ser cuidadosamente analisadas. A primeira delas, refere-se ao risco sanitário que este processo representa para o rebanho. A utilização da RI em rebanhos positivos para leptospirose e brucelose é totalmente desaconselhada. No caso de surtos ou problemas reprodutivos crônicos em granjas, antes de se pensar na utilização da RI para prevenção da parvovirose suína, deve-se fazer diagnóstico diferencial com outros agentes infecciosos (principalmente brucela, leptospira, enterovírus e Vírus de Aujeszky). TERRY & Mc DOGALL (1986) comentam que para a aplicação da RI, uma análise, orientação e aconselhamento veterinário detalhado de cada situação individual, se faz necessário, para que o produtor não dissemine, doenças que podem afetar seu rebanho e o de outros produtores.

O segundo problema da RI está no desconhecimento da quantidade e mesmo da presença do vírus, no material que é oferecido às leitoas e na falta de garantia de que todos os animais entrarão em contato com vírus. Na prática, não é possível identificar o material "vírus positivo", uma vez que isto só pode ser feito laboratorialmente.

A granja estudada neste trabalho era negativa para brucelose e doença de Aujeszky e sistematicamente vacinada contra leptospirose e durante a RI não foram observadas alterações clínicas nos animais, indicativas destas ou outras enfermidades.

O esquema da RI utilizado pelos grupos RIG1 e RIG2 está descrito em 3.2.3.1. Na maioria dos casos o material para imunização provinha de porcas com três ou mais partos (porcas

mais velhas).

Analisando o perfil sorológico da granja B (GRÃF. 15) observamos que a maior porcentagem de soroconversão e conseqüentemente, a infecção da maioria das leitoas, ocorria entre a primeira cobrição e o primeiro parto e que após o terceiro parto nenhum animal era sorologicamente negativo para o PVS. Portanto, estes dados indicam que nesta granja, os animais que estariam se infectando e conseqüentemente eliminando e apresentando material rico em vírus seriam primeiramente as porcas de primeiro parto, seguidas das porcas de segundo parto. A análise da performance reprodutiva dos animais sangrados para a elaboração do perfil sorológico, vem reforçar esta hipótese. Comparando a TAB. XIII, que descreve alguns índices reprodutivos destes animais, com o QUADRO 5 que contém os índices considerados padrões e de interferência para leitoas e porcas, observamos que a partir do terceiro parto, todos os índices reprodutivos apresentados pela Granja B estão dentro das especificações. No entanto, problemas de baixo número de leitões nascidos vivos/porca e alta porcentagem de natimortalidade, mumificação fetal e ninhadas \leq seis, são observadas nas porcas de primeiro e segundo parto.

Assim, o material oferecido às leitoas dos grupos RIG1 e RIG2, teria pouca ou nenhuma quantidade de vírus, o que explicaria a baixa eficiência do processo de imunização destes grupos.

No grupo RIG3, 100% dos animais apresentaram títulos de anticorpos para o PVS, quinze dias após o término da RI Neste grupo e no grupo controle (RIG4), a soroconversão da primeira para última sangria foi 90,47% e 9,52%, respectivamente.

A soroconversão pode ter sido conseqüência do contato direto do animal com o vírus presente no material oferecido ou com secreções e excreções de leitoas, assim infectadas. MENGELING & PAUL (1986) demonstraram que suínos infectados experimentalmente com o PVS, transmitiram este vírus por uma a duas semanas pós infecção para outros leitões, através da eli-

QUADRO 5 - Índices alvo e limites de interferência de alguns ítems da performance reprodutiva de leitões e porcas

	Nascidos vivos/porca	Nascidos mortos*	Ninhadas ≤ 6
	Alvo/Limite de interferência	Alvo/Limite de interferência	Alvo Limite de interferência
Leitões	9,5-10/ ≤ 9	4%/6%	15%/18%
Porcas	10,5-11/ ≤ 10	5%/7,5%	15%/18%

Fonte = WRATHALL (1977); MENGELING (1986).

* = Nascidos mortos inclui natimortos e mumificados.



minação do vírus em secreções e excreções.

Os resultados obtidos com o grupo RIG3 indicam que a utilização de material de porcas mais jovens, na imunização destas leitoas foi eficiente neste grupo. Porém não se pode, apenas com a análise deste grupo, afirmar que outros grupos tratados com a mesma metodologia obteriam igual sucesso na imunização, pois a quantidade de vírus presente em cada carga de material oferecido às leitoas não é constante.

É importante ressaltar que em outras granjas que realizam esta prática, a situação epidemiológica, a distribuição do vírus e a técnica da RI podem ser diferentes, levando a diferentes resultados na eficiência do método (ROBISON et alii, 1985; VAN LEENGOED & LEEUW, 1986; WRATHALL, 1988).

Analisando o perfil sorológico da granja B, observa-se que na terminação todos os animais mostraram-se sorologicamente negativos para o PVS. Porém, no grupo RIG3, dois (9,52%) e no grupo RIG4, 10 animais (47,61%) apresentaram anticorpos anti-PVS na primeira sangria, antes do início da RI. Concluiu-se que como as baias da RI não eram limpas após a passagem de cada grupo, as leitoas entraram em contato com vírus remanescente do material de imunização do grupo anterior. Como descrito em 3.2.3. as leitoas eram deixadas por 3 a 5 dias antes do início da RI e a primeira sangria era feita no dia em que se iniciava a administração do material. Portanto os anticorpos encontrados nesta ocasião seriam consequência do contato com partículas virais já presentes nas baias. MENGELING et alii (1986) descrevem que o PVS pode permanecer infeccioso por 14 semanas em secreções e excreções de animais infectados, enfatizando a importância da contaminação ambiental como fonte de vírus.

MENGELING (1986) comenta que os varrões podem ter um papel importante na disseminação do vírus durante a infecção aguda, quando o vírus pode ser eliminado por várias vias, inclusive sêmen. Portanto estes animais devem ser incluídos nos grupos a serem imunizados pois representam mais uma fonte de infecção do vírus para as leitoas susceptíveis.

O conhecimento e análise de perfil sorológico de cada plantel, tem sido descrito como de grande valia para a escolha e aplicação de medidas mais adequadas de controle e profilaxia da parvovirose suína (PERESTRELO, 1987).

Dependendo da associação de alguns fatores como o tempo em que a granja se apresenta infectada pelo vírus, manejo, tamanho do plantel taxa de renovação de matrizes, medidas de higiene e outros fatores, a distribuição do PVS entre os animais de um rebanho difere entre os plantéis. Conseqüentemente, existem diferentes situações epidemiológicas, que se traduzem por perfis sorológicos também diferentes e característicos de cada situação. Baseado nos trabalhos de VANNIER et alii (1984), PERESTRELO (1987) descreve quatro modelos epidemiológicos em relação ao PVS:

1) Plantéis em que o vírus não circula no seio da exploração e conseqüentemente as marrãs que vão substituindo as porcas descartadas não são infectadas. Deste modo, parte-se de uma situação inicial em que todas as porcas tinham uma boa imunidade contra o vírus, para uma situação ao fim de 2 a 3 anos em que o número de porcas susceptíveis é superior ao de porcas imunizadas e inesperadamente, surge um novo surto da doença. O perfil sorológico caracteriza-se por títulos heterogêneos, geralmente altos nas porcas mais velhas, que foram infectadas durante o primeiro surto da doença na granja e baixos ou negativos nos animais de terminação ou nas leitoas repostas e nas porcas mais jovens.

2) Exploração em que o vírus circula apenas entre os reprodutores do plantel e as marrãs e animais de terminação não têm contato com o vírus. O perfil sorológico desta situação é bem característico, mostrando as marrãs sorologicamente negativas e as porcas a partir do primeiro parto, com títulos altos de anticorpos.

3) Exploração em que o vírus circula em toda a granja. Neste caso, o vírus se encontra difundido dos animais de

terminação até as porcas mais velhas. O perfil sorológico caracteriza-se por títulos altos e homogêneos em todo o plantel.

4) Exploração negativa para o PVS, cujo perfil sorológico aponta títulos negativos em todo plantel.

Os modelos expressos nos itens número 1 e 2, são bastante representativos do perfil sorológico das granjas que praticam exploração industrial moderna, enquanto que a situação descrita no item número 3, representa granjas que utilizam as formas da suinocultura clássica.

VANNIER (1984) conclui que é difícil identificar exatamente a razão para a existência de situações epidemiológicas tão diferentes mas afirma que o manejo adotado em cada granja tem influência neste problema.

PERESTRELLO (1987) comenta que as variáveis que poderão explicar a existência de diferentes modelos epidemiológicos pode estar no manejo (manejo em lotes, manejo contínuo, vazão sanitário, etc.), na estrutura de cada pavilhão (valas de dejetos, etc.) e na ventilação.

Estudou-se neste trabalho, duas granjas que apresentaram perfis sorológicos diferentes. A granja A apresentou o perfil sorológico de um plantel negativo. É importante ressaltar que quando iniciou-se o estudo desta granja, a RI vinha sendo já realizado, com a finalidade de imunização das leitoas contra algumas doenças, inclusive a parvovirose suína. A falta de conhecimento da distribuição real do PVS nesta granja expunha o plantel ao risco da introdução repentina do vírus e consequentemente surto da doença, pois antes de se descobrir que a granja era negativa, acreditava-se que a RI estava protegendo as leitoas contra a parvovirose suína, o que obviamente não era verdade, já que não havia na granja nenhum animal infectado com o vírus.

A granja A poderia ser classificada como uma granja negativa, porém com risco de introdução do vírus, já que constantemente novas leitoas da granja fornecedora eram introduzi-

das para renovação do plantel. Segundo JOO & JONHSON (1977) a medida profilática indicada para esta situação seria a aplicação da vacina inativada em porcas, leitoas e machos utilizados na reprodução, com necessidade de revacinação das porcas após cada parto e dos machos de 6 em 6 meses, já que os animais deste plantel não teriam oportunidade de se infectarem naturalmente com o vírus, enquanto a granja continuasse negativa.

A granja B apresentou um perfil sorológico característico de plantéis onde o vírus circula apenas entre os reprodutores (modelo epidemiológico número 2). O GRÁF. 15 mostra que todas as leitoas testadas eram negativas na terminação e que quanto maior o número do parto das porcas, menor quantidade de porcas negativas são encontradas.

PERESTRELO (1987) indica como medida de controle ideal para esta situação a vacinação de marrãs com vacinas comerciais, com duas doses antes da primeira cobrição e com posterior acompanhamento do sistema de difusão do vírus na granja. A RI que estava sendo aí realizada, mesmo antes do conhecimento da eficiência do método, vinha substituindo esta vacinação com resultados pouco confiáveis, a medida que os títulos de anticorpos obtidos nos grupos testados mostraram variação no número de animais imunizados.

A indicação mais comum na profilaxia contra a parvovirose suína, é a imunização das leitoas antes da primeira cobrição (MENGELING, 1986). No entanto, esta medida só seria totalmente eficaz nas granjas com perfil sorológico descrito no modelo epidemiológico nº 2 que, felizmente, é representativo da maioria das granjas que adotam a suinocultura industrial moderna.

Devido à existência dos diferentes modelos epidemiológicos é importante que cada rebanho seja considerado individualmente quando se vai indicar as medidas de controle para a parvovirose suína. Se a distribuição do vírus dentro do rebanho não for conhecida, a vacina ou a RI podem ser indevidamente aplicados, resultando em um insucesso no controle da do-

ença.

