

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ELENA SOUZA DE LIMA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS
CAUSADORAS DE FALHAS REPRODUTIVAS EM SUÍNOS**

**LAGES – SC
2010**

ELENA SOUZA DE LIMA

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS
CAUSADORAS DE FALHAS REPRODUTIVAS EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em
Ciência Animal, Área de Concentração em Ciência
Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da
Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-
UDESC), como requisito para obtenção de grau de
Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Janice Reis Ciacci Zanella

**LAGES - SC
2010**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Lima, Elena Souza de
Diagnóstico sorológico de doenças infecciosas causadoras de
falhas reprodutivas em suínos. / Elena Souza de Lima. –
Lages, 2010.
113 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Falha reprodutiva. 2. Parvovirus. 3. Circovirus. 4. Suíno.
5. Diagnóstico. I. Título.

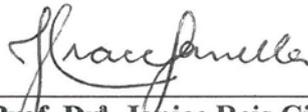
CDD – 636.08926

ELENA SOUZA DE LIMA

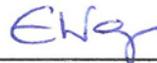
**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS
CAUSADORAS DE FALHAS REPRODUTIVAS EM SUÍNOS**

Dissertação julgada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Produção Animal, do Centro de Ciências Agro-veterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC).

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos professores:



Prof. Dr^a. Janice Reis Ciacci Zanella
Embrapa Suínos e Aves (Orientadora)



Prof. Dr. Eliana Knackfuss Vaz
CAV – UDESC (Membro)



Dr. Paulo Augusto Esteves
Embrapa Suínos e Aves (Membro)

Lages, SC, 13 Maio de 2010

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Janice Reis Ciacci Zanella, e ao pesquisador Nelson Morés, pela idealização e apoio na elaboração deste estudo, pela amizade e estímulo.

A todos do Laboratório de Sanidade da Embrapa Suínos e Aves, aos integrantes dos Laboratórios do CEDISA, à Prof^a Maria Isabel da Universidade de Passo Fundo.

E de forma muito especial, a toda minha família que jamais mediu esforços para que meus sonhos se concretizassem, em especial à minha Mãe, meu maior exemplo a seguir por sua fé e grandes princípios.

Aos colegas com quem convivi e aos amigos que fiz, pela luta, angústias e alegrias que passamos juntos.

À todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização deste estudo, obrigada.

Agradeço ao Programa de Mestrado da UDESC/CAV e a Embrapa Suínos e Aves, pela disponibilidade de estrutura para execução do projeto.

A Merial Saúde Animal Ltda pela concessão da bolsa que permitiu a conclusão deste projeto.

Sempre me pareceu estranho que todos aqueles que estudam seriamente esta ciência (a matemática) acabam tomados de uma espécie de paixão pela mesma. Em verdade, o que proporciona o máximo prazer não é o conhecimento e, sim, a aprendizagem, não é a posse, mas a aquisição; não é a presença, mas o ato de atingir a meta.

Carl Friedrich

RESUMO

Vários agentes infecciosos estão envolvidos em falhas reprodutivas em rebanhos suínos. Recentemente o papel do circovírus suíno tipo 2 (PCV2), causador da circovirose suína está sendo pesquisado como um agente presente e / ou o responsável por esses problemas. O presente estudo objetivou realizar sorologia diferencial para agentes infecciosos causadores de falhas reprodutivas em infecções naturais de fêmeas suínas. Para isso, foram selecionadas um total de 27 granjas produtoras de leitões onde ocorram problemas reprodutivos no plantel, e a correlação com a infecção por PVC2 foi pesquisada. Foram amostradas um total de 321 amostras de 120 fêmeas e de suas respectivas leitegadas, colheu-se líquido das cavidades de dois leitões por leitegada oriundos de partos prematuros ou a termo (fetos mumificados, natimortos ou leitões inviáveis). No laboratório foram empregados exames sorológicos específicos já em uso para Parvovirose suína, Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS), Doença de Aujeszky (DA), Peste Suína Clássica (PSC), Circovirose Suína, Brucelose, Leptospirose, Erisipela Suína e Toxoplasmose. No presente estudo foi possível verificar que todas as matrizes reagiram sorologicamente para circovirose e 8 fetos (3,98%) também. Das fêmeas, 94,17% apresentaram resultado indicativo de infecção para parvovirose e dos seus leitões 2,99% foram positivos. Das fêmeas testadas para Leptospirose, 0,83% apresentaram título 1:100 para o sorovar *L. grippotiphosa* e 1,67% com título reagente 1:400 para o mesmo sorovar. Nenhum dos fetos apresentou aglutinação neste teste. Foram identificadas 13,4% de porcas soropositivas para Erisipela. Nenhuma porca foi positiva para PRRS, VDA e PSC, brucelose e toxoplasmose. Nenhum feto foi positivo para brucelose, mas 4,48% apresentaram título sugestivo de infecção pelo *Toxoplasma gondii*. Os títulos de anticorpos indicativos de infecções virais tiveram maior frequência (64,17%) do que os títulos de anticorpos indicativos de infecções bacterianas (15%). Os resultados obtidos evidenciam que a circovirose suína foi a infecção mais prevalente e que mais estudos são necessários para avaliar a patogenia do PCV2 em falhas reprodutivas e as possíveis interações de outros agentes com a ocorrência de Circovirose.

Palavras chave: Falha reprodutiva, parvovirus, circovirus, suíno, diagnóstico.

ABSTRACT

Several infectious agents are involved in reproductive failures in swine herds. Recently, the role of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2), the agent causing the PCV2 associates diseases (PCVAD) is being investigated as a pathogen present or the responsible for these problems. Para isso, foram selecionadas um total de 27 granjas produtoras de leitões onde ocorriam problemas reprodutivos no plantel, e a correlação com a infecção por PVC2, foi pesquisada. This study aimed to perform differential serology for infectious agents causing reproductive failure in natural infections in sows. For that, a total of 27 pig farms where those problems were occurring were selected. A total of 321 samples from 120 females and their litters, were collected, plus cavities fluids of two piglets per litter born from premature birth and at term (mummified, stillborn or low viability piglets). Laboratory tests, specific serology already in use for porcine parvovirus, porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS), Aujeszky's disease (AD), classical swine fever (CSF), PCVAD, brucellosis, leptospirosis, toxoplasmosis and swine Erysipelas were employed. In this study it was observed that all sows were positive for PMWS and 8 fetuses (3.98%) as well. Swine dams, 94.17% showed results indicative of infection for parvovirus and 2.99% of their piglets were positive. The females tested for leptospirosis, 0.83% had title 1:100 to serovar *L. grippotiphosa* and 1.67% with reagent title of 1:400 for the same serovar. None of the fetuses showed agglutination in the test. For Erysipelas, there were identified 13.4% of the sows serum positive. None of the sows were positive for PRRS, AD, CSF, brucellosis and toxoplasmosis. Neither fetuses were tested positive for brucellosis, but 4.48% had suggestive titer for *Toxoplasma gondii*. The antibody titers indicative of viral infections were more frequent (64.17%) than those indicative of bacterial infections (15%). The results presented here indicate that PCVAD was more prevalent infection and that more studies are needed to evaluate the pathogenesis of PCV2 in reproductive failure and the possible interactions of other agents with the occurrence of PCVAD.

Keywords: Reproductive failure, parvovirus, circovirus, porcine, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Procedimento para colheita de material e desenvolvimento do estudo...	42
Figura 2.	Teste HI para Parvovirose. A- Diferentes títulos 4UHAs, B- Placa controle, C- Placa teste , D- Placa teste com controle de hemácias.....	45
Figura 3.	Resultados das Amostras Teste Elisa para PRRS A- Controles Positivos, B- Controles Negativos, C- Amostras Positivas.....	47
Figura 4.	Resultados das Amostras do Teste de Elisa para Doença de Aujeszky A- Controles Negativos e B- Controles Positivos.....	48
Figura 5.	Resultados das Amostras no Teste de Elisa para Peste Suína Clássica A- Controles Negativos, B- Controles Positivos.....	50
Figura 6.	Monocamada de células VERO. A: células negativas, B: Células positivas.....	53
Figura 7.	Resultados do Teste AAT para Brucelose Suína. A- Amostras Negativas e B- Amostras Positivas.....	54
Figura 8.	Resultados do Teste 2-ME e PLT para Brucelose Suína. A- Controles Negativos e B- Controles Positivos.....	56
Figura 9.	Resultados do Teste SAM para Leptospirose Suína. A- Controles Negativos e B- Controles Positivos.....	58
Figura 10.	Resultados do Teste HAI para Toxoplasmose Suína. A- Controles Negativos, B- Controles Positivos e C- placa teste.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados dos testes sorológicos (HI) para parvovirose em fêmeas e fetos suínos.....	63
Tabela 2.	Correlação entre títulos para PVS dos fetos e o tamanho dos mesmos.....	64
Tabela 3.	Relação entre os títulos para PVS das porcas e dos leitões.....	65
Tabela 4.	Resultados dos testes sorológicos (IPMA) para circovirose em fêmeas e fetos suínos.....	66
Tabela 5.	Títulos para circovirose em fetos relacionando ao tamanho dos mesmos..	66
Tabela 6.	Relação entre o título da fêmea para PCV2 e o título do feto.....	67
Tabela 7.	Resultados sorológicos (SAM) para para <i>Leptospiras spp</i>	67
Tabela 8.	Resultados dos diagnósticos das demais doenças reprodutivas estudadas.	68
Tabela 9.	Frequência dos resultados sorológicos considerando grupos de doenças virais, bacterianas, parasitárias e combinações entre elas.....	69

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
	2.1. Parvovirose suína (PVS).....	3
	2.2. Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS).....	7
	2.3. Doença de Aujeszky (DA).....	13
	2.4. Peste Suína Clássica (PSC).....	15
	2.5. Circovirose Suína (PCV2).....	17
	2.6. Brucelose Suína.....	22
	2.7. Leptospirose Suína.....	25
	2.8. Erisipela Suína.....	29
	2.9. Toxoplasmose.....	31
	2.10. Testes Utilizados.....	34
3.	OBJETIVOS.....	41
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
	4.1. Local de realização do experimento.....	42
	4.2. Metodologia de coleta.....	44
	4.3. Aplicação da Técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI) para a detecção de anticorpos para parvovirose.....	44
	4.4. Aplicação da Técnica de ELISA para Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína.....	46
	4.5. Aplicação da Técnica de ELISA para Doença de Aujeszky.....	47
	4.6. Aplicação da Técnica de ELISA para Peste Suína Clássica (VPSC)	49
	4.7. Aplicação da Técnica de Indirect immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) para detecção de Circovirose Suína.....	50
	4.8. Aplicação das Técnicas de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT),	

Soroaglutinação Lenta em Tubo (PLT) e 2B-Mercaptoetanol (2 ME) para diagnóstico de Brucelose Suína.....	53
4.9. Aplicação da Técnica de Microsoroaglutinação em placa (SAM) para Leptospirose.....	57
4.10. Aplicação da Técnica de ELISA para diagnóstico de Erisipela Suína.....	59
4.11. Aplicação da Técnica de Hemaglutinação Indireta (HAI) para Toxoplasmose.....	60
4.12. Análise dos Dados.....	62
5. RESULTADOS.....	63
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
8. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS.....	114

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o quarto maior exportador mundial de suínos, atrás da União Européia, dos Estados Unidos e do Canadá. A cadeia suinícola brasileira, com 30 milhões de cabeças, produção de 3 milhões de toneladas de carne, geração de 630 mil empregos diretos e indiretos, é uma importantíssima atividade econômica (ABIPECS, 2009).