O problema da escolha dos métodos de controle para a parvovirose suína gira entre duas variáveis: segurança e custo. A vacina oferece a garantia da imunização da maioria dos animais porém com custo elevado e a RI é de baixo custo mas, da maneira como tem sido realizado nas granjas, não oferece segurança.

WRATHALL (1988) descreve que o custo de uma dose de vacina gira entre sete libras esterlinas por animal e DOUGLAS (1984) mostra que o preço de uma dose da vacina de parvovirose suína é 25 vezes superior ao da vacina de erisipela suína e 6 vezes maior que o custo de uma dose de vacina de rinite atrófica. Porém, o que deve ser analisado, são os benefícios econômicos obtidos com a aplicação da vacina.

O custo efetivo da utilização da vacina em um rebanho negativo, sob risco de infecção é alto, porém em um rebanho onde os animais têm oportunidade de se infectarem naturalmente antes da cobertura, é nulo. Entre estes dois extremos, os plantéis devem ser considerados individualmente, baseados na performance reprodutiva e perfil sorológico dos animais.

PARSONS et alii (1986) avaliaram os benefícios econômicos de um programa de vacinação contra a parvovirose suína em rebanhos dos Estados Unidos, através de um modelo estatístico teórico (análise de decisão) e concluíram que este programa traria ganhos econômicos, mesmo com o custo da vacinação calculado em nove dólares por cabeça.

Porém, WRATHALL (1988) avaliando o custo efetivo da utilização de uma vacina inativada contra a parvovirose suína em 1243 animais, pertencentes a 12 rebanhos, observou que a análise da performance reprodutiva de todos os animais juntos, não mostrou diferença estatística entre os índices alcançados por animais vacinados e não vacinados. No entanto, analisando os mesmos índices dentro de cada rebanho, constatou que o uso da vacina apresentou vantagens econômicas para alguns deles. O autor concluiu que como os rebanhos variam em relação a presen

ça ou ausência do PVS e a distribuição da infecção, a vacinação deve ser usada com discriminação para que se obtenha um custo benefício mais alto.

O presente trabalho mostrou que o acompanhamento sorológico dos grupos imunizados e o conhecimento do perfil sorológico e performance reprodutiva da granja podem dar maior segurança ao método da RI. Porém, o uso indiscriminado deste método, pode trazer consequências graves, seja pelos prejuízos causados pelas leitoas não imunizadas durante o processo ou pelo envolvimento de outros agentes infecciosos nos problemas reprodutivos da granja, que põem em risco a saúde de todo o plantel.

Para complementação dos resultados encontrados neste trabalho sugere-se como prioridade para futuras pesquisas os seguintes itens:

- . produção da suspensão viral para vacinas em células da linhagem contínua.

- . desafio de leitoas gestantes previamente vacinadas com a vacina experimental e paralelamente pesquisa da eficiência da vacina em animais de laboratório, através de testes sorológicos.

- . acompanhamento sorológico de outros grupos de leitoas submetidos à RI na granja estudada, com o objetivo de observar a variação no número de leitoas imunizadas após a RI.

- . acompanhamento sorológico de leitoas submetidas à RI, pertencentes a diferentes granjas, com o objetivo de avaliar o risco e a eficiência deste método como medida preventiva, em diferentes plantéis.

5. CONCLUSÕES

1) A vacina produzida foi capaz de estimular resposta imune em 88,68% dos suínos vacinados, que baseados em resultados de outros autores estariam protegidos contra a infecção.

2) A vacina induziu títulos inibidores da hemoaglutinação que variaram de 1:40 a 1:1280, sendo que o mais frequentemente observado foi 1:80.

3) A administração da segunda dose da vacina foi importante para aumentar o título de anticorpos e a porcentagem de animais que responderam à vacina, 15 dias após a última vacinação.

4) Apesar de não ser estatisticamente diferente 15 dias após a última vacinação, o intervalo de 21 dias entre as vacinações resultou em títulos inibidores da hemoaglutinação mais altos que o de 15 dias, porém com porcentagem semelhante de resposta à vacina.

5) A utilização do FB como técnica de imunização, sem o devido conhecimento e acompanhamento sorológico, é pouco confiável sendo esse procedimento portanto, indispensável para avaliar a eficiência do método.

6) Em uma granja com manejo e perfil sorológico característicos da Granja B, a RI realizada com restos de placen

ta, fetos mumificados e natimortos provenientes de porcas acima de terceiro parto, apresenta baixa eficiência na imunização de leitoas. Por outro lado, a RI realizada com material proveniente de porcas jovens (primeiro e segundo parto) proporciona taxas altas de soroconversão nas leitoas imunizadas.

7) O conhecimento da distribuição do vírus no plantel através da elaboração do perfil sorológico da granja e análise da performance reprodutiva, ajuda a aumentar a confiabilidade dos métodos de controle já empregados ou a serem empregados em diferentes plantéis, através da análise da sua eficiência.

8) O uso do FB em uma granja sorologicamente negativa para brucelose e Doença de Aujeszky, regularmente vacinada contra leptospirose, erisipela e peste suína clássica, não trouxe o aparecimento de problema sanitário para o plantel. Porém, existe risco de se utilizar a RI em granjas com condições sanitárias diferentes das da granja estudada ou em grupos com qq. tipo de controle sanitário, que não tenha o devido acompanhamento técnico.

TABELA I - Títulos inibidores da hemoaglutinação, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias em cobaias vacinadas e revacinadas com a partida 1, com intervalo de 21 dias (grupo P₁)

Identificação do animal	Título IH		
	Antes da 1ª vacinação	Dia da 2ª vacinação	15 dias após 2ª vacinação
1	1:320	1:320	1:640
2	1:320	1:320	1:2560
3	1:640	1:640	≥ 1:10240
4	1:320	1:160	1:160
5	1:320	1:160	1:5120
6	1:320	1:320	1:5120
7	1:640	1:1280	1:5120
8	1:320	1:320	1:320
9	1:320	1:640	≥ 1:10240
10	1:320	1:160	≥ 1:10240
11*	1:160	1:320	1:320
12*	1:160	1:160	1:320
13*	1:320	1:320	1:160
14*	1:320	1:160	1:320
15*	1:160	1:320	1:160

* Controles não vacinados.

TABELA II - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em leitões vacinados e revacinados com a partida 2, com intervalo de 21 dias (grupo P₂)

Identificação dos animais*	T í t u l o I H			
	Antes da 1ª vacinação	Dia da 2ª vacinação	15 dias após 2ª vacinação	75 dias após 2ª vacinação
1	< 1:5	1:40	1:320	NR**
2	< 1:5	1:40	1:320	1:160
3	< 1:5	1:10	1:160	NR
4	< 1:5	1:20	1:160	NR
5	< 1:5	1:40	1:160	NR
6	< 1:5	NEG	1:320	1:160
7	< 1:5	1:40	1:320	1:160
8	1:20	1:20	1:80	1:40
9	< 1:5	1:20	1:320	1:80
10	< 1:5	1:20	1:320	1:80
11 *	< 1:5	< 1:5	< 1:5	NR
12 *	< 1:5	< 1:5	1:20	NR
13 *	< 1:5	< 1:5	1:10	NR
14 *	< 1:5	1:10	1:10	NR
15 *	< 1:5	1:10	1:10	NR

* = Controles não vacinados.

** NR = não realizado.

TABELA III - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias em leitões vacinados e revacinados com a partida 3, com intervalo de 15 dias (grupo P₃G₁)

Número de animais (%) [*]	Título IH		
	Antes da 1ª vacinação	No dia da 2ª vacinação	15 dias após vacinação
1 (3,23)	1:20	< 1:5	1:20
1 (3,23)	< 1:5	< 1:5	1:40
2 (6,45)	< 1:5	1:80	1:40
2 (6,45)	< 1:5	1:160	1:40
4 (12,90)	< 1:5	1:20	1:80
1 (13,23)	< 1:5	< 1:5	1:80
5 (16,12)	< 1:5	1:40	1:80
4 (12,90)	< 1:5	1:80	1:80
1 (3,23)	1:10	1:80	1:80
1 (3,23)	< 1:5	< 1:5	1:160
4 (12,90)	< 1:5	1:40	1:160
2 (6,45)	< 1:5	1:80	1:160
1 (3,23)	< 1:5	1:160	1:160
1 (3,23)	1:20	1:160	1:160
1 (3,23)	< 1:5	1:80	1:320
Total = 31			

* = O grupo controle não vacinado apresentou média de títulos de anticorpos = < 1:5, nas três sorologias realizadas.

TABELA IV - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologia, em porcas vacinadas e revacinadas com a partida 3, com intervalo de 21 dias (grupo P₃G₂)

Número de animais (%)*	Título IH		
	Antes da 1ª vacinação	No dia da 2ª vacinação	15 dias após 2ª vacinação
1 (3,45)	< 1:5	< 1:5	< 1:5
1 (3,45)	< 1:5	1:10	< 1:5
1 (3,45)	1:10	1:10	< 1:5
1 (3,45)	< 1:5	1:10	1:10
1 (3,45)	< 1:5	1:20	< 1:5
1 (3,45)	1:5	1:20	1:20
2 (6,90)	< 1:5	< 1:5	1:40
8 (27,53)	< 1:5	< 1:5	1:80
2 (6,90)	< 1:5	1:10	1:80
3 (10,34)	< 1:5	1:20	1:80
1 (3,45)	1:10	1:10	1:80
1 (3,45)	1:20	< 1:5	1:160
1 (3,45)	< 1:5	< 1:5	1:160
3 (10,34)	< 1:5	1:10	1:160
1 (3,45)	1:20	1:20	1:320
1 (3,45)	< 1:5	1:40	1:640
Total = 29			

* = 0 grupo controle não vacinado apresentou média de títulos de anticorpos = < 1:5, nas três sorologias realizadas.

TABELA V - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em leitoas vacinadas e revacinadas com a partida 4, com intervalo de 15 dias (grupo P₄G₁)

Número de animais (%) [*]	Título IH		
	Antes da 1ª vacinação	No dia da 2ª vacinação	15 dias após 2ª vacinação
3 (15,00)	< 1:5	< 1:5	< 1:5
2 (10,00)	< 1:5	< 1:5	1:40
1 (5,00)	< 1:5	1:10	1:40
1 (5,00)	< 1:5	1:40	1:40
1 (5,00)	1:20	1:40	1:40
1 (5,00)	< 1:5	1:160	1:40
1 (5,00)	1:10	< 1:5	1:40
3 (15,00)	< 1:5	< 1:5	1:80
2 (10,00)	< 1:5	1:40	1:80
1 (5,00)	1:10	< 1:5	1:80
1 (5,00)	< 1:5	1:160	1:80
1 (5,00)	< 1:5	1:80	1:160
1 (5,00)	< 1:5	< 1:5	1:160
1 (5,00)	< 1:5	1:20	1:160
Total = 20			

* = 0 grupo controle não vacinado apresentou média de títulos de anticorpos = < 1:5, nas três sorologias realizadas.

TABELA VI - Títulos inibidores da hemoaglutinação individuais, obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias, em leitoas vacinadas e revacinadas com a partida 4, com intervalo de 21 dias (grupo P₄G₂)

Número de animais (%) [*]	Título IH		
	Antes da 1ª vacinação	No dia da 2ª vacinação	15 dias após 2ª vacinação
2 (12,5)	< 1:5	< 1:5	< 1:5
1 (6,25)	< 1:5	1:20	1:40
4 (25,00)	< 1:5	< 1:5	1:80
1 (6,25)	< 1:5	< 1:5	1:160
1 (6,25)	< 1:5	1:160	1:160
2 (12,5)	< 1:5	< 1:5	1:320
2 (12,5)	< 1:5	1:10	1:320
1 (6,25)	< 1:5	1:20	1:320
1 (6,25)	< 1:5	< 1:5	1:640
1 (6,25)	< 1:5	< 1:5	1:1280
Total : 16			

* = 0 grupo controle não vacinado apresentou média de títulos de anticorpos = < 1:5, nas três sorologias realizadas.

TABELA VII - Médias dos títulos inibidores da hemoaglutinação obtidos na primeira, segunda e terceira sorologias dos grupos P₂, P₃G₁, P₃G₂, P₄G₁ e P₄G₂

Grupo	Média de título IH		
	1ª sorologia	2ª sorologia	3ª sorologia
P ₂	< 1:5	1:25	1:248
P ₃ G ₁	< 1:5	1:37	1:102
P ₃ G ₂	< 1:5	1:8,7	1:103
P ₄ G ₁	< 1:5	1:28	1:66
P ₄ G ₂	< 1:5	1:13,75	1:262,5

TABELA VIII - Porcentagem de resposta e títulos inibidores da hemaglutinação obtidos aos 15 dias após a última vacinação, nos vários grupos e no total dos animais vacinados com as diferentes partidas da vacina experimental

Grupo	Nº total de animais	Títulos IH 15 dias após última vacinação						% de resposta	
		≤ 1:20*	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640		1:1280
P ₂	10	0	0	1 (10,00%)	3 (30,00%)	6 (60,00%)	0	0	100,00
F _{3G1}	31	1 (3,23%)	5 (16,13%)	15 (48,39%)	9 (29,03%)	1 (3,23%)	0	0	96,17
P _{3G2}	29	6 (20,69%)	2 (6,90%)	14 (48,27%)	5 (17,24%)	1 (3,45%)	1 (3,45%)	0	79,32
P _{4G1}	20	3 (15,00%)	7 (35,00%)	7 (35,00%)	3 (15,00%)	0	0	0	85,00
P _{4G2}	16	2 (12,50%)	1 (6,25%)	4 (25,00%)	2 (12,50%)	5 (31,25%)	1 (6,25%)	1 (6,25%)	87,50
Total	106	12 (11,32%)	15 (14,15%)	41 (38,68%)	22 (20,75%)	13 (12,26%)	2 (1,89%)	1 (0,94%)	88,68

* Títulos considerados negativos.

TABELA IX - Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação verificados na segunda e terceira sorologias e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG1

Títulos IH	Número de animais (%)		
	1ª sorologia*	2ª sorologia	3ª sorologia
≤ - 1:20	-	24 (85,71)	24 (85,71)
1:40 - 1:80	-	0	0
1:160 - 1:320	-	1 (3,57)	1 (3,57)
1:640 - 1:1280	-	1 (3,57)	1 (3,57)
1:2560 - 1:5120	-	2 (7,14)	2 (7,14)
% positivos	-	14,28	14,28

* = Não realizada.

TABELA X - Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação verificados na primeira, segunda e terceira sorologia e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG2

Títulos IH	Número de animais (%)		
	1ª sorologia	2ª sorologia	3ª sorologia
≤ 1:20	24 (96,00)	22 (88,00)	20 (80,00)
1:40 - 1:80	0	0	1 (4,00)
1:160 - 1:320	0	1 (4,00)	1 (4,00)
1:640 - 1:1280	1 (4,00)	2 (8,00)	3 (12,00)
% positivos	4,00	12,00	20,00

TABELA XI - Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação, verificados na primeira, segunda e terceira sorologias e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG3

Títulos IH	Número de animais (%)		
	1ª sorologia	2ª sorologia	3ª sorologia
≤ 1:20	19 (90,47)	3 (14,28)	0
1:40 - 1:80	1 (4,76)	6 (28,57)	0
1:160 - 1:320	1 (4,76)	6 (28,57)	4 (19,04)
1:640 - 1:1280	0	5 (23,80)	12 (57,12)
1:2560 - 1:5120	0	1 (4,76)	5 (23,80)
% positivos	9,52	85,71	100,00

TABELA XII - Frequência dos títulos inibidores da hemoaglutinação, verificados na primeira, segunda e terceira sorologias e porcentagem de animais positivos nestas ocasiões, observados nos animais do grupo RIG4

Títulos IH	Número de animais (%)		
	1ª sorologia	2ª sorologia	3ª sorologia
≤ 1:20	11 (52,38)	9 (42,86)	9 (42,86)
1:40 - 1:80	1 (4,76)	1 (4,76)	0
1:160 - 1:320	6 (28,57)	4 (19,05)	6 (28,57)
1:640 - 1:1280	3 (14,29)	6 (28,57)	5 (23,81)
1:2560 - 1:5120	0	1 (4,76)	1 (4,76)
% positivos	47,62	57,14	57,14

TABELA XIII - Performance reprodutiva de animais do primeiro ao quarto parto, sangra dos para a elaboração do perfil sorológico da granja B.

P o r c a s	Nascidos		% natimortos	% mumificados	% ninhadas ≤ 6
	total	Nascidos vivos			
1º parto (n = 25)	9,36	8,32	5,12	5,98	28,00
2º parto (n = 38)	9,26	8,89	1,98	1,98	23,60
3º parto (n = 18)	10,88	10,38	3,57	1,02	5,55
4º parto (n = 14)	12,14	11,71	2,94	0,58	7,14

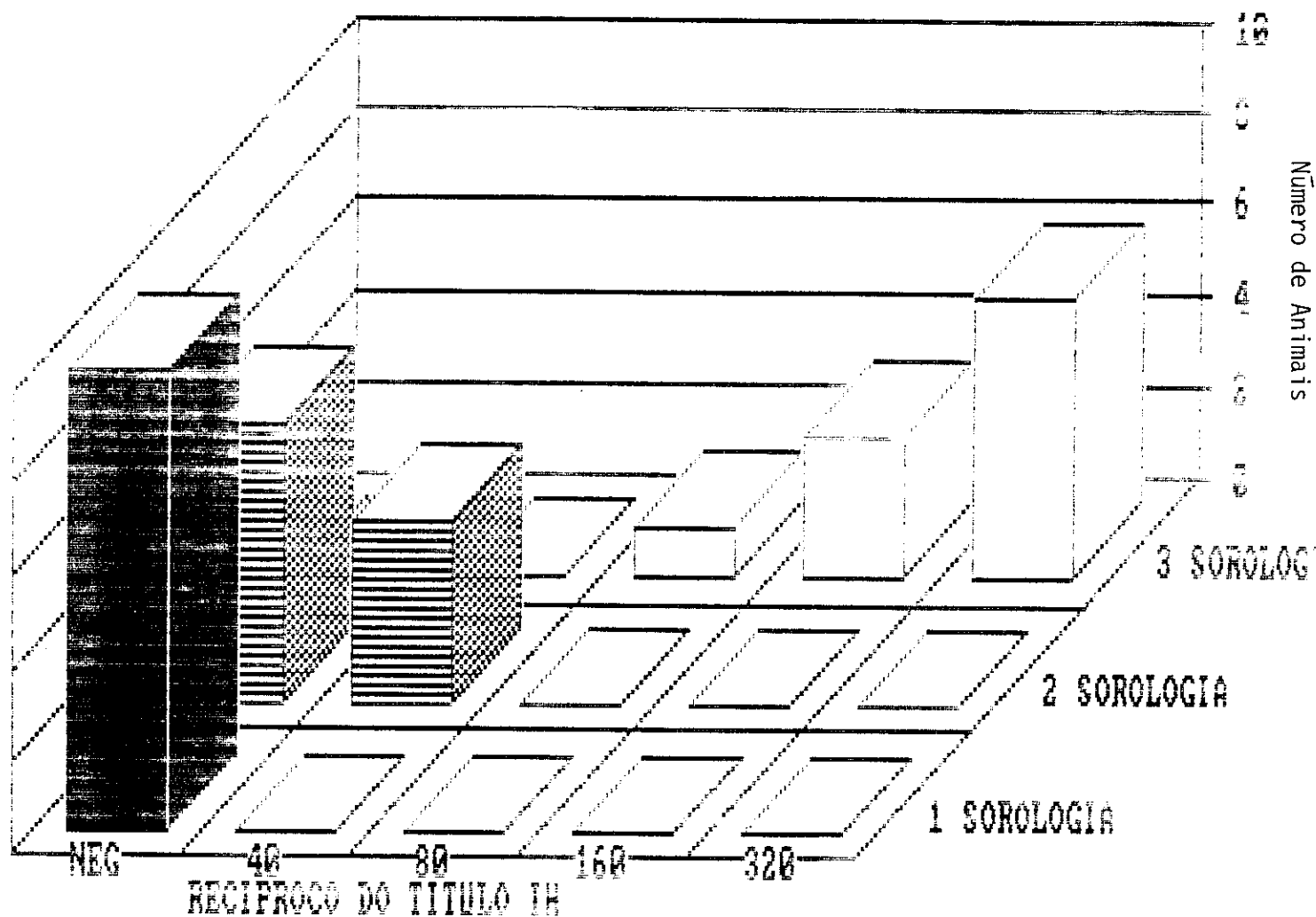


GRÁFICO 1 - Distribuição dos animais do grupo P2, segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

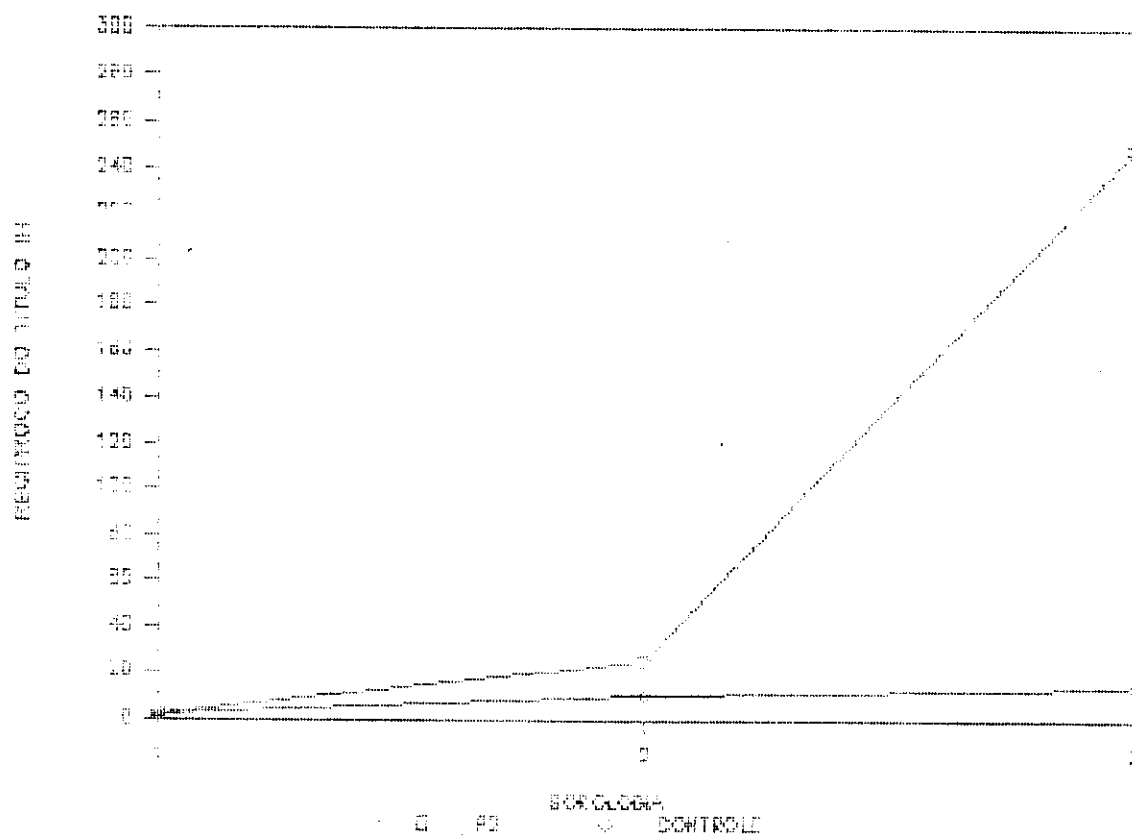


GRÁFICO 2 - Médias dos títulos de anticorpos obtidos pelos animais do grupo P2 e do grupo controle no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