A dinâmica de eficiência e rentabilidade da suinocultura intensiva, atualmente, tem direcionado os produtores a buscar resultados reprodutivos economicamente aceitáveis tendo como meta um número elevado de leitões desmamados\porca\ano. Dentro dos desafios observados na suinocultura, os problemas reprodutivos ocupam um lugar preferencial já que eles influenciam de forma direta no número de suínos terminados por ano e, conseqüentemente, as metas de tonelagem de carne produzida (HANSEN & WOLLMANN, 2008).

Nos últimos anos, houve grande desenvolvimento no sistema de produção de suínos, principalmente quanto à genética, nutrição, manejo e sanidade. Os animais passaram a ser criados de forma cada vez mais intensiva, os rebanhos ficaram maiores e, conseqüentemente, com maior predisposição às doenças, dentre elas, as doenças reprodutivas tem grande relevância, sendo consideradas a maior causa de prejuízo econômico. Neste contexto a sorologia permite a avaliação do estado imunitário do rebanho. A observação de diferentes níveis de anticorpos no plantel são indicativos de infecção em evolução, sendo este perfil comum no Brasil (BARBOSA, 2008).

A monitoria sanitária é uma ferramenta importante para o conhecimento do perfil sanitário de uma granja, é um dos componentes capazes de garantir que a produção não sofra influência negativa das doenças, assegurar bons índices produtivos e segurança alimentar ao consumidor (RISTOW, 2007; BARCELLOS *et al.*, 2009).

Na suinocultura moderna, a maioria dos problemas de fertilidade deve-se a transtornos não infecciosos, dificultando o diagnostico dos veterinários de campo, já que, normalmente, os fatores de risco associados a este tipo de problema estão correlacionados entre eles ou com transtornos infecciosos (HANSEN & WOLLMANN, 2008).

Embora o método mais seguro de diagnosticar uma infecção seja o isolamento e caracterização do agente infeccioso, isso nem sempre é possível de ser alcançado devido a localização do agente (ex. encéfalo), a não disposição de métodos simples, práticos e ou seguros para o isolamento e cultivo do agente infeccioso (ex. vírus) e a administração de drogas anti-infecciosas que inibem o crescimento *in vitro*. Nessas circunstâncias, as técnicas de imunodiagnóstico são muito importantes, já que permitem confirmar a infecção através da presença de antígenos ou anticorpos dos agentes infecciosos (TIZARD, 2002; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Neste contexto, o presente estudo objetivou verificar a ocorrência de doenças infecciosas em matrizes suínas com patologias reprodutivas e seus respectivos fetos, através de métodos sorológicos já padronizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Doenças causadas por vírus

2.1 Parvovirose Suína (PVS)

O parvovírus suíno (PVS ou *Porcine Parvovirus*) pertence à família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, gênero *Parvovirus*, está entre os menores vírus de DNA que afetam animais (SIEGL *et al.*, 1985) e seu genoma é constituído por DNA linear de fita simples (CRAWFORD *et al.*, 1969).

A infecção pelo PVS está amplamente distribuída na população suína mundial, tanto doméstica quanto selvagem, sendo raras as granjas livres do vírus (OLIVEIRA JUNIOR, 2008). A possibilidade de sua presença deve ser lembrada sempre que forem observados sinais clínicos como retorno ao cio, atraso na data de parição, associados à presença de fetos mumificados, natimortos e leitegadas com reduzido número de leitões, especialmente em fêmeas de primeiro e segundo parto (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; MENGELING *et al.*, 1999). Pigfort (2006) relata que também pode ocorrer baixo volume abdominal durante a gestação, ocorrência de falsa gestação e diminuição do ganho de peso das fêmeas no último mês de gestação.

O PVS foi descrito pela primeira vez em 1967 (CARTWRIGHT e HUCK, 1967), sendo isolado, posteriormente, em fetos, em diversos países (BACHMANN, 1969; GENOV *et al.*, 1971; JOHNSON & COLLINGS, 1971; COACKEY e SMITH, 1972; MENGELING, 1972; MORIMOTO *et al.*, 1972; JOHNSON, 1973). No Brasil, estudos sorológicos utilizando a prova de inibição da hemaglutinação (HI) em suínos provenientes de granjas comerciais indicaram que o vírus já está estabelecido no País há pelo menos duas décadas, causando problemas reprodutivos (GOUVEIA *et al.*, 1984; MARTINS *et al.*, 1984). Outros trabalhos relataram a soroprevalência do PVS superior a 80% em granjas comerciais (BERSANO *et al.*, 1993; RODRIGUEZ *et al.*, 2003), demonstrando que o vírus circula no plantel de suínos brasileiro.

Uma característica marcante do PVS é a dependência de células na fase S do ciclo celular para sua replicação. A infecção por este vírus afeta principalmente órgãos que

apresentam células com altas taxas de multiplicação, como as células embrionárias, células da medula óssea e células precursoras do epitélio intestinal (MENGELING *et al.*, 1999). A doença afeta principalmente fêmeas de primeiro parto, as quais não possuem imunidade para o vírus e apresentam maior risco de infecção seguida de problemas reprodutivos, mas o vírus pode infectar animais de todas as idades (MORAES e COSTA, 2007; ROEHE *et al.*, 2007). Em fêmeas pluríparas, com prévio contato com o agente, o efeito do vírus passa a ser reduzido ou nulo, devido ao desenvolvimento de imunidade ativa (MENGELING *et al.*, 1999).

A doença ocorre quando as fêmeas, que apresentam baixos títulos de anticorpos, adquirem o vírus durante a gestação e, como o PVS apresenta avidéz por células em divisão, o feto e o envoltório fetal podem ser atingidos. Raramente afeta leitões que são considerados imunes por possuírem anticorpos protetores contra o PVS adquiridos através do colostro (MENGELING *et al.*, 2000). Esta imunidade passiva diminui progressivamente, permanecendo até quatro a seis meses de idade (PAUL *et al.*, 1982). Após o amadurecimento do sistema imune, os animais adquirem imunidade ativa contra o PVS que, aparentemente, persiste por toda a vida do animal, podendo ser reforçada por repetidas exposições ao vírus de campo (MENGELING *et al.*, 2000).

A eliminação do vírus se dá pelas fezes e secreções até duas semanas após a infecção pelo sêmen e, nas baias, podem resistir por até quatro meses (MENGELING, 1999; MELO, 2008). Os suínos se infectam através da ingestão da placenta durante o parto, por contato oronasal com fezes e secreções contaminadas, por sêmen contaminado, no caso das fêmeas e secreções vaginais, no caso dos machos (PIGFORT, 2006; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; MELO, 2008). Portando podem-se definir duas formas para um suíno se infectar com o PVS: a transmissão horizontal onde o animal entra em contato com o vírus presente em fezes, secreções, fetos ou materiais infectados no ambiente e a vertical, que é passada da mãe para a leitegada via intra-uterina (WHITTEMORE, 1993).

Ainda não está claro como o vírus consegue ultrapassar a barreira transplacentária que separa a circulação materna da circulação fetal (WILHELM *et al.*, 2005). Os suínos apresentam placenta epitélio-corial, onde o trofoderma fetal está em contato com o epitélio uterino. Ambos formam microvilos, que se interdigitam resultando em uma ampla área para difusão de substâncias (MIGLINO *et al.*, 2001). As células que formam estas camadas

estão intimamente ligadas por junções que não permitem a passagem de pequenas moléculas, como por exemplo, os anticorpos (WILHELM *et al.*, 2005).

Para Mengeling *et al.* (1999) e Melo (2006) quando uma fêmea gestante é infectada pelo vírus, este atravessa a placenta e se multiplica lentamente no útero e é comum a presença de fetos em diferentes estágios de desenvolvimento, podendo ocorrer fetos mumificados, natimortos e normais na mesma leitegada. Considerando como momento da infecção a cobertura, pode ocorrer: da infecção até o 9º dia de gestação a morte de todos os embriões, ou de alguns e reabsorção. No início do estágio de embrião (10º ao 35º dia), a infecção pode resultar em morte embrionária, seguida de reabsorção fetal ou o nascimento de leitões fracos, malformados e de baixo peso. Após a ossificação que se inicia em torno do 35º dia de gestação, a infecção do feto pelo PVS ocasiona a morte, mas a reabsorção é impedida pelo esqueleto, resultando em mumificação fetal. Por volta dos 70 dias de gestação o feto torna-se imunocompetente, sendo capaz de produzir anticorpos próprios e sobreviver à infecção (JOO *et al.*, 1976; MENGELING & CUTLIP, 1976). Como nem todos os fetos se infectam através da placenta durante a viremia da gestante, sabe-se que alguns se infectam intra-uterinamente via fetos adjacentes, o que explica um sinal clássico da doença que é a morte fetal em diferentes estágios de desenvolvimento (PIGFORT, 2006). Deve-se levar em consideração que a parvovirose não cursa com falhas reprodutivas isoladas (PIGFORT, 2006). Os machos não apresentam sintomatologia da doença (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

O diagnóstico envolve a observação dos sinais e sintomas reprodutivos, devendo ser confirmado por exames laboratoriais (MENGELIN, 1999). Como os fetos/leitões podem carrear vírus ou ter anticorpos, deve-se usar um conjunto de técnicas buscando a detecção do agente, como imunofluorescência direta, hemaglutinação, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), Polimerase Chain Reaction (PCR) e, o mais usado, inibição da hemaglutinação (HI) (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Entretanto, como os tecidos de escolha (pulmão e rim dos fetos) geralmente encontram-se autolisados, torna-se importante a utilização de técnicas sorológicas, como HI e *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) (MENGELING *et al.*, 1999). Como o PVS é capaz de aglutinar eritrócitos, o uso de HI é eficiente na detecção de anticorpos contra o vírus. Além disto, é o teste sorológico de referência, além de ser de fácil aplicação e baixo custo (MENGELING *et al.*, 1999).

A forma mais conhecida de defesa do sistema imune contra o PVS é através do desenvolvimento de anticorpos específicos para o vírus. Esta imunidade ativa é associada a altos títulos de anticorpos contra o PVS, maiores que 256 quando mensurados por HI (JOHNSON *et al.*, 1976). Entretanto, quando utilizado como ferramenta para avaliação do perfil sorológico do plantel, torna-se uma prova laboriosa. Além disto, não existe padronização dos parâmetros relacionados à temperatura de incubação, espécie e idade do doador de hemácias e tratamento prévio da amostra, o que interfere na repetibilidade dos resultados (LOBATO, 1992).

O teste de ELISA vem sendo utilizado em vários países, pois dispensa o tratamento prévio das amostras e pode ser padronizado e automatizado (QUING *et al.*, 2006), porém esta técnica ainda não é aplicada na rotina diagnóstica no Brasil. No entanto, poderia facilitar o diagnóstico da doença e permitir maior agilidade do perfil sorológico das granjas brasileiras.

As técnicas sorológicas obtiveram uma maior importância devido a dificuldades na detecção e isolamento do PVS. As infecções com vírus de campo induzem altos títulos de anticorpos e resposta prolongada, aumentando a eficácia dos métodos sorológicos (ROEHE *et al.*, 2007).

A técnica de HI para os parvovírus passou a ser utilizada após 1966, quando foi descoberta a capacidade destes de aglutinar hemácias de determinadas espécies (BRAILOVSKY, 1966). Nos anos seguintes, o método de HI foi descrito e padronizado por vários autores, podendo ser realizado com hemácias de cobaias, galinhas, humanos e ratos (CARTWRIGHT & HUCK, 1967; FUJISAKI, 1975; JOO *et al.*, 1976). Atualmente, este método segue sendo utilizado como método padrão ouro para a detecção de anticorpos em laboratórios de referência no Brasil.

É imprescindível fazer o diagnóstico diferencial para leptospirose, brucelose e doença de Aujeszky, com testes sorológicos, uma vez que os sinais e sintomas são semelhantes (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007; OLIVEIRA JUNIOR, 2008).

Como profilaxia à infecção, além da limpeza, desinfecção e controle de roedores, que são reservatórios do vírus, deve-se descartar do rebanho as fêmeas contaminadas, fazer o vazio sanitário e eliminar reprodutores que sejam portadores da doença, bem como seu sêmen utilizado para inseminação artificial (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Até o presente momento não existe tratamento específico para a parvovirose.

Medidas gerais de manejo dirigidas a promover um bom estado sanitário do rebanho, devem ser adotadas (MENGELING, 1999; ROEHE *et al.*, 2007). Dentre estas, a vacinação é a principal medida a ser adotada, cujo objetivo é estimular a imunidade do plantel para evitar a infecção dos embriões ou fetos (ROEHE *et al.*, 2007).

A partir do uso da vacina em quase todas as granjas, a interpretação do título de anticorpos passou a ser uma prática difícil. Em estudos sorológicos de PVS em plantéis, passou a ser observada a presença de imunidade na maioria dos animais, como esperado após a vacinação, entretanto, também, a presença de títulos altos e muitas vezes heterogêneos (ORAVAINEN *et al.*, 2006). De uma forma geral, a distinção entre títulos vacinais e oriundos de desafios de campo poderia ser realizada através do nível de anticorpos, por que a estimulação humoral realizada pelas vacinas geralmente não excede títulos de 512 (ORAVAINEN *et al.*, 2006).

A impossibilidade de diferenciar anticorpos adquiridos passivamente de uma resposta ativa, juntamente com a falta de standardização de métodos sorológicos, dificulta este tipo de análise. As primeiras vacinas desenvolvidas, ainda durante a década de 70, foram feitas com o vírus inativado (SUZUKI & FUJISAKI, 1976; JOO & JOHNSON, 1977; MENGELING *et al.*, 1979). Atualmente as cepas virais utilizadas pela empresas farmacêuticas são consideradas um segredo comercial e há poucas informações publicadas. As mudanças ocorridas na tecnologia para obtenção do antígeno, inativantes, adjuvantes e conservantes nas vacinas inativadas, possivelmente, sejam as principais modificações realizadas nas vacinas disponíveis (WRATHALL *et al.*, 1984; ROIC *et al.*, 2006).

2.2 Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína (PRRS)

A PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) é uma doença viral infecto-contagiosa, de elevada importância econômica, caracterizada por falhas reprodutivas em porcas e problemas respiratórios em leitões e suínos em crescimento e terminação. O vírus da PRRS (PRRSV) é um vírus que contém genoma de RNA, pequeno, com 45 a 65nm de diâmetro (CIACCI-ZANELLA, 2004) e envelopado (SORENSEN, 1998). Pertence ao Gênero *Arterivirus* e Família *Arteriviridae* e Ordem *Nidovirales* (OIE, 2008). Há amostras distintas. As amostras européias e americanas do vírus possuem

genótipos diferentes. Entretanto, diferenças genéticas, antigênicas e de patogenicidade ocorrem, dentro do mesmo genótipo (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

O suíno e o javali selvagem são os únicos animais conhecidos por adquirirem infecção com PRRSV, naturalmente. Contudo, não são descritas manifestações clínicas da infecção pela PRRS em javalis selvagens e não são substanciais as provas do seu papel como transmissor da doença para suínos domésticos (ALBINA, 1997). Posteriormente Albina *et al.* (2000) fizeram exames sorológicos para PRRS em javalis selvagens (*Sus scrofa*) na França. Aproximadamente 4% foram positivos. Para os autores, este resultado mostrou que estes animais podem ser reservatórios e infectar suínos domésticos.

A PRRS também conhecida no Brasil como SRRS (Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos), foi assim batizada nove anos após o relato do primeiro caso (ALBINA, 1997). Sua primeira ocorrência foi nos EUA em 1987, na Carolina do Norte, quando foi denominada como Doença Misteriosa dos Suínos (DMS), Orelha Azul (*Blue ears*) entre outros nomes (CIACCI-ZANELLA, 2004). No mesmo ano, a síndrome foi diagnosticada em Quebec, no Canadá. Posteriormente, em 1990, foi descrita na Europa e países asiáticos (SORENSEN, 1998; CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2004; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

No Brasil, não há evidências da existência da doença e, portanto, devem ser empenhados esforços para evitar sua introdução, principalmente através da importação de animais. O impacto econômico da PRRS nos EUA já foi calculado e verificou-se um custo total/ano de U\$560 milhões, para a indústria daquele país (NEUMANN *et al.*, 2005). Os custos estão distribuídos em 12% na fase reprodutiva, 36% na de desmame e 52% na fase de crescimento-terminação. Custos não avaliados são: perdas de mercados, exames, tratamentos, atrasos no crescimento (suínos positivos levam 2 semanas a mais para chegar ao peso de abate). Uma campanha nacional de erradicação liderada pelo USDA, com apoio dos pesquisadores do *National Pork Board* estima que o programa vai levar 16 anos para erradicar a PRRSV dos EUA. Apesar da doença estar disseminada em rebanhos suínos em todo mundo, ainda não existe relato da PRRS no Brasil (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2004).

A doença é endêmica em vários países. Em 1994 a PRRS foi oficialmente reconhecida em 16 países de 3 diferentes continentes (Ásia, América e Europa) (ALBINA, 1997).

Em 2000, foi realizado um estudo de prevalência para corroborar esta consideração. O estudo foi realizado em granjas que importaram material genético desde 1990 até 2000 (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2004). Os resultados foram negativos. Ressalta-se que não houve evidências clínicas, laboratoriais ou epidemiológicas que justificassem a presença do vírus no rebanho brasileiro. Um estudo soropidemiológico indicou ausência de casos de PRRSV no Brasil e uma prevalência inferior a 0,8% na população suína testada. Esta prevalência deveu-se ao fato que os animais soro-reagiram no teste de ELISA. Os mesmos foram submetidos a testes mais sensíveis obtendo resultado negativo, com isso foi constatado que os resultados no teste de ELISA eram falsos positivos (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2001).

De acordo com Mengeling (1996), estudos sorológicos sugerem que a prevalência da infecção é muito maior do que o reconhecimento da doença clínica.

Vários agentes foram incluídos como responsáveis pelo quadro da PRRS, antes de definir o vírus causador do quadro (Influenza Suína, Peste Suína Clássica, Enterovírus Suíno, Parvovírus Suíno, Doença de Aujeszky, *Leptospira interrogans* – sorovar *bratislava* e micotoxinas) (CIACCI-ZANELLA, 2004).

Allende *et al.* (2000) afirmam que o PRRSV pode persistir em suínos por um longo período antes de iniciarem a infecção e que animais persistentemente infectados podem transmitir o vírus. Os mecanismos de persistência no animal hospedeiro não são conhecidos.

Mortensen *et al.* (2002), detectaram como fatores de risco para rebanhos de matrizes na Dinamarca: 1) A proximidade a rebanhos infectados com PRRSV amostra americana, 2) Compra de animais incubando o PRRSV americano; 3) Aumento do tamanho do rebanho e 4) Compra de sêmen de cachacos de granjas infectadas. Os autores sugeriram que a disseminação do vírus via aerossol é um freqüente modo de transmissão.

Devido ao longo período de transmissibilidade a movimentação de animais infectados foi importante causa dos surtos da doença na Europa. Também, devido a isso, a enfermidade pode facilmente ser introduzida em outros países, através da importação de animais infectados (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

O período de incubação dura de 10 a 37 dias, o vírus se localiza no sangue, ou seja, faz viremia e encontra-se em órgãos com alta circulação de anticorpos. Após a vacinação

ou exposição, o vírus é atenuado num período de 7 a 14 dias (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

O PRRSV provoca baixo nível de anticorpos. Os níveis de anticorpos maternos específicos para o PRRSV caem normalmente em 4 a 5 semanas de idade (SHIBATA, 1998) e não são suficientes para proteger os leitões da infecção.

A manifestação clínica da infecção pelo PRRSV e a gravidade da doença variam muito. Esta variação na gravidade depende de fatores como a amostra do PRRSV, a presença de outros agentes infecciosos, a idade dos suínos infectados ou estágio reprodutivo, imunidade do rebanho, tamanho do rebanho e ambiência (CIACCI-ZANELLA, 2004).

A enfermidade pode ocorrer sob a forma de surtos ou endêmica. Geralmente, depois da severa fase epidêmica, a infecção se torna endêmica (ALBINA, 1997).

A manifestação inicia-se com sinais pouco específicos, tais como: anorexia, hipertermia (40 a 43°C) ou hipotermia, letargia, apatia. Podem ainda ser encontrados sinais como: orelhas, abdome e vulva de coloração azulada, sintomas nervosos, edema subcutâneo de membros posteriores e lesões de pele (CIACCI-ZANELLA, 2004). Pode ocorrer diarreia em leitões lactentes e aborto (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007), edema de pálpebras e conjuntivite (BARCELOS & SOBESTIANSKY, 2003).

Na fase aguda são observados sinais respiratórios e reprodutivos: abortos, alterações na duração normal do parto, aumento da taxa de retorno ao cio mortalidade de lactentes, aumento de natimortos. Em animais de recria e terminação há envolvimento respiratório. Aos poucos, a doença vai se tornando crônica e as perdas vão sendo reduzidas. Há nascimento de leitegadas normais e partos prematuros com leitões fracos, mumificados e leitegadas com todos os leitões mortos ou abortados em diferentes fases da gestação. Também se percebem leitões com crescimento prejudicado, orelhas azuis e morte súbita de leitões. Fêmeas podem apresentar aborto aos 70 a 110 dias de gestação e parto prematuro (108 a 112 dias) ou tardios. Comprovadamente, a infecção se dá através da inalação, ingestão e coito e o percentual de concepção das fêmeas é reduzido, porém, em muitos casos, não há manifestações reprodutivas (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Prieto *et al.* (1997) comprovaram que a exposição de leitoas susceptíveis ao PRRSV, no início da gestação, não produz efeito significativo sobre a concepção e

fertilização. Entretanto, embora a infecção pareça não exercer qualquer efeito nos embriões antes da implantação, isto pode resultar em infecção transplacentária e morte embrionária.

O PRRSV pode ser detectado no sêmen por até 92 dias pós-infecção, mas se a qualidade do sêmen é adequada isso não vai afetar as taxas de concepção ou fertilização. O impacto será conseqüente da infecção da fêmea que resultará em doença clínica (CIACCI-ZANELLA, 2004).

A anorexia e a febre nas porcas em lactação levam à agalaxia que resulta na morte dos leitões por fome ou colibacilose. Sendo assim, a mortalidade pode chegar a 80% (CIACCI-ZANELLA, 2004).

Em leitões desmamados, a doença tem mais impacto nas 8 semanas de vida, principalmente quando outros agentes infecciosos estão presentes como o circovírus suíno tipo 2, dentre outros. Além da redução nas taxas de crescimento e aumento na mortalidade, a infecção pelo PRRSV reduz a eficácia de medicamentos e vacinações (CIACCI-ZANELLA, 2004).

O PRRSV tem preferência pelos macrófagos pulmonares e, assim, reduz a capacidade do animal em responder às infecções, portanto, os animais ficam susceptíveis às infecções secundárias, que costumam ser um grande problema para a higidez dos animais. Muitos são os relatos de doenças que atuam sinergicamente e/ou como infecções secundárias nos animais infectados por PRRSV (NAKAMINE *et al.*, 1998).

De acordo com Ciacci-Zanella (2004), existem vários modelos de co-infecção experimental, mas o de maior sinergismo de interação vírus-vírus são PRRSV e PCV2.