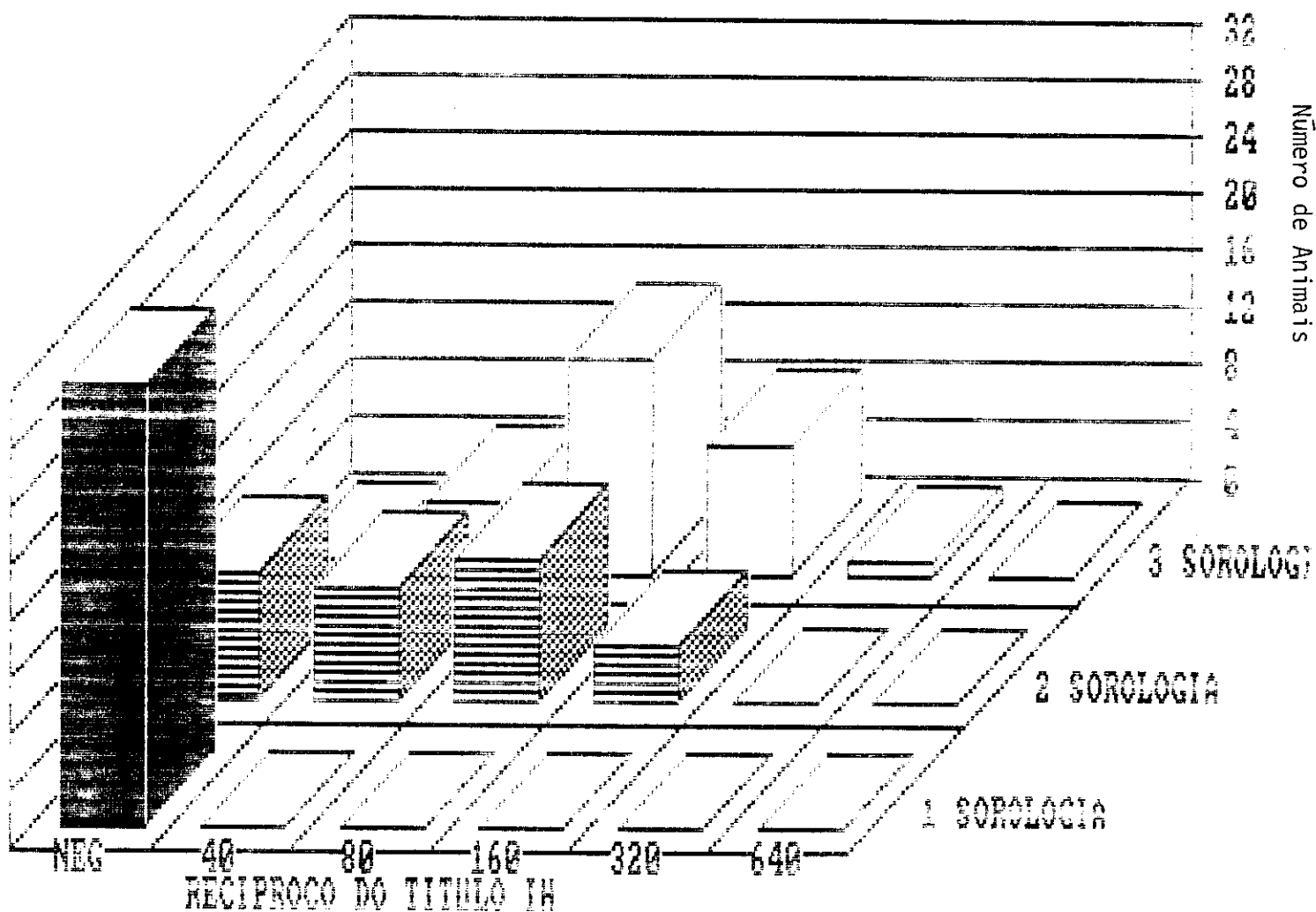


GRÁFICO 3 - Distribuição dos animais do grupo P3G1, segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

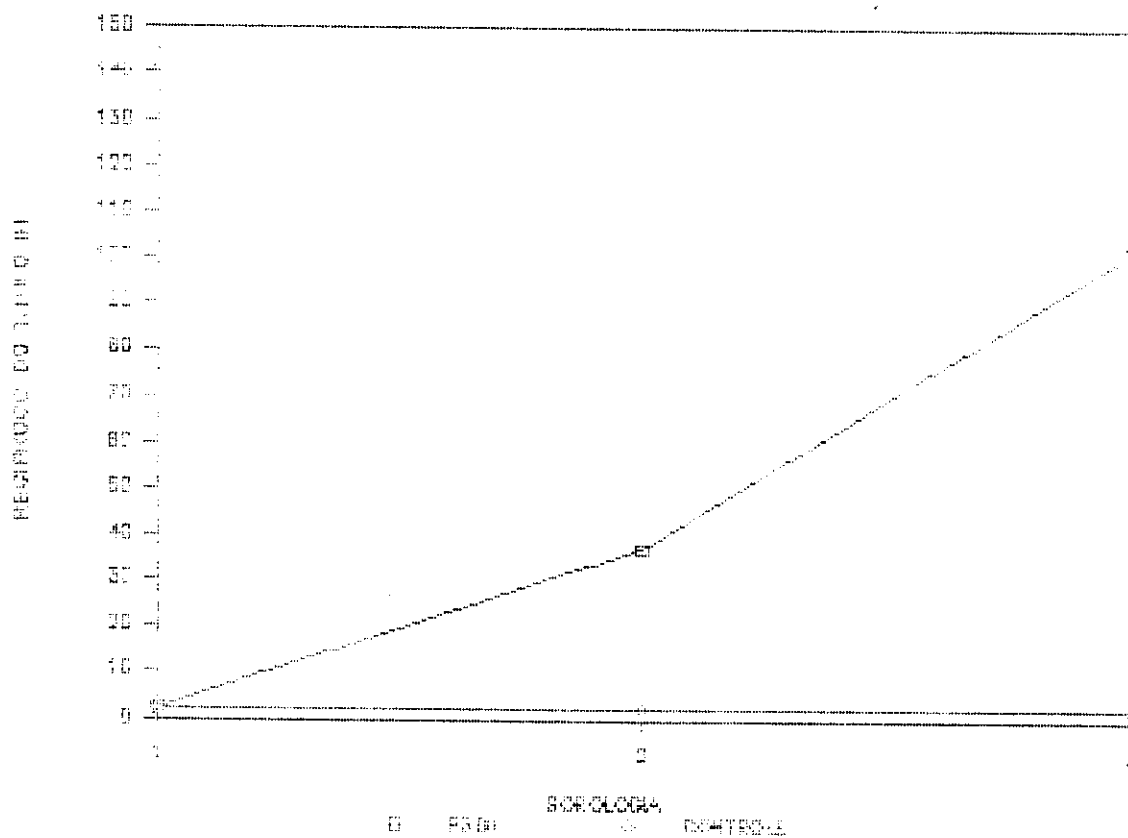


GRÁFICO 4 - Médias dos títulos de anticorpos obtidas pelos animais do grupo P3G1 e do grupo controle no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

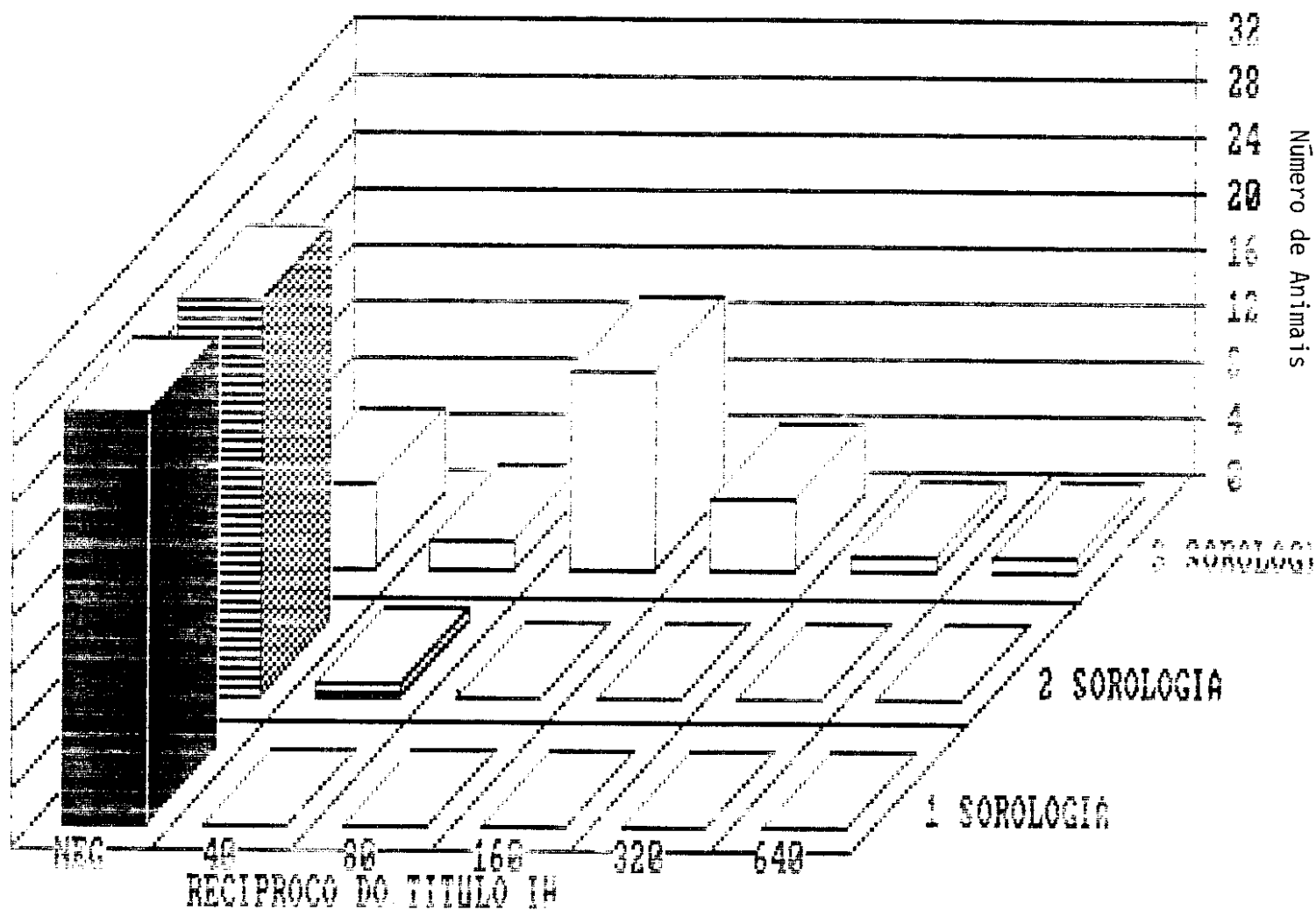


GRÁFICO 5 - Distribuição dos animais do grupo P3G2, segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

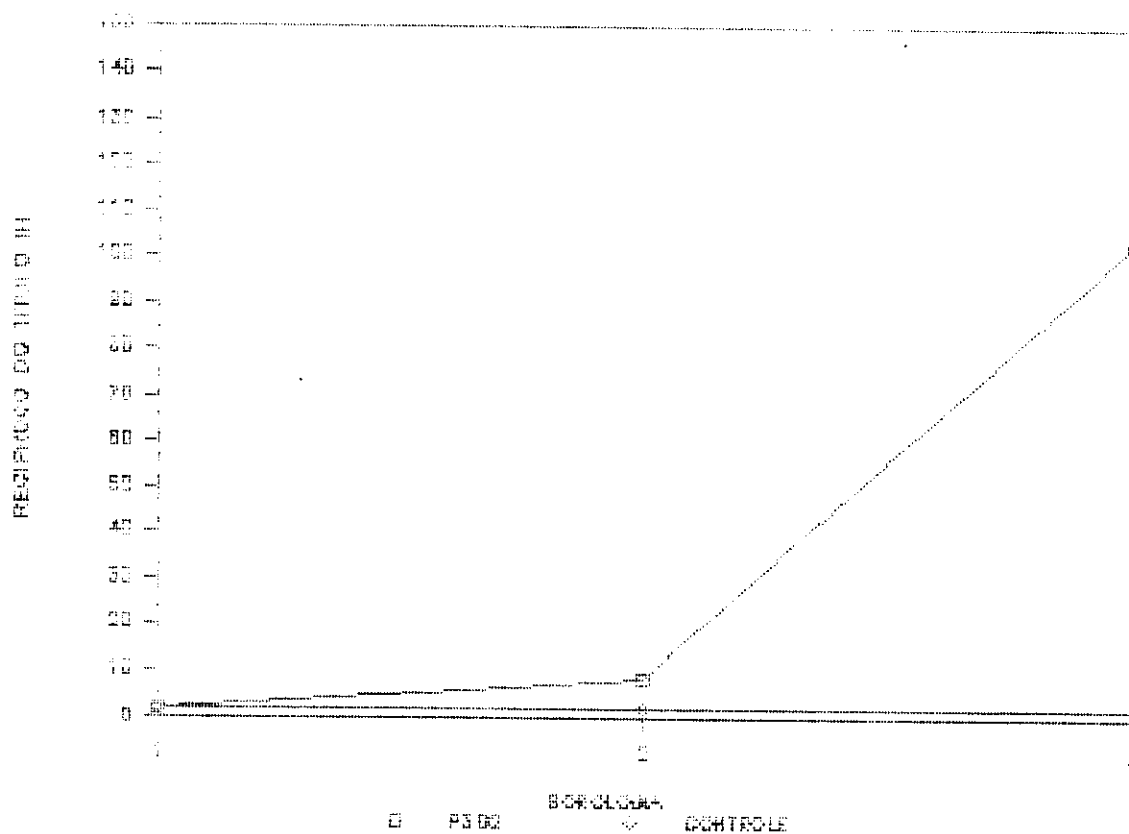


GRÁFICO 6 - Médias dos títulos de anticorpos obtidos pelos animais do grupo P3G2 e do grupo controle, no dia da primeira vacinação (1ª sorologia) no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

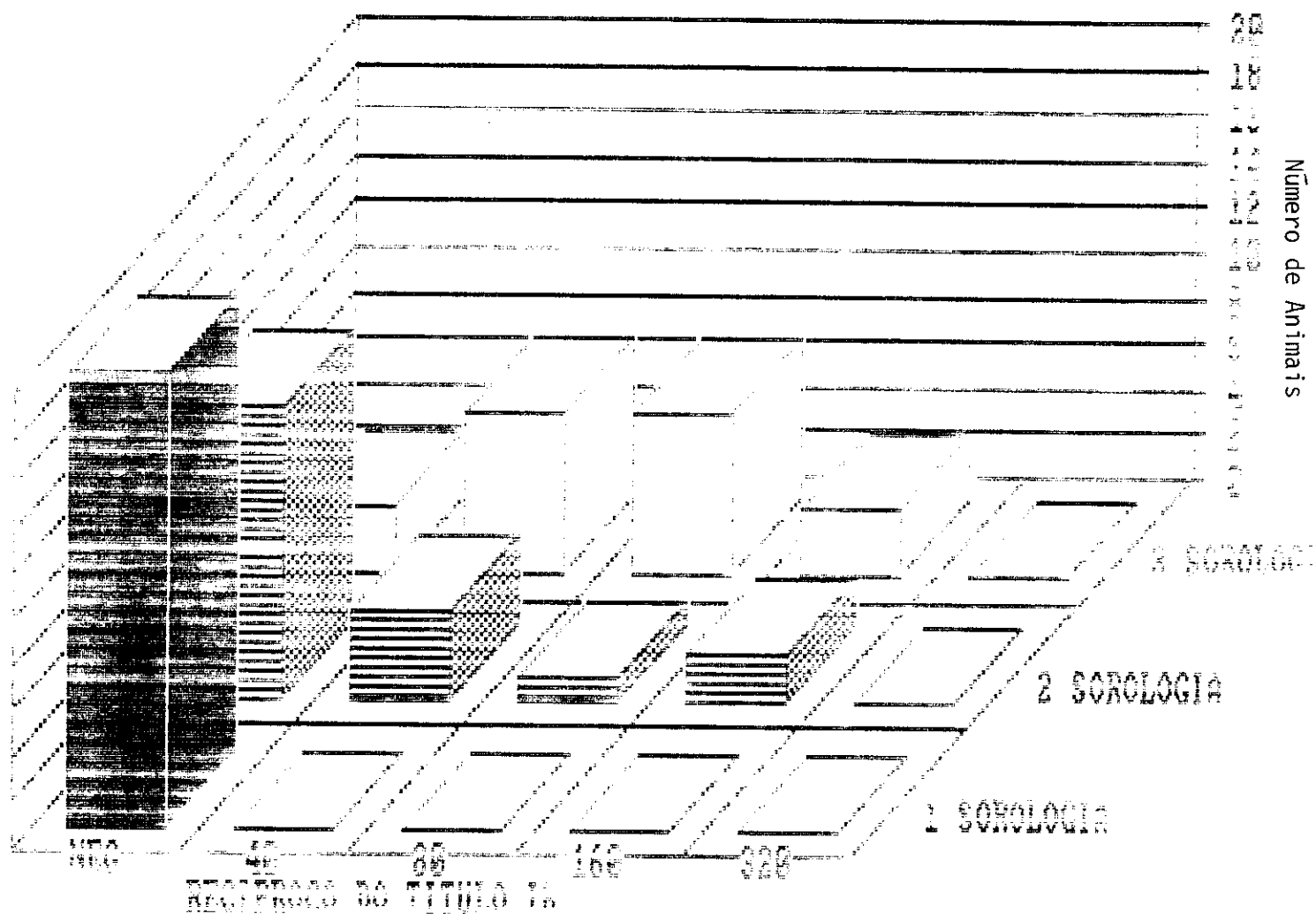


GRÁFICO 7 - Distribuição dos animais do grupo P4G1, segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

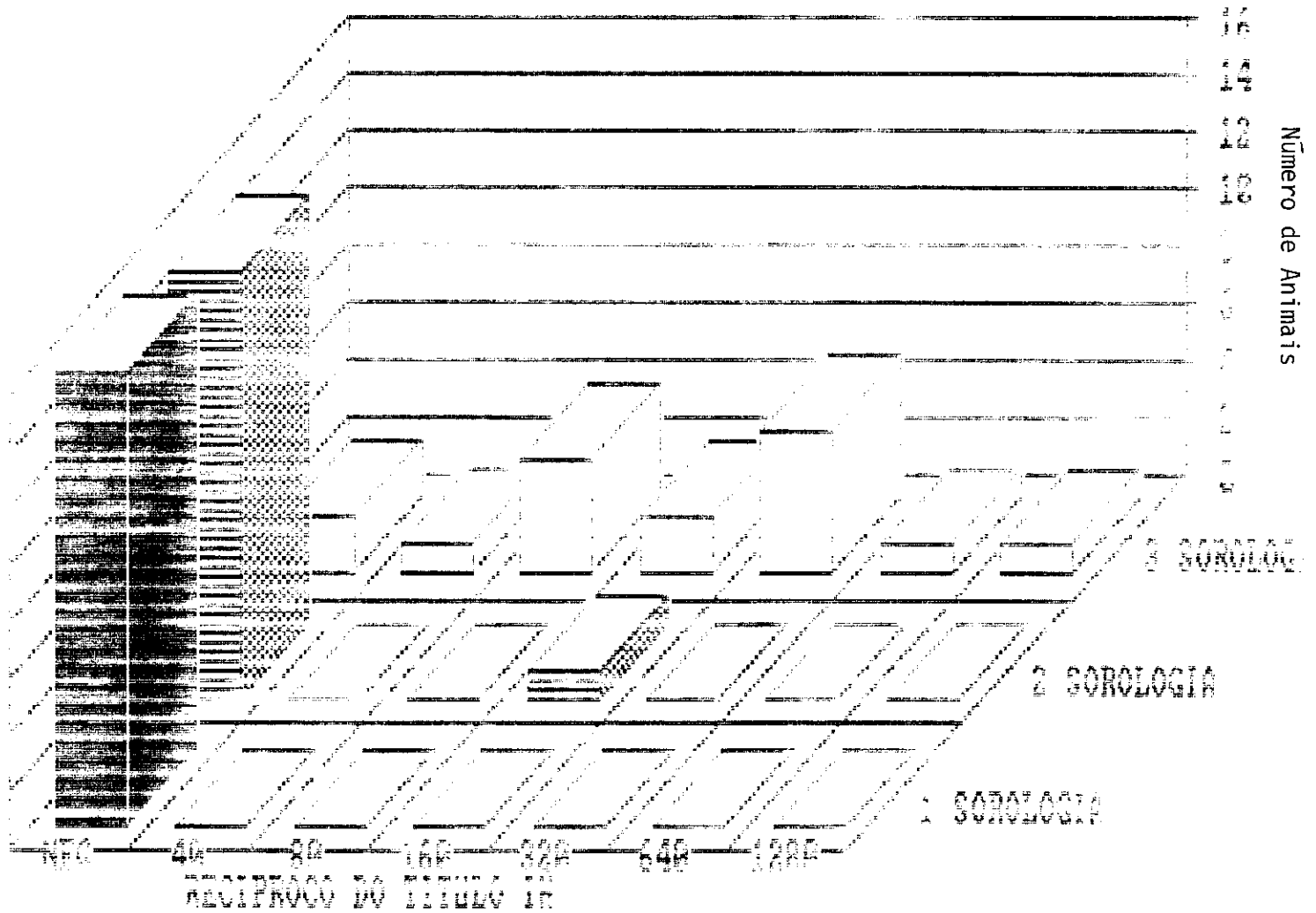


GRÁFICO 8 - Distribuição dos animais do grupo P4G2, segundo os títulos de anticorpos encontrados no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