O diagnóstico diferencial da PRRS deve ser realizado para Parvovírus Suíno, Doença de Aujeszky, Circovírus tipo 2, Enterovírus Suíno, Vírus da Influenza Suína e Peste Suína Clássica, Citomegalovírus e Leptospirose (CIACCI-ZANELLA, 2004).

O vírus causa infecções persistentes por períodos prolongados, às vezes sem a presença de anticorpos detectáveis. O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos, nas lesões, na epidemiologia e nos achados virológicos e sorológicos. Mortalidade perinatal, aumento na taxa de natimortos, abortos além de doença respiratória com lesões nos lobos anteriores do pulmão e presença de hemorragia são sugestivos de PRRS. Infecções leves ou assintomáticas podem ocorrer (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Macroscopicamente, percebe-se que o cordão umbilical dos fetos natimortos podem apresentar manchas hemorrágicas e estar edemaciado em até 3 vezes o tamanho normal.

Em alguns fetos pode ser observado o acúmulo de fluido de cor âmbar, distendendo as membranas dos rins, cólon, baço e na cavidade torácica e abdominal, pulmões não colabados, firmes e manchados em tons de cinza e marrom. Em casos severos podem apresentar coloração avermelhada. Os linfonodos aumentam de volume de 2 a 10 vezes, com coloração amarronzada e podem apresentar pequenos cistos com presença de fluídos abaixo da cápsula (CIACCI-ZANELLA, 2004).

O diagnóstico também pode ser feito pela detecção de anticorpos específicos. Estes podem ser detectados por testes de ELISA, imunoperoxidase, imunofluorescência indireta ou testes de soroneutralização (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Alguns kits sorológicos são capazes de identificar se a amostra viral é de origem européia ou americana (SORENSEN *et al.*, 1998).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa 54, de 17 de dezembro de 2002, que estabelece os requisitos zoossanitários do Brasil para importação de sêmen suíno de países que não façam parte do Mercosul, exigindo que os doadores de sêmen destes países sejam provenientes de estabelecimentos livres de PRRS. Esta legislação também estabelece que estes animais devem ser negativos para PRRS, depois de realizado o seguinte protocolo: teste de ELISA, no mínimo 30 (trinta) dias que antecederam a coleta do sêmen e, novamente, 15 (quinze) a 60 (sessenta) dias após a coleta (BRASIL, 2002).

De acordo com a Instrução Normativa 31, de 10 de maio de 2002, do MAPA, os suínos destinados à exportação para o Brasil serão submetidos a testes de diagnóstico, requeridos pelo MAPA, durante a quarentena na origem e no destino. No caso de algum animal resultar positivo para os testes de diagnóstico requeridos durante a quarentena de origem, todo o lote quarentenário ficará impedido de ser exportado para o Brasil. O Certificado Zoossanitário para exportação para o Brasil, de suínos destinados à reprodução, contido nesta Instrução Normativa, determina que o Veterinário Oficial do país exportador deve certificar que os suínos em trâmite, dentre outras condições, originam-se de estabelecimento onde não foi registrada a ocorrência clínica de várias doenças, incluindo a PRRS, nos últimos 12 meses que antecederam o embarque. Também, que os animais foram submetidos a testes de diagnóstico com resultado negativo para PRRS após dois testes de ELISA com intervalo mínimo de 21 dias. Na quarentena no Brasil, os animais serão submetidos a teste de ELISA para detecção de anticorpos contra PRRS (BRASIL, 2002).

A PRRS é encontrada principalmente na parte ocidental da Dinamarca, porém está espalhada por outras partes do país. Uma vacina viva, oriunda de amostra americana do vírus (Ingelvac PRRS MLVÒ), foi aprovada pelas autoridades dinamarquesas (SORENSEN *et al.*, 1998)..

2.3 Doença de Aujeszky (DA)

A etiologia da doença foi determinada no início do século XX (KLUGE *et al.*, 1999). O vírus da doença de Aujeszky (VDA), também denominado de vírus da pseudo-raiva (PRV), ou herpesvírus suíno tipo 1, pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicelovirus* (KLUGE *et al.*, 1992; ROIZMAN & PELLET, 2001).

A Doença de Aujeszky (DA) é uma doença infecto-contagiosa que tem como hospedeiros primários os suídeos (suínos domésticos e selvagens) que podem apresentar infecção latente (DAVIES & BERAN, 1980), o que não acontece com outras espécies animais (KLUGE *et al.*, 1993), embora o vírus possa infectar outras espécies de mamíferos domésticos. Nos gatos, cães e bovinos, o vírus produz encefalite de curso agudo fatal, o que reduz a importância epidemiológica desses hospedeiros na manutenção e disseminação da enfermidade. A ocorrência da doença nessas espécies, no entanto, pode servir como indicador epidemiológico da presença de atividade viral (CRANDELL *et al.*, 1982; KLUGE *et al.*, 1999; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

A doença é responsável por consideráveis perdas econômicas na suinocultura mundial (ANNELLI, 1994; NAUWINCK & PENSAERT, 1994), sendo um importante obstáculo à exploração e comércio internacional de suínos em todo o mundo.

Os sinais clínicos da infecção pelo VDA variam de acordo com fatores epidemiológicos como endemicidade e suscetibilidade dos indivíduos. A ocorrência do VDA em áreas endêmicas é associada a manifestações reprodutivas. A introdução do vírus em rebanhos livres resulta em sinais clínicos característicos, que variam de acordo com a faixa etária. Em animais jovens predominam sinais neurológicos com a taxa de mortalidade aproximando-se dos 100%. Animais adultos apresentam febre, taxas variáveis de aborto, reabsorção fetal, dificuldade respiratória e eventualmente vômitos. A

mortalidade nessa faixa etária é geralmente baixa (KLUGE *et al.*, 1999; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). As perdas ocorrem por transtornos reprodutivos; transtornos respiratórios em animais da terminação, levando a infecções secundárias; com estabelecimento de infecção latente em suínos e recorrência viral, levando à restrição na movimentação de animais destinados a reprodução (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

Está classificada junto ao Código Zoossanitário da Oficina Internacional de Epizootias (OIE) e sua notificação anual é obrigatória, mesmo para países ou regiões que não possuam programas de controle ou erradicação (OIE, 2008). As granjas registradas perdem a certificação para a venda de reprodutores e de material genético (sêmen e embriões) e a Doença de Aujeszky (DA) impõe restrições às exportações (OIE, 2008).

A propriedade biológica de maior importância epidemiológica do VDA é a capacidade de estabelecer infecções latentes no sistema nervoso do hospedeiro após a infecção aguda. A infecção latente persiste por toda a vida do animal, podendo ser reativada natural e/ou experimentalmente, resultando em excreção e transmissão de vírus (HORWARTH, 1969). Por isso, os animais soropositivos constituem-se em reservatórios e fontes potenciais de disseminação do VDA (KLUGE *et al.* 1999; ROIZMAN & PELLET, 2001).

A primeira notificação no Brasil ocorreu em 1912 (AKKERMAN, 1964; VIDOR 1988), desde então, já foi identificada nos Estados de Santa Catarina, em 1984 (KRUGE *et al.*, 1993), Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Nos últimos anos, a infecção foi mais freqüentemente relatada em Santa Catarina, o que levou a implementação de um programa de erradicação (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

No ano de 2001, o impacto econômico anual da DA sobre a atividade suinícola estadual foi estimado em R\$ 931.224,00 ao ano, desconsiderando-se o impacto negativo sobre o comércio de reprodutores e o mercado exportador. Por essa razão, nesse mesmo ano, iniciou-se um programa de erradicação da DA no Estado. Atualmente o programa encontra-se na fase de monitoração (BRENTANO, 1992; KLUGE *et al.*,1999; CIACCIZANELLA *et al.*, 2005; MORES *et al.*, 2005).

Diferentes estratégias de combate têm sido preconizadas, dependendo da situação epidemiológica em cada região afetada. Alguns países, onde a enfermidade é endêmica, optaram por planos de erradicação a longo prazo, baseados no uso de vacinas com

marcadores antigênicos e posterior teste e remoção de animais soropositivos (MORRISON, 1994; VAN OIRSCHOT, 1996). Nesses casos, a despopulação total das granjas demonstraram ser proibitivas economicamente (RODRIGUES *et al.*, 1990). Esses programas são reavaliados periodicamente para registrar progressos e, eventualmente, alterar estratégias e redirecionar recursos (VANIER *et al.*, 1997; MULLER *et al.*, 2003).

A técnica de ELISA tem sido muito utilizada para a pesquisa de anticorpos para o VDA e os exames positivos são submetidos à prova de soroneutralização (CIACCIZANELLA *et al.*, 2005; MORES *et al.*, 2005). Entretanto, o uso maciço de vacinas para a DA em rebanhos suínolas tem demandado a necessidade de técnicas de ELISA diferenciais. Atualmente, tem-se um número muito grande de referências documentadas sobre a técnica de ELISA *screening* e o diferencial para glicoproteínas gE. O desenvolvimento de testes ELISA diferencial, com bons níveis de sensibilidade e especificidade, tem sido relatados (DEA *et al.*, 2000; ELIOT *et al.*, 1989; GUT *et al.*, 1999; KINKER *et al.*, 1997; STEGEMAN *et al.*, 1997).

Os testes imunoenzimáticos do tipo ELISA são muito utilizados presentemente, devido à sua alta sensibilidade, especificidade, capacidade de processamento de grande número de amostras, relativa facilidade e rapidez de execução. Os reagentes não possuem custo elevado, são estáveis, fáceis de preparar e, geralmente, os resultados de provas tipo ELISA, podem ser quantificados através do uso do espectrofotômetro (VAN OIRSCHOT, 1989).

Um levantamento de 824 fetos suínos abortados, realizado nos EUA, durante 6 anos, revelou a Doença de Aujeszky em 1% dos fetos analisados (KIRKBRIDE *et al.*, 1978). Na Espanha, um estudo sorológico apontou uma soropositividade de 73% para Aujeszky (GUTIÉRREZ-MARTÍN *et al.*, 2000), porém, no mesmo país, foram testadas 293 amostras de tecidos fetais e não foi constatada a doença de Aujeszky nas amostras analisadas (MALDONADO *et al.*, 2005).

2.4. Peste Suína Clássica (PSC)

A Peste Suína Clássica (PSC) é uma doença de curso febril, de distribuição mundial, sendo considerada endêmica na América do Sul, China, Índia e Rússia (VAN

OIRSCHOT & TERPSTRA, 1989). É uma doença multissistêmica viral altamente contagiosa que acomete os suínos e está na lista A da OIE (PATON & EDWARDS, 2001). Seu agente etiológico é um vírus com genoma de RNA, envelopado, pertencente ao grupo *Pestivirus*, da família *Flaviviridae* (VAN OIRSCHOT, 1989; ENZMANN, 1977; DEPNER *et al.*, 1995, MURPHY *et al.*, 1995). A infecção ocorre pela via oro-nasal, sendo as tonsilas o primeiro sítio de replicação do vírus (DUNNE *et al.*, 1959; MENGELING & PACKER, 1969; BERSANO *et al.*, 1985; BIRONT *et al.*, 1987), que em seguida, penetra na corrente circulatória alcançando linfonodos, baço, rins, porção distal do íleo e cérebro (SARMA & SARMA, 1996). Em termos econômicos, a doença é considerada uma das mais graves por causar perdas econômicas para as indústrias e criadores de suínos, em função de sua frequência, facilidade de disseminação e alta mortalidade, além de que, muitas vezes, está diretamente relacionada a distúrbios reprodutivos (VAN OIRSCHOT, 1989; MURPHY *et al.*, 1995), leva a restrições de mercado e condena os produtos suínos (DESCHAMPS; LÚCIA JÚNIOR; TALAMINI, 1998).