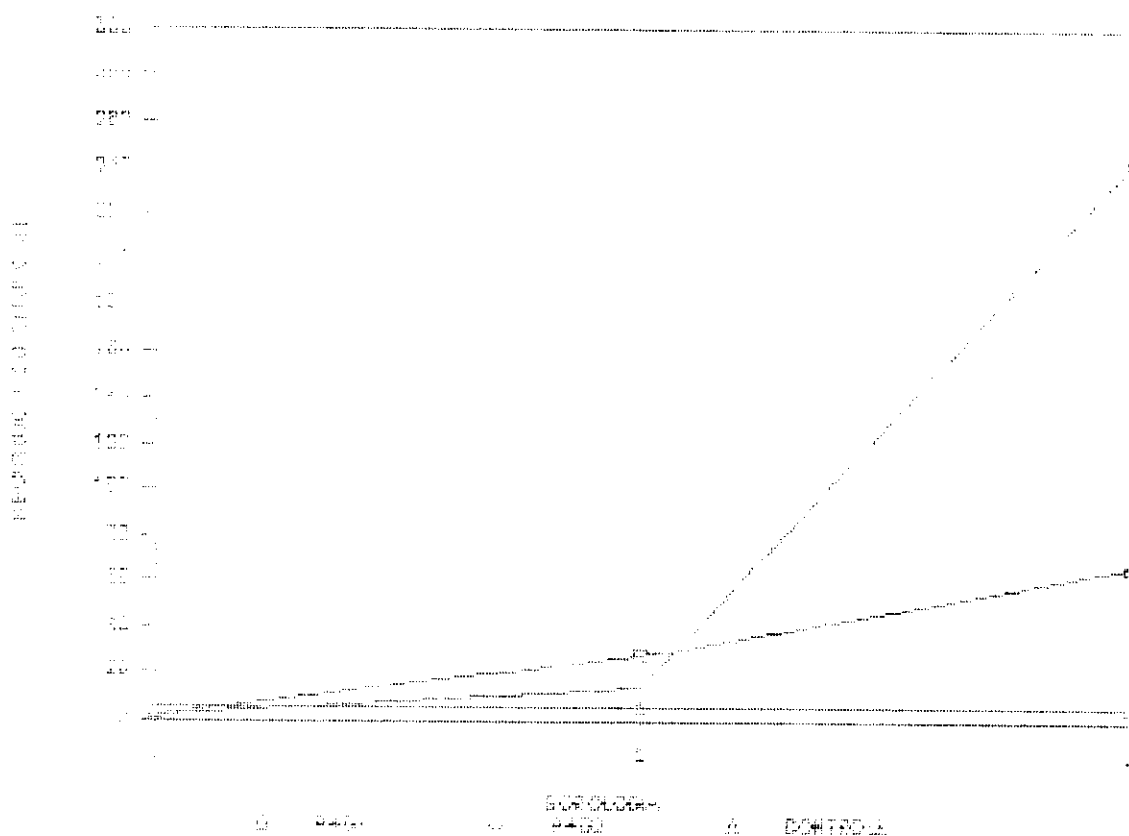


GRÁFICO 9 - Média dos títulos de anticorpos obtidas pelos animais dos grupos P4G1, P4G2 e grupo controle, no dia da primeira vacinação (1ª sorologia), no dia da segunda (2ª sorologia) e quinze dias após segunda vacinação (3ª sorologia).

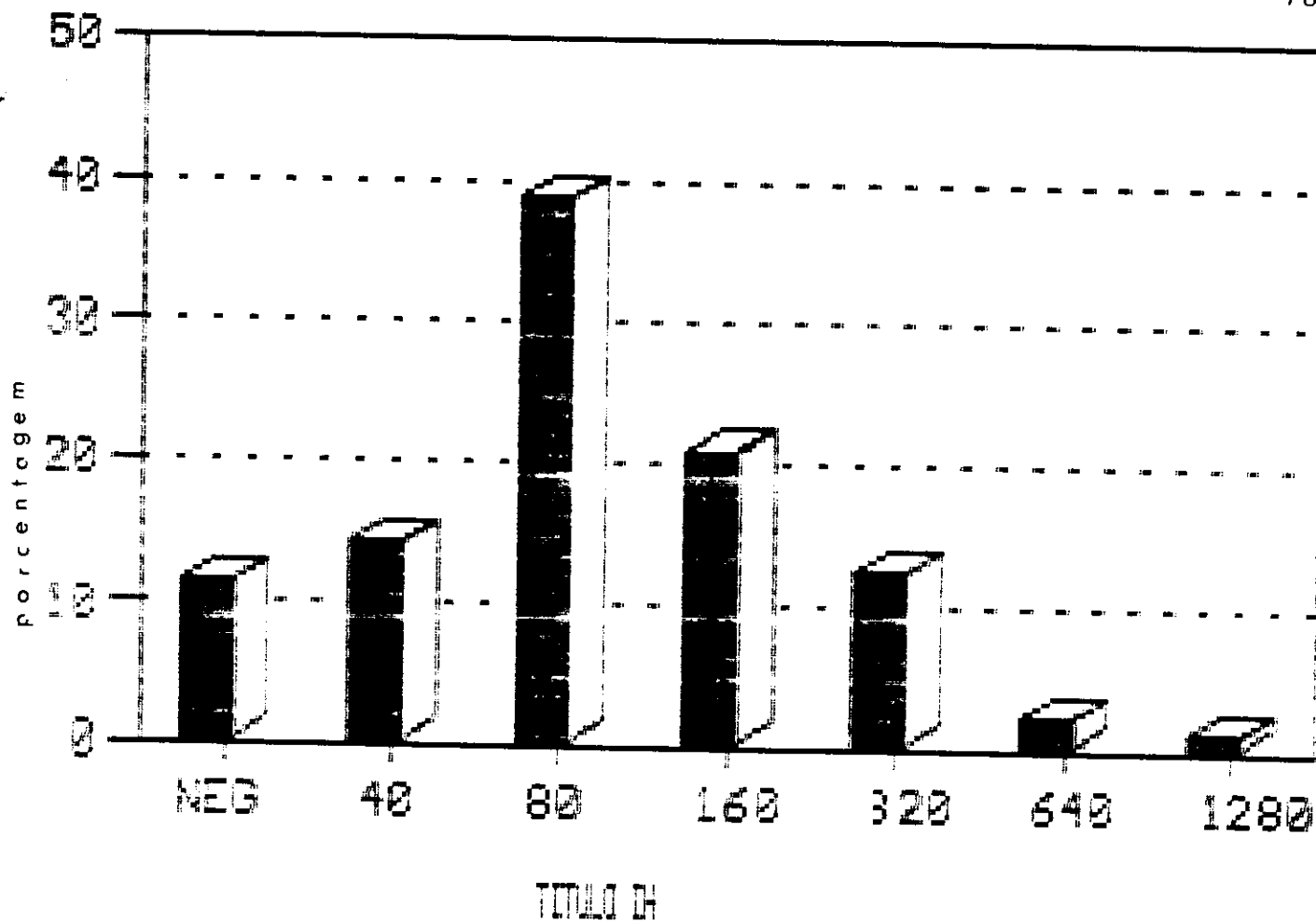


GRÁFICO 10 - Distribuição dos títulos de anticorpos encontrados quinze dias após a última vacinação, nos 106 suínos pertencentes aos grupos P2, P3G1, P3G2, P4G1 e P4G2.

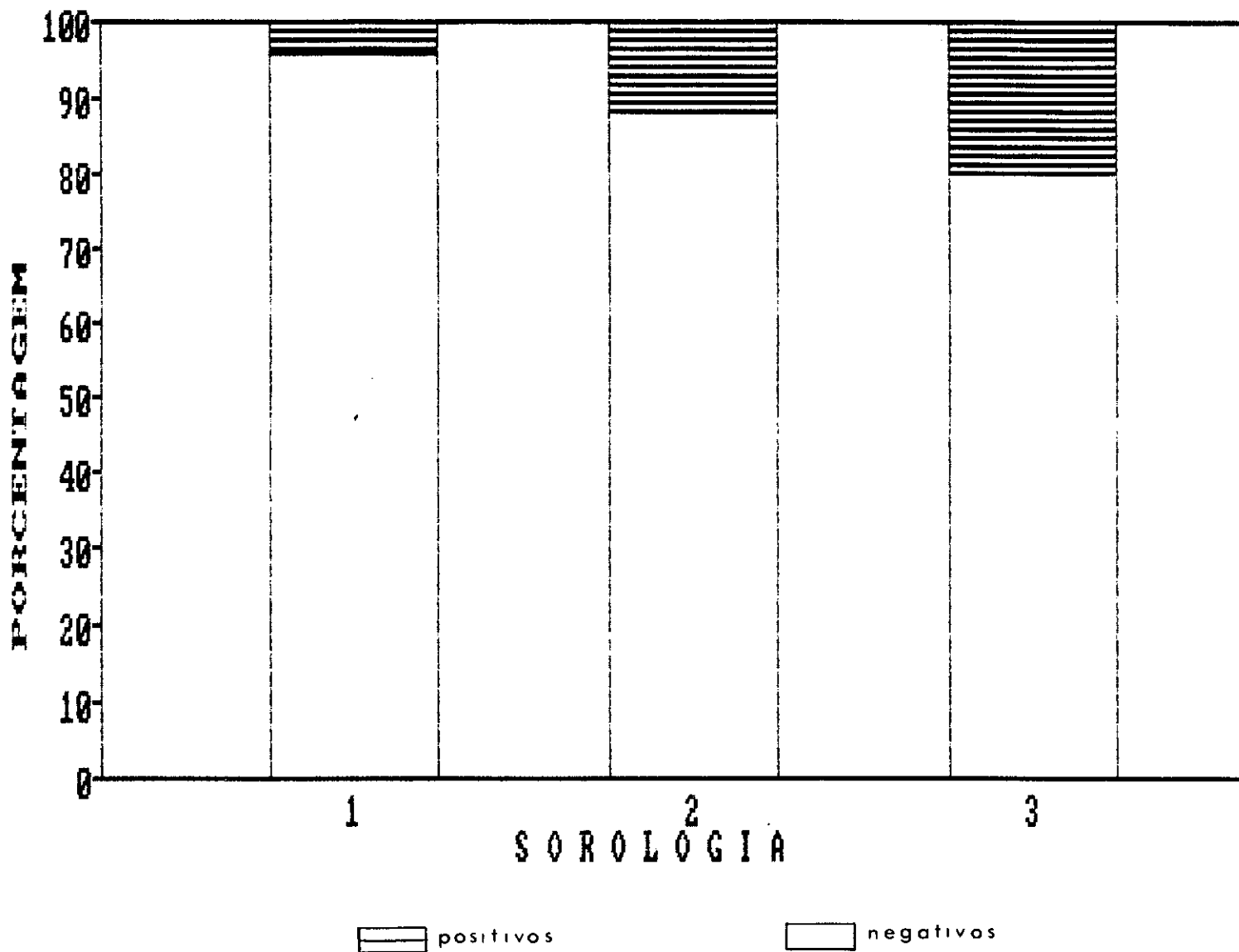


GRÁFICO 11 - Percentagem de animais do grupo FBG2 sorologicamente positivos para o parvovírus suíno no dia do início (1ª sorologia no dia do término (2ª sorologia) e quinze dias após o término da "retroinfecção" (3ª sorologia).