Foi descrita pela primeira vez em 1833, nos Estados Unidos (HANSON *et al.*, 1956) e, no Brasil, em Minas Gerais, por Lacerda (1899).

A infecção pode ocorrer de diferentes formas clínicas, dependendo da virulência da estirpe do vírus. A forma aguda é causada por uma estirpe do vírus virulento e geralmente resulta em alta mortalidade; a infecção com o vírus de baixa virulência pode ser desenvolvido sob forma inaparente ou atípica (VAN OIRSCHOT, 1989).

Desde que a PSC foi descrita no Estado de São Paulo (PENHA, 1934), a forma típica, na qual estão envolvidas as cepas de alta virulência, tem sido a mais frequentemente observada. A existência de cepas de baixa e moderada virulência, ocasionando formas atípicas de PSC, tem sido descrita na literatura (CARBREY *et al.*, 1966; KORN *et al.*, 1969; MENGELING & PACKER, 1969; DUNNE, 1973; NECOCHEA, 1974; AYNAUD, *et al.*, 1977; VANNIER, 1981; MOENNIG & PLAGEMANN, 1992).

Quando uma fêmea gestante é exposta à cepa de vírus de baixa virulência, este, ao ser transmitido ao feto, pode dar origem a natimortos, leitegada de tamanho reduzido, como também leitões aparentemente saudáveis, mas persistentemente infectados (OIRSCHOT & TERPSTRA, 1977). Do ponto de vista epidemiológico e econômico, as infecções uterinas são o maior perigo atribuído aos pestivirus, em virtude de originar suínos persistentemente infectados (MOENNIG & PLAGEMANN, 1992).

O estado de portador inaparente, foi também citado por AYNAUD (1976), que associou o evento ao uso de vacina cristal violeta que, segundo o autor, conferia proteção imperfeita ao rebanho. Muito embora a PSC tenha sido erradicada em alguns países como Austrália, Canadá, Inglaterra, Islândia, Irlanda, Nova Zelândia, países escandinavos, Suíça e Estados Unidos, naqueles onde a enfermidade ainda ocorre, há carência de relatos relacionados à pesquisa do vírus em suínos encaminhados a matadouros.

Em 1981, foi instituído o Programa de Combate à Peste Suína (PCPS) que exigia a adoção de procedimentos, tais como, diagnóstico laboratorial, destruição dos animais positivos, vacinação contra PSC (amostra China lapinizada) e identificação sorológica em nível de abatedouro para identificar zonas livres da doença.

Em 1992, foi realizado um processo progressivo de zonificação no país, que foi iniciado nos Estados da região Sul, através da reformulação do Programa que passou a preconizar a suspensão da vacinação nos grandes centros produtores, criação de um cinturão de vacinação compulsória em torno dessas áreas, controle de trânsito e criação de fundos de indenização administrados pela iniciativa privada.

O método de diagnóstico mais utilizado é o isolamento do vírus em cultivo celular. O material utilizado é o sangue, ou suspensão de órgãos do sistema linfóide, como tonsilas, baço, linfonodos, glândulas parótidas e rins. Como este vírus não é citopatogênico, são usados anticorpos específicos para a identificação do vírus em cultivo celular. Esta é, contudo, uma técnica muito lenta, podendo levar até sete dias após submissão das amostras ao laboratório. Alternativamente, pode ser utilizada a técnica de imunofluorescência e o teste de ELISA para a detecção dos antígenos virais. A técnica de *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pode ser uma alternativa para o diagnóstico deste vírus (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007)

2.5. Circovirose Suína (PCV2)

A síndrome da circovirose suína é uma infecção viral de grande importância econômica, com distribuição mundial, causada pelo circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (ALLAN & ELLIS, 2000). É o menor vírus animal descrito, tanto em diâmetro quanto em tamanho de genoma. Sua replicação ocorre, obrigatoriamente, durante a multiplicação

celular, pois o vírus depende de proteínas produzidas durante a fase S da mitose (STUDDERT, 1993). Os PCVs são vírus com 17 nm de diâmetro, icosaédricos, não-envelopados (TODD, 2000).

O Circovírus suíno (*Porcine circovirus* - PCV) foi relatado primeiramente por Tischer *et al.* (1974) que, posteriormente, demonstraram que esse vírus possuía um genoma composto de DNA de fita simples e circular, razão pela qual denominaram-no de circovírus suíno (TISCHER *et al.*, 1982).

A enfermidade foi reconhecida pela primeira vez no Canadá, em 1991 e, desde então, tem sido descrita em vários países (CLARK, 1997; ALLAN & ELLIS, 2000). Estudos retrospectivos para detecção de anticorpos para PCV1 e PCV2, em amostras de soros suíno coletadas em abatedouros no Canadá, em 1985, 1989 e 1997, indicaram que o PCV2 estava presente nestes suínos pelo menos dez anos antes da primeira identificação da Síndrome Multissistêmica do Definhamento Suíno - SMDS (MAGAR *et al.*, 2000).

O PCV2 está presente no Brasil há longo tempo tendo sido diagnosticado pela primeira vez em 2000 (CIACCI-ZANELLA & MORES, 2000) e, em um estudo retrospectivo, demonstrou-se que a circovirose suína está presente desde 1988 (CIACCI-ZANELLA & MORES, 2003), mas somente a partir de 2000 a SMDS e a SDNS (Síndrome da Dermatite e Nefropatia Suína) apresentaram-se de forma clinicamente evidente, ocasionando prejuízos maciços à suinocultura (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2006). Não se sabe a razão da mudança da infecção de um estado silencioso para uma forma epidêmica (BARBOSA, 2005). Atualmente, acredita-se que a infecção esteja disseminada no rebanho suíno brasileiro (BARBOSA, 2005) e de um momento para outro, as doenças associadas ao PCV2 incluíram-se entre as principais doenças de importância econômica mundial para a suinocultura (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2006).

O PCV suíno subdivide-se em dois tipos virais (LIU *et al.*, 2000): o circovírus suíno tipo I (PCV1), detectado inicialmente como contaminante persistente em cultivo contínuo de células de rim suíno – (PK15) e que não causa sintomatologia clínica em suínos (TISCHER *et al.*, 1974) e o circovírus suíno tipo II (PCV2) denominado, primeiramente, PMWS-PCV devido a sua associação com a síndrome de refugagem multissistêmica do leitão desmamado (SMDLD) (MEEHAN *et al.*, 1998). Atualmente utiliza-se o termo doenças associadas à circovirose suína (PCVAD), que inclui infecções

sistêmicas, PCV2 associado à Pneumonia, PCV2 associado a enterite, PCV2 associado a problemas reprodutivos e PCV2 associado a SDNS (OPRIESSING *et al.*, 2007).

A severidade da doença nos rebanhos infectados varia muito de granja para granja e, até, de país para país (OPRIESSNIG *et al.*, 2005). As infecções podem causar lesões nos tecidos linfóides e imunossupressão (TODD, 2000), porém foram também encontradas granjas em que uma alta porcentagem de suínos está infectada com PCV2, mas mantêm-se clinicamente saudáveis (OPRIESSNIG *et al.*, 2005).

A síndrome da circovirose suína pode se manifestar de seis formas diferentes: SDNS, pneumonias, enterites, falhas reprodutivas, tremores congênitos (KIM *et al.*, 2004; ALLAN, 2006) e SMDS que é a doença mais importante e mais estudada (ALLAN & ELLIS, 2000). Essas infecções caracterizam-se por pneumonia intersticial proliferativa e necrosante; enterite granulomatosa com ou sem refugagem; falhas reprodutivas que levam a abortos, natimortalidade, mumificação fetal e mortalidade de leitões pré-desmame com miocardite perinatal (MIKAMI *et al.*, 2005). Tremor congênito em leitões e doenças do sistema nervoso central, que levam leitões desmamados à morte súbita, também já foram relatados em associação a infecção pelo PCV2 (CASTRO, 2007).

O PCV2 pode ser transmitido de suínos infectados para não infectados pela forma horizontal e vertical; o vírus foi detectado em sêmen de suíno infectado experimentalmente com PCV2 (LAROCHELLE *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001). O contato com suínos infectados, instalações, equipamentos e fômites são fatores prováveis na transmissão horizontal do vírus; fatores de risco causadores de estresse, como densidade elevada, baixa qualidade do ar, água e ração, mistura de lotes com procedência e idades diferentes e presença de enfermidades concomitantes podem intensificar as manifestações clínicas e favorecer o desenvolvimento da doença (MADEC *et al.*, 2000).

Os prejuízos determinados pela SDMSD, além das mortes, devem-se ao declínio das taxas de crescimento e à queda na conversão alimentar determinada pela elevação do número de suínos refugos e/ou debilitados (CIACCI-ZANELLA *et al.* 2003).

Até o momento, sabe-se muito pouco sobre o mecanismo patogênico através do qual o PCV2 é capaz de causar circovirose suína. O PCV2 é necessário, mas não suficiente para causar a circovirose e co-fatores infecciosos (estirpe do PCV2 e outros microrganismos) e não infecciosos (genética, estresse, nutrição, manejo, dentre outros) são importantes para a manifestação do quadro clínico, gravidade das lesões e elevada carga

viral no hospedeiro. A presença de enfermidades concomitantes pode aumentar a manifestação clínica e favorecer o desenvolvimento da doença, como o parvovírus suíno (PVS), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), vírus da Doença de Aujeszky, dentre outros (KIM *et al.*, 2001; HARMS *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2003; ALLAN *et al.*, 2004; ELLIS *et al.*, 2004; RUIZ *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2006).

O envolvimento do PCV2 nas falhas reprodutivas em suínos tem causado interesse considerável, embora esse tipo de ocorrência não seja freqüente em surtos de SDMSD, a associação de PCV2 com distúrbios reprodutivos é uma manifestação clínica recente (BOGDAN *et al.*, 2001). Foi descrito primeiramente em duas granjas no Canadá (WEST *et al.*, 1999; O'CONNOR *et al.*, 2001), nos EUA e Oeste da Europa (JANKE, 2000; OHLINGER *et al.*, 2000).

A associação do PCV2 com abortos e natimortos indica que a transmissão transplacentária também pode ser um fator importante, se matrizes soro-negativas forem infectadas durante a prenhez (WEST *et al.*, 1999; ALLAN & ELLIS, 2000; ALLAN *et al.*, 2004; PENSAERT *et al.*, 2004). Também foi sugerida transmissão vertical em surto de SDMSD em porcos privados de colostro (JOLIE *et al.*, 2000). O agente foi isolado de fetos abortados no final da gestação e natimortos oriundos de granjas com histórico de distúrbio reprodutivo (HARDING, 2004). Inoculações experimentais demonstraram que o vírus tem capacidade de replicar e de causar anormalidades nos fetos em diferentes fases da gestação (WEST *et al.*, 1999; LYOO *et al.*, 2001).

Mais recentemente, foram realizados exames retrospectivos em tecidos do sistema reprodutor de suínos, coletados entre 1995 e 1998 e nenhum antígeno ou ácido nucléico de PCV1 e PCV2 foi detectado pelo PCR ou por imunistoquímica (BOGDAN *et al.*, 2001); os autores concluíram que as alterações reprodutivas associadas com PCV2 podem constituir uma recente manifestação clínica da doença e que a transmissão vertical não é o mecanismo primário para a disseminação do vírus.

Alguns experimentos preliminares têm sugerido que a infecção intra-uterina, no momento do cruzamento, deve ter um papel importante no desenvolvimento de desordens reprodutivas no terço final da gestação (CARIOLET *et al.*, 2001). Em contraste, os mesmos pesquisadores observaram que o PCV2 não foi capaz de atravessar a barreira placentária quando foi inoculado pelas vias intra-traqueal e intra-muscular, em porcas

gestantes (CARIOLET *et al.*, 2001). Abortos têm sido esporadicamente associados com a infecção pelo PCV2, em especial, em granjas recentemente formadas (WEST *et al.*, 1999; SANFORD, 2002).

A determinação da ocorrência da circovirose suína em uma granja é tarefa difícil, devido às participações de co-infecções que agravam a doença ou modificam os sinais clínicos, mascarando o diagnóstico diferencial. Recomenda-se conjugar pelo menos três fatores: histórico clínico do plantel, presença de achados de necrópsia e demonstração do antígeno viral dentro das lesões histopatológicas (SEGALÉS *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2006; FERNANDES *et al.*, 2006).

Para diagnosticar as falhas reprodutivas devido à infecção pelo PCV2 é importante seguir três critérios diagnósticos como: presença de abortos e/ou natimortos e/ou mumificados, presença de PCV2 em lesões do miocárdio e presença em outros tecidos fetais como nos linfonodos (KIM *et al.*, 2004; MIKAMI *et al.*, 2005; ALLAN, 2006).

O diagnóstico definitivo da síndrome da circovirose suína deve ser realizado por identificação de antígenos virais e/ou ácido nucléico (DNA) associado ao quadro clínico-patológico (CHAE, 2004; ALLAN, 2006). O PCV2 é detectado nos tecidos fetais através das técnicas de PCR, imunistoquímica e isolamento viral (WEST *et al.*, 1999; O'CONNOR *et al.*, 2001). As técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase são realizadas para a confirmação do isolamento, pois o agente não produz efeito citopático nos cultivos celulares (ALLAN & ELLIS, 2000). A detecção de anticorpos no soro de suínos para PCV2 pode ser realizada pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), imunoperoxidase (IP) e ELISA, sendo a IFI e IP as mais habitualmente utilizadas (ALLAN *et al.*, 1999; RODRIGUEZ-ARRIOJA *et al.*, 2000; BLANCHARD *et al.*, 2003). Sanchez *et al.* (2001) descrevem a técnica de imunoperoxidase para detecção de anticorpos em soro de fetos expostos ao PCV2 no terço final de gestação.

A relação do PCV2 com as diferentes síndromes faz com que o agente tenha um papel importante nas perdas econômicas em granjas de suínos através da morte e queda no desempenho desses animais. A detecção do agente foi relatada em diferentes continentes e as diferentes associações do agente com outros microrganismos (bactérias e vírus), potencializam e modificam os sinais clínicos, dificultando o diagnóstico clínico (CASTRO *et al.*, 2007).

A transmissão vertical associada com falhas reprodutivas já foi reportada (ALLAN *et al.*, 2004; PENSAERT *et al.*, 2004). Outros estudos assinalam a possibilidade de que possa haver outras vias de contágio como sêmen, fômites, instalações e contato com suínos infectados. Desta forma, o uso de inseminação artificial, não somente para introdução de novas genéticas, mas também para melhor controlar a produção no aspecto de transmissão de doenças, deve ser mais estudada, pois o sêmen pode representar uma potente forma de introdução de PCV2 no rebanho (LAROCHELLE *et al.*, 2000; CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004).

Barbosa *et al.* (2006) verificaram a existência de diferentes perfis sorológicos de infecção pelo PCV2, pois estes podem estar associados às características de imunidade do rebanho, às condições ambientais e de manejo que dificultam ou favorecem a eliminação do agente, nas diferentes faixas etárias, dentro do mesmo rebanho.

Doenças causadas por bactérias

2.6 Brucelose Suína

É uma zoonose de distribuição universal e, atualmente, os casos de brucelose humana têm sido associados à doença profissional (SANTOS-NETO *et al.*, 1999; POESTER *et al.*, 2002; GODFROID & KÄSBOHRER, 2002).

A brucelose é causada por uma bactéria do gênero *Brucella*, que são pequenos coco-bacilos gram-negativos que normalmente aparecem isolados, embora, às vezes, aos pares e até em pequenos grupos. Variam de 0,6 a 1,5 μ m de comprimento por 0,5 a 0,7 μ m de diâmetro (ALTON *et al.*, 1988), são imóveis, não formam esporos e não apresentam cápsula (ALTON *et al.*, 1988; ESTEIN, 1999), flagelos ou pili (ESTEIN, 1999). O gênero *Brucella* possui atualmente sete espécies: *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Brucella neotomae*, *Brucella canis*, *Brucella ovis* e *Brucella maris*, as quais apresentam cerca de 98% de homologia genética. Não há especificidade quanto ao hospedeiro que infectam, mas existe uma predileção por determinada espécie animal. Ex. *B. suis* - suínos (CARTER & CHENGAPPA, 1991).

A brucelose foi descoberta por Nocard, em 1885, como uma enfermidade humana, quando descreveu “inumeráveis micrococcos” em esfregaços, tendo sua ocorrência em animais sido caracterizada apenas alguns anos mais tarde, em 1897, por Bang & Stribolt. O primeiro isolamento da *Brucella suis* foi realizado por Von Hutyra, em 1909, de um aborto epidêmico suíno. Com o passar do tempo, a infecção animal ganhou destaque, ficando a infecção humana em segundo plano na maioria dos países. Essa situação está relacionada ao fato de a infecção humana ficar restrita a determinadas áreas geográficas onde é endêmica a ocorrência de *Brucella melitensis*, a espécie mais patogênica para humanos ou, então, a determinados grupos ocupacionais mais expostos ao risco de infecção, em áreas onde não ocorre a mesma.

Como regra geral, as brucelas têm predileção por órgãos reprodutivos de animais, machos e fêmeas, sexualmente maduras.

A brucelose suína é causada pela *Brucella suis*, prevalente na América Latina e Ásia e eventualmente nos Estados Unidos. A doença manifesta-se com lesões inflamatórias crônicas nos órgãos reprodutivos e também podem ocorrer lesões em ossos e articulações. A infecção é transmitida por ingestão ou pelo coito e pode ser autolimitante em alguns casos (QUINN et al., 2005). Causa transtornos reprodutivos graves, tais como, abortos em qualquer fase de gestação, normalmente 33 dias após a infecção da fêmea (MATOS et al., 2004), natimortos, queda na produção de leitões e endometrite em porcas; nos machos causa orquite, alterações nas glândulas acessórias, perda de libido, esterilidade temporária ou permanente; em leitões geralmente ocasiona espondilite associada à paralisia dos membros posteriores e transtornos ósseos e articulares tais como: claudicação, incoordenação e paralisia posterior, levando à eliminação de animais de alto valor zootécnico (METCALF et al., 1994; QUINN et al., 2005; ALMOND et al., 2006) e, conseqüentemente, enormes prejuízos econômicos, ocasionados pela falência reprodutiva, traduzidos pela queda na produção de leite e de carne, são agravados pela desvalorização comercial dos animais e dos rebanhos acometidos (MAPA, 2008).

Além dos problemas causados à saúde pública, a brucelose também gera prejuízos econômicos ao tornar o produto vulnerável às barreiras sanitárias, comprometendo a sua competitividade no comércio internacional (BRASIL, 2003).

Os órgãos de predileção são aqueles em que há maior disponibilidade de elementos necessários para seu metabolismo, como o eritritol que está presente no útero gravídico,

tecidos mamários, ósteo articulares e órgãos do sistema reprodutor masculino (CARTER & CHENGAPPA, 1991).

A doença dissemina-se rapidamente na granja, com taxas de morbidade entre 50-80% e pode comportar-se como epidemia quando recém introduzida numa criação, causando surtos de abortos e a mortalidade entre adultos é insignificante (MATOS *et al.*, 2004). A bacteremia ocorre de uma a sete semanas após a infecção e persiste em torno de 5 semanas. Tem sido observada bacteremia intermitente ocorrendo entre uma semana a 34 meses. A infecção no macho pode persistir durante toda a vida (MATOS *et al.*, 2004).

A OIE classifica a brucelose como uma doença da lista B, onde estão incluídas as enfermidades que têm importância sócio-econômica e/ou para saúde pública e conseqüências significativas no comércio internacional de animais e seus produtos (OIE, 2008).

De acordo com a Normativa 19, de 15 de fevereiro de 2002, toda granja de suídeos certificada (GRSC) deverá ser livre de brucelose, sendo esta doença de notificação obrigatória. Os animais deverão ser submetidos a provas sorológicas com intervalo de 6 em 6 meses, utilizando o antígeno acidificado tamponado, devendo os soros reativos serem submetidos a provas complementares do 2-Mercaptoetanol (2-ME) ou fixação de complemento (FC ou RFC) (MAPA, 2002).

No Brasil, a brucelose suína já foi considerada a principal fonte de infecção para humanos, sendo a *B. suis* altamente patogênica para o homem, suplantada apenas pela *B. melitensis* (BLAHA, 1989; PENNY, 1994).

A brucelose suína, com a tecnificação na exploração comercial dessa espécie, teve uma redução acentuada de prevalência, embora focos esporádicos ainda possam ocorrer mesmo em granjas tecnificadas. Estudos sorológicos no Brasil revelaram que as maiores taxas de soropositivos são obtidas em trabalhadores de frigoríficos e pessoal técnico ligado à área (MATOS *et al.*, 2004).

O sorodiagnóstico é a base do combate à brucelose em rebanhos. Permite o monitoramento tanto de propriedades como de regiões inteiras, além de vigiar zonas de onde a doença já foi erradicada. Todos os testes devem ser utilizados respeitando-se as normas técnicas estabelecidas pelos organismos internacionais, com antígenos padronizados e específicos para cada prova (ALTON, 1988). Os principais testes, para brucelose, são os que buscam detectar anticorpos no soro e no leite.

O Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) no Brasil, em 10 de janeiro de 2001, preconizou o uso do Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (TAAT), que é uma prova qualitativa rápida, prática e de boa sensibilidade (ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD- OMS, 1986; BRASIL, 2001) como prova de triagem e, como provas confirmatórias o 2-ME que tem sua especificidade aumentada por inibição da atividade aglutinante da IgM mediante processo químico, que consiste no tratamento do soro com a droga 2-ME (TIMONEY *et al.*, 1988; BRASIL, 2008) e a RFC (BRASIL, 2008).

O Código Zoosanitário Internacional da OIE refere a RFC como um importante suporte técnico e exigência do mercado externo e a recomenda como prova confirmatória, triada pela TAAT (OIE, 2008).

Alton *et al.* (1975), Araj *et al.* (1988) e Cooper (1992) relataram que o teste indireto de referência para triagem ainda é a soroglutinação rápida em placas - TAAT, cuja modalidade mais conhecida é o Teste Rosa Bengala (TRB). Se houver necessidade, podem ser empregados como testes confirmatórios a RFC, a Prova do 2-ME ou o teste de Coombs, mais específicos e eficientes na detecção de infecções crônicas (CARTER & CHENGAPPA, 1991; METALCALF *et al.*, 1994).

2.7 Leptospirose Suína

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, geralmente de caráter ocupacional (ALMEIDA *et al.*, 1994), representando risco para a saúde pública (FAINE *et al.*, 1999). É classificada como uma doença da lista B (OIE, 2008). É uma importante causa de prejuízos em rebanhos de reprodução, no entanto, o impacto econômico da doença está restrito a criações industriais do hemisfério Norte, Nova Zelândia, Argentina e Brasil (CLARK, 1996; MAILLOUX, 2001).

A etiologia da leptospirose foi demonstrada inicialmente em 1915, no Japão e na Alemanha e, até 1989, a classificação foi apenas sorológica, onde o gênero *Leptospira* foi dividido em duas espécies, a *Leptospira interrogans*, que compreende todas as estirpes patogênicas ao homem e aos animais; a *Leptospira biflexa*, reunindo as estirpes saprófitas isoladas do ambiente. Para a *Leptospira biflexa* foram descritos mais de 60 sorovares

(FAINE, 1994; LEVETT, 2001).