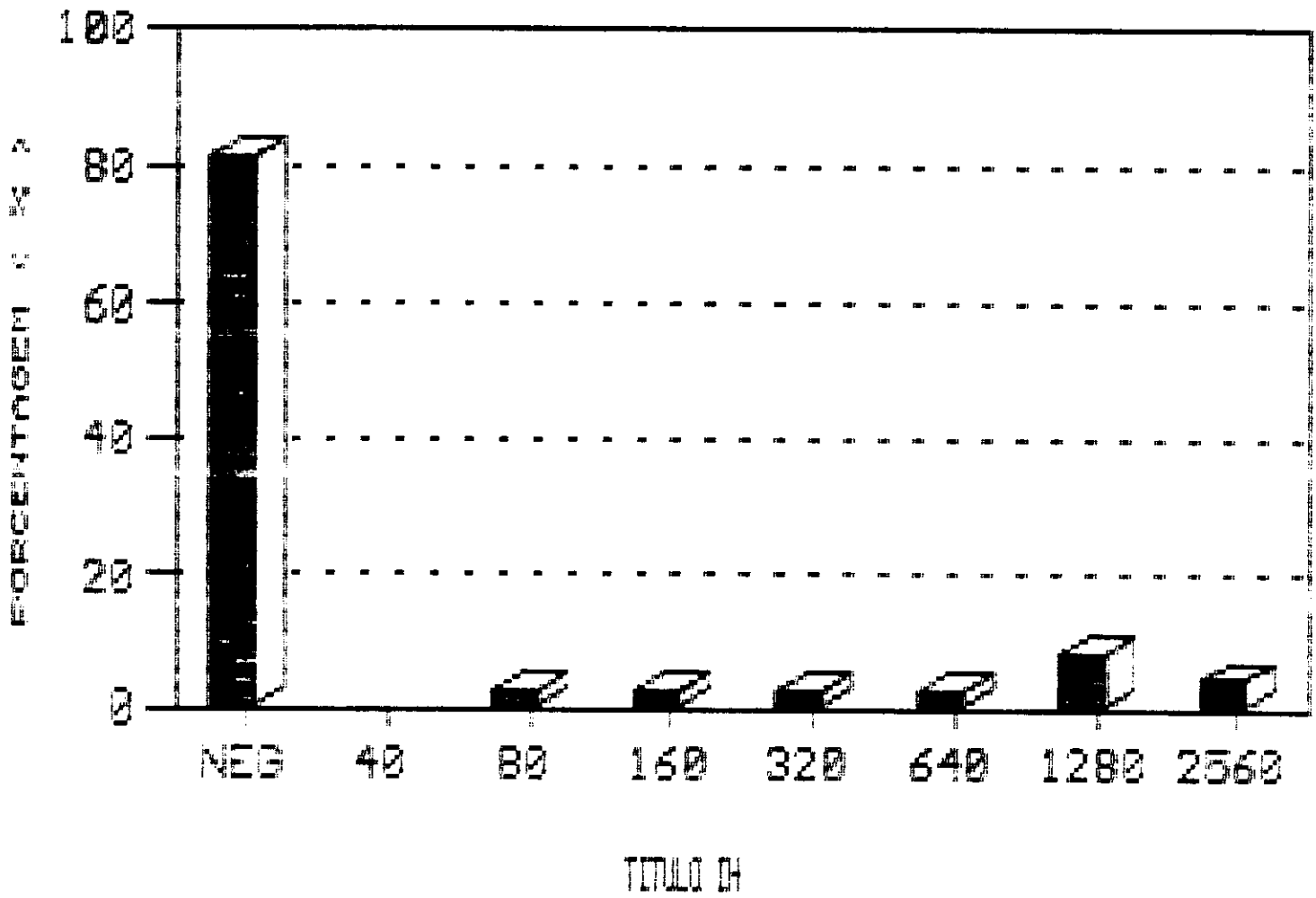


GRÁFICO 12 - Distribuição dos títulos de anticorpos encontrados quinze dias após o término da "retroinfecção", nas 53 leituras dos grupos RIG1 e FBG2.



GRÁFICO 13 - Percentagem de animais do grupo RIG3, sorologicamente positivos para o parvovírus suíno no dia do início (1ª sorologia) no dia do término (2ª sorologia) e quinze dias após o término da "retroinfecção" (3ª sorologia).

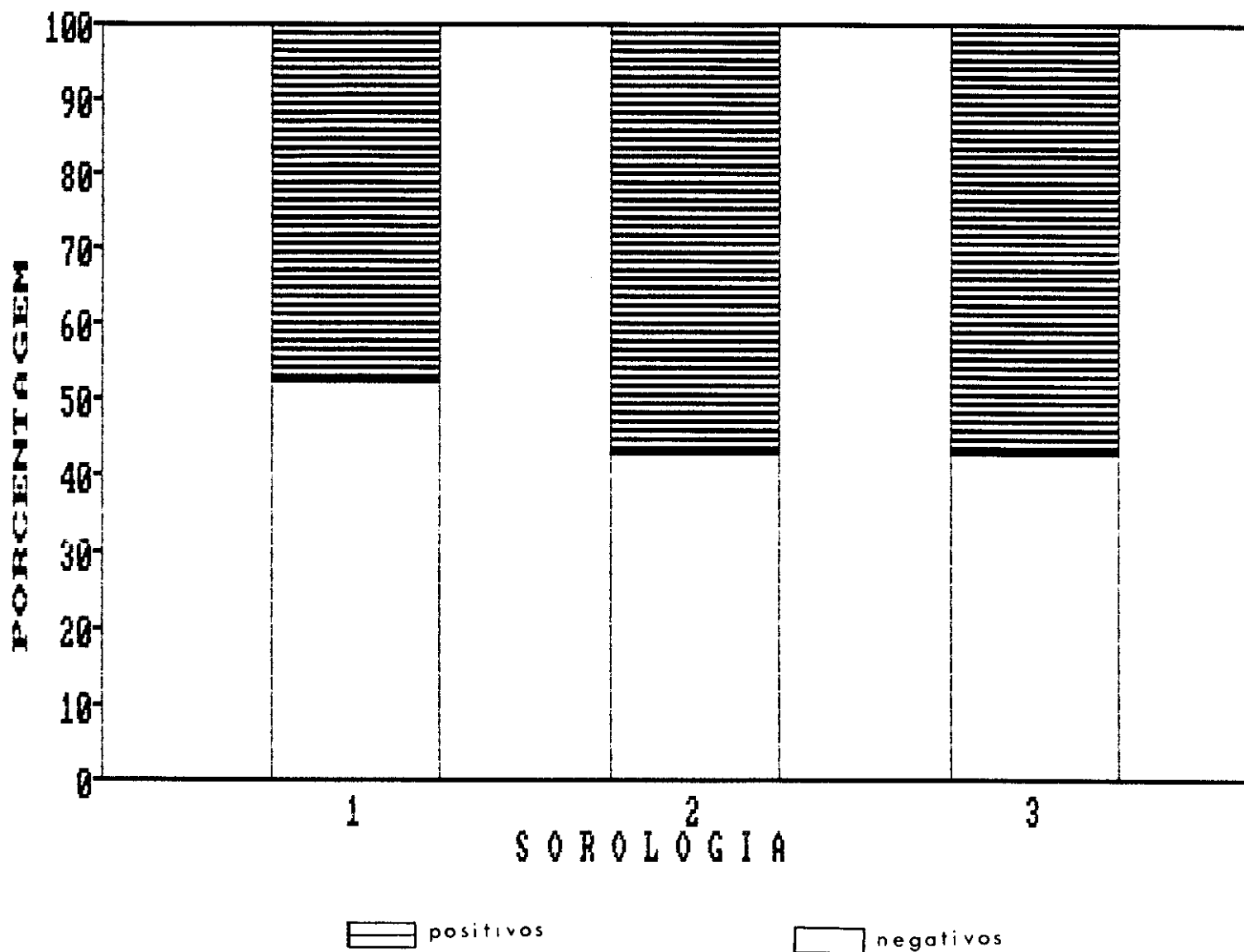


GRÁFICO 14 - Porcentagem de animais do grupo RIG4, sorologicamente positivos para o parvovírus suíno no dia do início (1ª sorologia no dia do término (2ª sorologia) e quinze dias após o término da "retroinfecção" (3ª sorologia).