A espécie *L. interrogans* está dividida em sorogrupos, ou seja, as que apresentam analogias antigênicas são classificadas no mesmo sorogrupo. São reconhecidos 23 sorogrupos e são divididos em mais de 212 sorovares (ELLIS, 1999). Campbell & Peerbaye (1992) afirmaram que os sorovares de maior frequência de registro na espécie suína no mundo são: *pomona*, *tarassovi*, *canicola* e *icterohaemorrhagiae*. A *Leptospira interrogans*, sorovar *pomona* é o patógeno mais importante do grupo de leptospiros para o suíno. Entretanto, outros sorovares como *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *canicola* e *bratislava* também têm sido isoladas (BOLIN *et al.*, 1991; WILLIAM *et al.*, 1992).

A primeira referência encontrada na literatura sobre a transmissão da leptospirose de suínos a humanos é de Wagener, em 1942, na Alemanha (GUIDA, 1958) e no Brasil foi descrito por Guida *et al.* (1959).

Os sintomas em suínos jovens são inespecíficos como: febre, icterícia, anorexia e hemoglobinúria. Nas matrizes o problema é de esfera reprodutiva, gerando abortamentos, partos distócitos, leitegadas pequenas, baixo número de nascidos totais, mumificação fetal, descarga vulvar, natimortos e nascimento de leitões fracos, de baixa viabilidade pós parto, aumentando significativamente o índice de mortalidade (BRADKE, 2001; EDWARDS, 1979; VASCONCELLOS, 2004).

A doença apresenta-se de duas formas: aguda, que coincide com a leptospiremia e observa-se perda de apetite, febre e apatia dos animais e a forma crônica, na qual ocorrem abortamento no terço final da gestação, repetição de cio, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de leitões fracos, baixo número de leitões nascidos, descarga vulvar e morte embrionária (ELLIS, 1989; RAMOS *et al.*, 2002).

Os suínos infectam-se através do contato com água ou alimentos contaminados, com urina, fetos abortados e descargas uterinas de animais portadores. A infecção pode ocorrer pelas vias oral, venérea, pele lesada, conjuntiva ou outras mucosas (SANTA ROSA *et al.*, 1980). O período de incubação é de 2 a 5 dias, ocorrendo disseminação hematogênica com localização e proliferação em órgãos parenquimatosos, particularmente fígado, rins, baço e, algumas vezes, nas meninges (ROSE, 1966). A leptospiremia dura, em geral, de dois a três dias, há uma fase febril discreta e, já no quarto dia, as leptospiros estão presentes nos rins, onde se localizam no lúmen dos túbulos proximais, causando nefrite intersticial (CORREA, 1992). Também penetram e multiplicam-se nos fetos, podendo levar à morte e

reabsorção fetal, abortamento ou prole fraca. Embora existam muitos sorovares de leptospiras, somente alguns são usualmente endêmicos em determinadas regiões. As leptospiras tendem a persistir em lugares como túbulos renais, olhos e útero, onde a atividade de anticorpos é mínima (BASTOS, 2006; SARAZÁ & SÁNCHEZ-VAZCAÍNO, 2002).

Ellis *et al.* (1986) constataram a persistência de leptospiras em fêmeas suínas que abortaram, confirmando a presença da bactéria nos rins e tecidos genitais em até 147 dias após o abortamento. Soto *et al.* (2006), em fêmeas suínas desafiadas com *Leptospira interrogans*, sorovar *canicola*, relataram a transmissão vertical da leptospirose suína com o nascimento de leitões saudáveis e identificação da positividade pela técnica de PCR em diversos órgãos destes animais.

É sabido que as vacinas contra a leptospirose, em suínos, previnem a doença. Entretanto, a especificidade dos sorovares limita a eficiência de vacinas mortas com células integras (KOIZUMI & WATANABE, 2005). White *et al.* (1982) observaram uma significativa queda na taxa de abortamento e de mortalidade fetal em suínos vacinados com duas vacinas comerciais contra a leptospirose suína. Lobo *et al.* (2004) admitiram que a alteração observada na predominância de sorovares de leptospiras, em testes sorológicos efetuados em suínos, deveu-se à prática da vacinação.

Um estudo realizado em fetos suínos abortados revelou uma prevalência de leptospirose em 9,8% dos casos (KIRKBRIDE *et al.*, 1978). Ellis (1986), em uma investigação de causas de aborto e mumificação fetal, revelou o isolamento de *Leptospira interrogans* sorovar *australis* em 91% dos isolados.

O diagnóstico da leptospirose suína pode ser realizado através de sinais epidemiológicos da doença, clínicos dos animais e confirmados por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção direta ou indireta do agente (GENOVEZ, 2007; FAINE *et al.*, 1999).

A técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM) é o método de referência e revela anticorpos contra antígenos estruturais das leptospiras (leptospiras mortas ou destruídas). Caracteriza-se por ser um teste de baixa sensibilidade, grande especificidade, não identifica portadores e não diferencia infecção de campo e vacinação. De acordo com o Ministério da Saúde, o animal positivo deve apresentar 50% ou mais de aglutinação em relação ao controle (BADKE, 2001; SHIMABUKURO, 2003).

Outros métodos de diagnósticos são: exame a fresco em campo escuro, coloração pela prata, imunofluorescência direta, cultivo em laboratório, inoculação em animais de laboratório e o método de PCR (FAINE *et al.*, 1999). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a técnica de PCR é mais específica, sensível e rápida para o diagnóstico da leptospirose, sendo uma importante ferramenta diagnóstica (SHIMABUKURO, 2003; VASCONCELOS, 2007).

O diagnóstico em produtos fetais geralmente é difícil, sendo realizado na maioria das vezes através da técnica de imunofluorescência a partir de amostras de fluido fetal (BOLIN *et al.*, 1991), PCR (VITALE *et al.*, 2005) e imunoistoquímica (SCANZIANI *et al.*, 1991).

Embora esteja disponível, na atualidade, um grande número de técnicas para o diagnóstico laboratorial de rotina para leptospirose, nenhuma associa as exigências de sensibilidade, especificidade e praticidade (SHIMABUKURO, 2003).

O controle e a prevenção da doença envolvem medidas higiênicas, de manejo, vacinação e tratamento medicamentoso, tudo isto visando a diminuição da quantidade de leptospiras lançadas no ambiente, além da identificação e eliminação dos fatores que ampliam a sobrevivência do agente em ausência de parasitismo (DELBEM *et al.*, 2004). O controle de roedores também é muito importante, uma vez que estes são a principal fonte de eliminação da bactéria (BRADKE, 2001; RENDE, 2007; VASCONCELOS, 2007; SOTO, 2007).

O uso de desinfetantes alcalinos (ex: soda cáustica) e detergentes, juntamente com programa de desinfecção, manejo “todos dentro todos fora”, são medidas essenciais, de importância para eliminar as bactérias das instalações (DELBEM *et al.*, 2004; SOTO, 2007).

A imunização de animais suscetíveis deve ocorrer com vacinação a cada seis meses, com vacina que apresente os sorovares das leptospiras presentes na região (DELBEM *et al.*, 2004; SOTO, 2007). As vacinas anti-leptospirose suína disponíveis no mercado brasileiro são constituídas de bactérias íntegras inativadas polivalentes. Os sorovares comumente presentes são: *bratislava*, *canicola*, *copenhageni*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* e *pomona* (CARVALHO, 2005; SOTO, 2007). Eventualmente, a vacinação não impede o desenvolvimento da doença, mas ela apresenta uma evolução menos severa da doença e não determina prejuízos econômicos (CARVALHO, 2005).

Apesar das limitações das vacinas contra a leptospirose, Frantz (1989) relata redução na taxa de natimortos em rebanhos de suínos tratados com bacterinas contendo cinco ou seis sorovares. Existe o consenso de que a proteção conferida por bacterinas anti-leptospira é sorovar específica (PRESCOTT *et al.*, 1991), no entanto, já foi observada a proteção cruzada entre representantes de um mesmo sorogrupo (COSTA *et al.*, 1998; TABATA *et al.*, 2002). A reação cruzada, conferindo proteção a partir de soros de indivíduos vacinados, é a base do desenvolvimento de novas vacinas que poderão conferir proteção cruzada, juntamente com estudos e produção de vacinas a partir de gens da *L. interrogans* podem ser um futuro para a proteção contra a leptospirose suína (SOTO, 2007).

Apesar de todas estas técnicas, a prevenção da leptospirose suína é largamente dependente de medidas de saneamento da granja e de diagnóstico da doença, que muitas vezes são difíceis de serem implementadas, principalmente em regiões onde a suinocultura não é tecnificada, gerando um problema para o controle e erradicação da doença no mundo (DELBEM *et al.*, 2004; SOTO, 2007).

2.8 Erisipela Suína

A erisipela suína (ES) ou ruiva é uma doença causada por bactérias do gênero *Erysipelothrix spp.*, um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não-móvel, não esporulado e que pode ser filamentososo (WOOD, 1999). Atualmente, reconhece-se 24 sorotipos, distribuídos entre as espécies *E. rhusiopathiae* (sorotipos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21 e N) e *E. tonsillarum* (3, 7, 10, 14, 20, 22 e 23). Estudos de hibridização de DNA sugerem que o gênero *Erysipelothrix* compreende quatro espécies, sendo *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, e que *E. rhusiopathiae* sorovar 13 e *E. rhusiopathiae* sorovar 18 seriam espécies diferentes (TAKAHASHI *et al.*, 1992). Entretanto, poucos estão associados com doença clínica (WOOD & HARRINGTON, 1978; EAMENS *et al.*, 1988).

É uma doença de distribuição mundial (PENRITH & SPENCER, 2004), de caráter hemorrágico e que usualmente cursa com lesões cutâneas, articulares, cardíacas ou septicêmicas em suínos, além de aborto e mumificação fetal e de outros transtornos reprodutivos (HOFFMANN & BILKEI, 2002). Adicionalmente, baixa fertilidade,

caracterizada por aumento na taxa de abortos e natimortos e nascimento de leitegadas pequenas tem sido atribuída à infecção crônica por *Erysipela suína* (HOFFMANN & BILKEI, 2002), podem também estar associadas a epidemias de aborto (HOLLER, 1994).

Suíños de todas as idades podem se infectar, mas animais entre dois e 12 meses e porcas prenhes são as categorias mais susceptíveis (WOOD, 1999).

Conforme Haesebrouck (2004), de 30-50% dos suínos são portadores da bactéria que infecta as tonsilas e outros órgãos linfóides sem causar sinais clínicos sistêmicos.

O reservatório natural mais importante de *E. rhusiopathiae* é o suíno doméstico (WOOD, 1999), que durante a infecção aguda pode eliminá-la nas fezes, urina, saliva e secreções nasais (WOOD, 1999; RADOSTITIS *et al.*, 2003). Em um rebanho, tanto casos esporádicos quanto diversos casos de doença septicêmica aguda podem ocorrer. A bactéria permanece viável no solo, na água, na cama e nos alimentos (RADOSTITIS *et al.*, 2003).