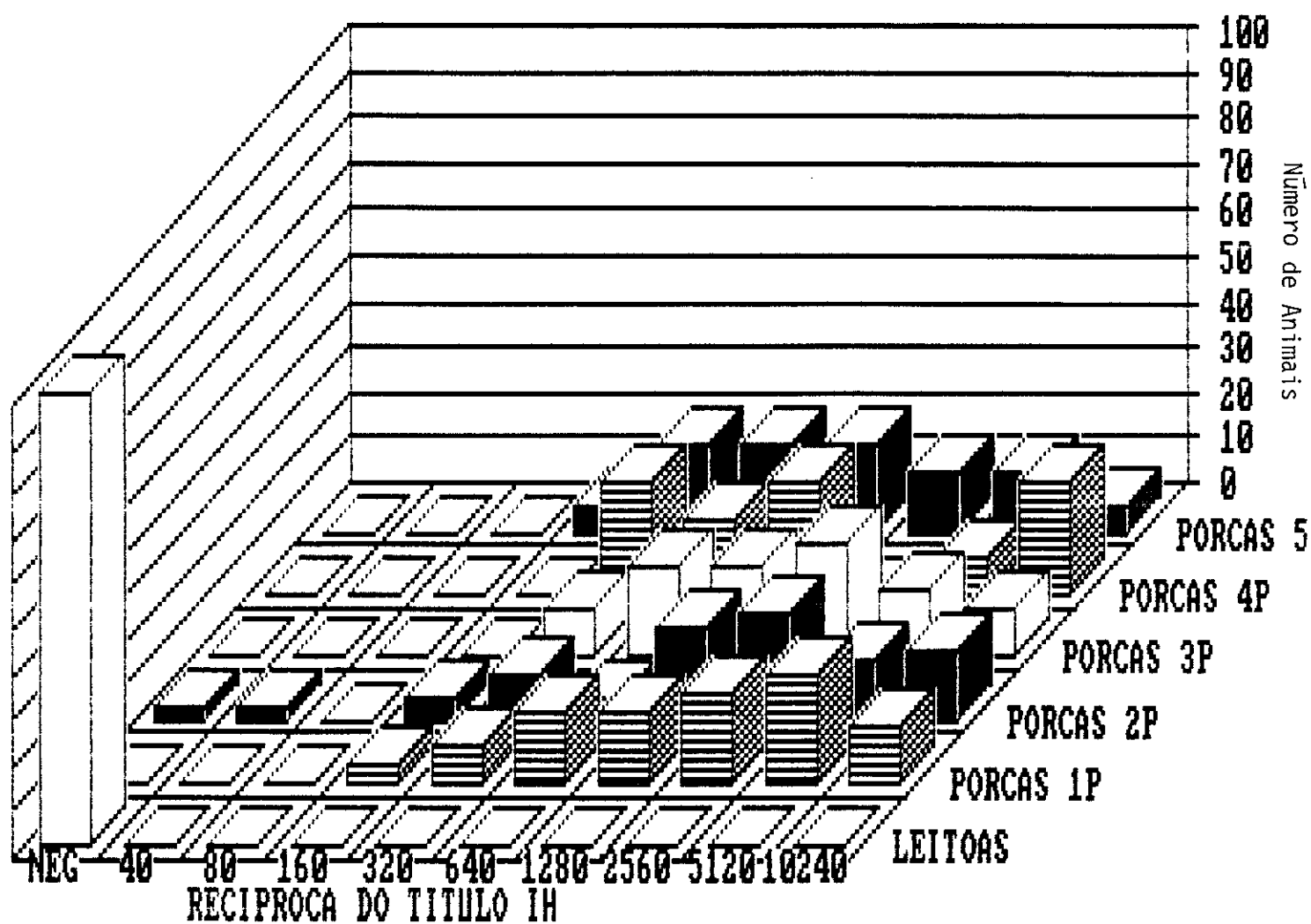


GRÁFICO 15 - Perfil sorológico da granja B, representado pela distribuição dos títulos de anticorpos segundo o número do parto (P) das fêmeas do plantel.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACHAMNN, P.A. & DANNER, K. Porcine parvovirus infecion in vitro: a astudy model for the replication of paravoviruses. II. Kinetcs of virus and antigen production. *Zbl. Vet. Med. B*, Hamburg, 23(5/6):355-63, 1976.
2. BENGELSDORF, H.J. Von. Vergluchende antikorperbestimmungen nach impfung von schweinen und meerschweinchen mit inaktivierter schweineparvovirus-vokzine. *Berl. Munch. Teirärztl. Wochenschr.*, Berlin, 100(6):162-6, 1987.
3. CARTWRIGHT, S. & HUCK, R.A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortion and stillbirths in pigs. *Vet. Rec.*, London, 81(8):196-7, 1967.
4. CHERRY, W.B.; GOLOMAN, M.; CARSKI, T.R. *Fluorescent antibody Techiniques in The Diagno sis of Communicable Disease*. Washington D.C., U.S. Government Printing Office, 73p. 1966.
5. CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W.; JOO, H.S. Inibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles *Arch. Virol*, Viena, 96(1):75-87, 1987.
6. DOUGLAS, A. Disease prevention in pig herds. *In Pract.*, London, 6(4):108-14, 1984.
7. EDWARDS, K.R.; EMMERSON, M.A.; LUFF, P.R.; WELLS, D. E.;

- MUSKETT, J.C.; WRATHALL, A.E. RICHARDSON, C.; PARKER, B. N.J.; THORNTON, D.N. Efficacy of porcine parvovirus vaccines. *Vet. Rec.*, London, 119(9):203-5, 1986.
8. EINARSSON, S.; LARSSON, K.; THAFVELIN, B. Experience of vaccination against porcine parvovirus in pig breeding herds: serological status and reproductive performance. *Acta. Vet. Scand.*, Copenhagen, 28(3-4):279-84, 1987.
9. FLORENT, G.; CHARLIER, P.; ZYGRAICH, N. Immunogenicity of a bivalente porcine parvovirus and Aujeszky's disease virus vaccine. In: INTERNATIONAL CONGRESS PIG VETERINARY SOCIETY, 9, Barcelona, 1986. *Proceedings*. Barcelona, 1986. p.89 (abstract).
10. FUJISAKI, Y. & MURAKAMI, Y. Immunity to infection with porcine parvovirus in pigs inoculated with the attenuated HT strain. *Natl. Inst. Anim. Health Q*, Tokyo, 22(1):36-7, 1982.
11. GOUVEIA, A.M.G. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para parvovirus suíno no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1982. 58p. (Tese de Mestrado).
12. HARKNGSS, 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.
13. HEARD, T. & Mc DOUGALL, I. Feedback: for health? *Pig International*, Mount Morris, 16(1):25-6, 1986.
14. HI, K.Y. Studies on hemagglutination and hemagglutination inhibition reaction of porcine parvovirus. *Bull. Azabu Vet. Coll.*, Sagamihara, 27:61+5, 1974.
15. JERÁBEK, J.; DRÁBEK, J.; MANOUSKOVÁ, V.; DEDEK, L. Evolution of seroconversion in various laboratory animal species for porcine parvovirus. *Acta. Vet. Brno.*, Prague, 56

- (3):331-6, 1987.
16. JOO, H.S.; DONALOSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H.; WATSON, D. L. Antibody to porcine, feline and rat parvoviruses in various animal species. *Res. Vet. Sci.*, London, 21(1): 112-3, 1976.
 17. JOO, H.S. & JOHNSON, R.N. Serological responses in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. *Aust. Vet. J.*, Brunswick, 53(11):550-2, 1977.
 18. JOO, H.S.; MOLITOR, T.W.; LEMAN, A.O. Antibody responses of guinea-pigs, rabbits and pigs to inactivated porcine parvovirus vaccines. *Vet. Microb.*, Amsterdam, 9(1):27-33, 1984.
 19. LEENGOED, L.A. Van; VOS, J.; GRUY, E.; RONDHUIS, P.; BRAND, A. Porcine parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. *Vet. Q.*, The Hague, 5(3):131-41, 1983.
 20. LEENGOED, L.A. Van & LEEUN, P.W. de. Porcine Parvovirus: An epidemiological survey. In: INTERNATIONAL CONGRESS AIG VETERINARY SOCIETY, 9, Barcelona, 1986. *Proceedings. Barcelona*, 1986. p.82 (abstract).
 21. LUCAS, M.H. & NAPTHINE, P. Fluorescent antibody technique in the study of three porcine viruses. *J. Comp. Pathol.*, London, 81(2):111-17, 1971.
 22. MARTINS, R.M.; ROGHE, P.M.; GUIMARÃES, L.G.; BANGEL, E.V.; GUIZZAROI, I.I.; BRUCHIMAN, A.A.; VIDOR, T. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1, Curitiba, PR, 1984. *Anais*. p.19.
 23. MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 33(11):2239-8, 1972.

24. 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.
25. MENGELING, W.L.; BROWN, T.T.; PAUL, P.S.; GUTEKUNST, D. E. Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 40(2):204-7, 1979.
26. MENGELING, W.L.; GUTEKUNST, D.E.; PIRTLE, E.C.; PAUL, P.S. Immunogenicity of bivalent vaccine for reproductive failure of swine induced by pseudorabies virus and porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 42(4):600-3, 1981.
27. MENGELING, W.L.; PEJSAK, Z.; PAUL, S. Biological assay of attenuated strain NAOL-2 and virulent strain NAOL-8 of porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 45(11):2403-7, 1984.
28. MENGELING, W.L. In: *Disease of Swine*, Iowa State University Press, 1986. p.411-24.
29. MENGELING, W.L. & PAUL, P.S. Interepizootic survival of porcine parvovirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 188(11). 1293-5, 1986.
30. MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; THACKER, B.J. Potentiating effects of adjuvants of humoral immunity to porcine parvovirus vaccines in guinea pigs. *Vet. Microb.*, Amsterdam, 10(3):209-18, 1984/85.
31. PARSONS, T.O.; SMITH, G.; GALIIGAN, O.T. Economics of porcine parvovirus vaccination assessed by decision analysis. *Prev. Vet. Med.*, Amsterdam, 4(3):199-204, 1986.
32. PAUL, P.S. & MENGELING, W.L. Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 41(12):2007-11, 1980.

33. PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; BROWN, T.T. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 41(9):1368-71, 1980.
34. PAUL, P.S. & MENGELING, W.L. Vaccination of swine with an inactivated porcine parvovirus vaccine in the presence of passive immunity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 188(4):410-13, 1986.
35. PERESTRELO, R. O papel do parvovírus nas alterações da reprodução da espécie porcina. *Revta. Port. Cien. Vet.*, Lisboa, 82(484):315-32, 1987.
36. PIRTLE, E.C. Titration of two porcine respiratory viruses in mammalian cell cultures by direct fluorescent antibody staining. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, 35(2):249-50, 1974.
37. REDMAN, D.R.; BOHL, E.H.; FERGUSON, L.C. Porcine parvovirus: Natural and experimental infections of the porcine and prevalence in mature swine. *Infect. Immun.*, Washington, 10(4):718-23, 1974.
38. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer. J. Hyg*, Hamburg, 27:493-7, 1938.
39. REIS, R. Falhas reprodutivas de origem infecciosa. In: SIMPÓSIO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SUÍNOS E AVES, 3, Concórdia, SC, 1980. *Anais*, p.130-46.
40. RIVERA, E.; SJÖSTEN, C.G.; BERGMAN, R.; KARLSSON, K. A. Porcine parvovirus: propagation in microcarrier cell culture and immunogenic evaluation in pregnant gilts. *Res. Vet. Sci.*, London, 41(3):391-6, 1986.
41. RHODE III, S.L. Defective interfering particles of parvovirus H-1. *J. Virol.*, Washington, 27(2):347-56, 1978.
42. ROBINSON, B.T.; CARTWRIGHT, S.F.; DANSON, D.L.G. Porcine

- parvovirus: A serological survey in the United Kingdom January 1984 to January 1985. *Vet. Rec.*, London, 117(23): 611-2, 1985.
43. RUCKEBAUER, 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.
 44. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical Methods*, Iowa State University Press, 6 ed., Ames, 1968. p.329-30.
 45. SORENSEN, K.J. & ASKAA, J. Vaccination against porcine parvovirus infection. *Acta Vet. Scand.*, Copenhagen, 22(2): 171-9, 1981.
 46. TIMBOL, C.R. Studies on porcine parvovirus (PPV). *Philipp J. Vet. Med.*, Quezon City, 19(1):81-91, 1980.
 47. THACKER, B.J.; BATISTA, L.; GONZALES, R. L.; SALINE, R. Evaluation of commercial porcine parvovirus vaccines: post vaccination serological responses, hemagglutinating activity and long term serostatus of vaccinated gilts in an endemically infected herd. In: INTERNATIONAL CONGRESS PIG VETERINARY SOCIETY, 9, Barcelona, 1986. *Proceedings*. Barcelona, 1986. p.87 (abstract).
 48. VANNIER, P. & TILLON, J.P. Diagnostic de artitude de l' infection à parvovirus dans les Trobles de la reproduction de l'espèce porcine. *Rec. Med. Vet.*, 155(2):151 - 8, 1979.
 49. VANNIER, P.; TILLON, J.P.; CARIOLET, R.; MADGE, F. A seroepizootiological study of parvovirus in pig herds. *Zbl. Vet. Med. B*, Hamburg, 31(1):36-45, 1984.
 50. VANNIER, P.; BRUN, A.; CHAPPUIS, G.; REYNAUD, G. Study of the efficacy of an inactivated virus vaccine against porcine parvovirus. *Ann. Rech. Vet.*, Versailles, 17(4): 425-32, 1986.

51. WRATHALL, K.E. Reproductive failure in the pig: Diagnosis and control. *Vet. Rec.*, London, 100(12):230-7, 1977.
52. WRATHALL, A.E.; WELLS, D.E.; CARTWRIGHT, S. F.; FRERICHS, G.N. An inactivated, oil-emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Res. Vet. Sci.*, London, 36(2):136-43, 1984.
53. WRATHALL, A.E. Field trials of trials of an inactivated, oil-emulsion porcine parvovirus vaccine in British pig herds. *Vet. Rec.*, London, 122(17):411-8, 1988.