O diagnóstico clínico da ES é considerado fácil, quando há lesões de pele consideradas patognômicas (WABACHA, 1998; PESCADOR *et al.*, 2007). Entretanto, septicemia aguda ou subaguda sem lesões características na pele podem ser confundidas com peste suína africana e infecções sistêmicas por *Salmonella spp.*, *Streptococcus spp* e *Pasteurella spp.* (WABACHA, 1998). Além de problemas septicêmicos, que podem provocar mortes súbitas principalmente em fêmeas suínas reprodutoras (FRIENDSHIP & BILKEI, 2007), a infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* também pode ocasionar transtornos reprodutivos caracterizados por endometrite e aborto (PENRITH & SPENCER, 2004), aborto no final de gestação (KEMENES & SZEKY, 1971), mumificação fetal, aumento da natimortalidade e nascimento de leitegadas reduzidas (HOFFMANN & BILKEI, 2002). Na grande maioria dos casos, sinais clínicos como apatia, febre, anorexia, vômitos (LOVEDAY, 1962; WOOD, 1999) e descargas vulvares (HOFFMANN & BILKEI, 2002) são freqüentes.

O diagnóstico pode ser realizado através de exames bacteriológicos, sorológicos e moleculares (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). No ELISA consideram-se positivas amostras de soro que apresentem título de 40 ou acima. A vacinação com adjuvante aquoso induz titulação média de 60 e não mais que 120 e oleosa de 120-200 (HIPRA, 2008).

A imunoprofilaxia com o uso de bacterinas comerciais tem sido indicada, entretanto, os resultados são controversos em relação à prevenção da doença (IMADA *et al.*, 2004;

EAMENS *et al.*, 2007). Em granjas com problemas por ES a prevenção da doença por métodos convencionais tem sido realizada com a utilização de antibióticos a base de penicilina e/ou oxitetraciclina pela via oral ou parenteral (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Doença causada por protozoário

2.9 Toxoplasmose

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii*, parasito pertencente ao Reino Protista (LEVINE *et al.*, 1980). O primeiro relato do protozoário ocorreu em 1908, por Nicolle & Manceaux, na Tunísia, África (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) e posteriormente por Splendore, na cidade de São Paulo (SPLENDORE, 1908). Desde então se tem realizado levantamentos da infecção toxoplásmica em quase todos os continentes. Esse parasito é um coccídeo intracelular obrigatório que pode ser encontrado de três formas: taquizoítos, bradizoítos ou cistos teciduais e oocistos, este último somente no intestino dos felídeos. O homem, animais selvagens e domésticos e também os pássaros são os hospedeiros intermediários e os hospedeiros definitivos são os felídeos, pois só neles ocorre o ciclo sexuado do parasito, com a eliminação de oocistos que no ambiente esporulam e se tornam infectantes (DUBEY, 1998; KAWAZOE, 2005).

O gato é considerado a principal fonte de infecção para suínos e demais espécies de vertebrados, através da contaminação da água e da ração com oocistos (VIDOTTO *et al.*, 1990; ARAUJO, 1999). Os suínos podem, também, ingerir cistos teciduais comendo roedores infectados ou carne infectada, oferecida na forma de restos ou adquirir infecção transplacentária (GIRALDI *et al.*, 1991; LINDSAY *et al.*, 1992).

A patogenia e sinais clínicos são bem variados, ocorrendo desde casos benignos com febre e discreto aumento ganglionar, até casos de grave comprometimento do sistema nervoso central, alterações oculares provocando cegueira, comprometimento do sistema reprodutivo provocando aborto (NEVES, 2003; SILVEIRA, 2001). A infecção natural dos hospedeiros, em geral, é adquirida, principalmente, pela ingestão de cistos através do consumo de carne crua ou mal cozida ou através de oocistos em alimentos contaminados

(MORENO *et al.*, 2007).

O primeiro relato, em humanos foi feito por Castellani, em 1913 (PIZZI, 1997). A toxoplasmose, do ponto de vista epidemiológico é uma infecção de ampla distribuição geográfica, pois está presente em todo planeta, com índices de soropositividade variando de 23 a 83%, dependendo de alguns fatores: climáticos, socioeconômicos e culturais. A infecção ocorre em todos os mamíferos e aves (NEVES *et al.*, 2003).

A toxoplasmose leva a dois graves problemas: falhas reprodutivas em animais de produção e implicações na saúde pública, associadas ao consumo de carne ou leite contaminados (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2000).

A infecção transplacentária pode causar aborto ou nascimento de filhotes com sinais clínicos severos, podendo causar morte (DUBEY, 2005).

A toxoplasmose suína foi diagnosticada primeiramente nos Estados Unidos por Farrel *et al.* (1952), em rebanho com mortalidade em todas as faixas etárias. No Brasil, foi diagnosticado em suínos pela primeira vez por Silva (1959), em Minas Gerais, pelo encontro dos protozoários nos pulmões, coração, fígado e linfonodo mesentérico, em um suíno de 28 dias de idade, de uma leitegada, da qual dois leitões já haviam morrido nos primeiros dias de vida (SILVA, 1959)

Os suínos adquirem a toxoplasmose principalmente pela ingestão de água e de ração contaminada com fezes de felinos. A maioria das infecções são sub-clínicas, ocorrendo doença clínica em neonatos e leitões jovens e a ocorrência de aborto (MORENO *et al.*, 2007). Pode causar abortos, natimortos, presença de fetos mumificados e de leitões com viabilidade baixa. A toxoplasmose já foi reportada no Brasil associada à parvovirose, causando elevada taxa de mumificação (CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2001). Nesse trabalho os autores relataram, além da elevada taxa de fetos mumificados, 100% das 30 matrizes pesquisadas eram positivas sorologicamente para *T. gondii*.

Porcas inoculadas com taquizoítos de *T. gondii* durante a gestação, abortaram ou apresentaram fetos mumificados e leitões aparentemente normais (VIDOTTO *et al.*, 1987). Nos suínos adultos, os sinais incluem febre, cegueira, fraqueza e queda no ganho de peso (MORENO *et al.*, 2007).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela demonstração do coccídio (parasitológico) ou por métodos indiretos (imunológico) e por biologia molecular. A pesquisa direta do *T. gondii* pode ser feita a partir de diversos componentes orgânicos

como sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, leite, escarro, medula óssea, cortes de placenta, além de conteúdos de infiltrados cutâneos, do baço, fígado, músculos e linfonodos (NEVES *et al.*, 2003; MORENO *et al.*, 2007). Diversas provas imunológicas têm sido utilizadas na avaliação da infecção toxoplásmica como reações de hemaglutinação (HAI), imunofluorescência indireta, aglutinação por imunoabsorção (ISAGA), ensaio imunoenzimático (ELISA) (COSTA *et al.*, 2007).

O diagnóstico imunológico é feito pela presença de anticorpos específicos, através de sorologia. A hemaglutinação indireta (HAI) foi descrita pela primeira vez, em 1957, por Jacobs & Lunde, como uma técnica que revela constituintes citoplasmáticos de origem protéica (VIEIRA *et al.*, 2005). A imunofluorescência indireta (IFI), que revela anticorpos IgM ou IgG, dirigidos contra os antígenos de superfície do *T. gondii*, de acordo com o conjugado anti-gamaglobulina utilizado (CAMARGO, 1974). No Brasil estas técnicas têm sido utilizadas por vários autores para levantamentos sorológicos da toxoplasmose suína, com valores bastante distintos entre as regiões analisadas (GARCIA *et al.*, 1999; FIALHO & ARAUJO, 2003; VIEIRA *et al.*, 2005). Estas diferenças quanto à frequência de sororeagentes a *T. gondii* é um importante fator a ser estudado, correlacionando os diferentes sistemas de manejo na criação de suínos que possam estar servindo como fonte de infecção a estes animais e, desta forma, servir de fonte de infecção à população humana. Os estudos de prevalência de *T. gondii* na espécie suína têm grande relevância por ser esta espécie considerada uma das principais fontes de infecção para a espécie humana, especialmente pela ingestão de carne mal cozida (DAVIES *et al.*, 1998). Estes estudos servem para avaliar, além da ocorrência desta infecção, o risco a que estão expostos os humanos que ingerem carne em determinada região (ISHIZUKA, 1978; D'ANGELINO & ISHIZUKA, 1986).

Recentemente, foram detectados anticorpos para o *T. gondii* pela técnica de HAI, em 16% dos soros testados de fêmeas reprodutoras de criações de suínos tecnificadas, indicando que o *T. gondii* está presente nestas criações e é capaz de infectar estes animais (VIEIRA *et al.*, 2005).

O diagnóstico sorológico da toxoplasmose deve ser corretamente interpretado para diferenciar infecção de doença. Se a intenção é avaliar a imunidade do paciente, os testes sorológicos que detectam anticorpos da classe IgG são suficientes (CAMARGO, 1996)

2.10 Revisão dos testes utilizados

a) Inibição da Hemaglutinação (HI)

O método de HI é utilizado para mensurar anticorpos, capazes de reagirem com antígenos capazes de induzir aglutinação de hemácias. Alguns microorganismos possuem, em sua superfície, estruturas capazes de se ligar a receptores presentes nas hemácias, produzindo o fenômeno de hemaglutinação (HA). Essas estruturas são formadas de glicoproteínas e são chamadas de hemaglutininas (MADRUGA *et al.*, 2001).

A ligação do patógeno com o receptor da hemácia de suíno é regida primariamente pela especificidade estrutural, contudo, ainda influenciam fatores como pH, temperatura, concentração e composição iônica do meio (BERCHIERI & MACARI, 2000). Neste método a presença de anticorpos capazes de inibir a reação de HA do patógeno determina sua identificação sorológica.

O método de HI é freqüentemente utilizado para pesquisa e titulação de anticorpos contra o parvovírus suíno. A técnica baseia-se na determinação de anticorpos que impedem a reação de hemaglutinação. As vantagens da HI são o baixo custo, a possibilidade de se titular os anticorpos, sua elevada sensibilidade e especificidade, o que proporciona a esta prova sorológica ser considerada prova “padrão ouro”, mesmo em comparação a outros métodos mais modernos e custosos (STREK *et al.*, 2007). Entre as desvantagens estão as dificuldades na montagem e padronização da prova e na manutenção do vírus padrão, além das variações que podem ocorrer nos resultados entre diferentes laboratórios (FREITAS, 2006).

Para a execução do HI, é antes necessário revelar a atividade biológica do agente contra o qual o soro será testado, efetuando a constatação da HA. Para isto, uma suspensão de hemácias é incubada em repouso com diluições seriadas do agente por um determinado tempo e temperatura. Geralmente utilizam-se placas de microtitulação com 96 poços com fundo em V, o que torna o processo mais simples e de fácil execução. Após a incubação é realizada a leitura de hemaglutinação. As hemácias que aglutinarem por ação do agente, irão sedimentar no fundo da cavidade. Devido à aglutinação, formarão uma fina camada de hemácias aglutinadas sob a superfície da cavidade semelhante a um tapete. As hemácias que não hemaglutinarem também irão sedimentar, entretanto, formarão um aglomerado

(botão) de hemácias que irá se deslocar ao inclinar a placa. A maior diluição capaz de produzir completa aglutinação das hemácias corresponde ao título do agente testado a uma unidade hemaglutinante. Após titulada a suspensão antigênica (agente), é comum empregar de quatro a oito unidades hemaglutinantes em um teste (BERCHIERI & MACARI, 2000; MADRUGA *et al.*, 2001; TIZARD, 2002). Se na amostra de soro houver a presença de anticorpos específicos contra o agente, os mesmos irão se ligar na hemaglutinina do patógeno e impedir que ocorra a hemaglutinação. Caso não haja anticorpos no soro, a hemaglutinina ficará ativa e irá ocorrer a hemaglutinação.

b) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O teste de Elisa foi descrito pela primeira vez em 1971, este, se baseia na reação antígeno-anticorpo sob reação enzimática que da origem a campo de coloração característica. Estes exames são utilizados como ferramenta de diagnóstico dos casos clínicos, sendo que sua aplicação pode servir para localização de problemas sub-clínicos ou para estabelecer estratégias e medidas de controle como no caso do uso da sorologia para estabelecer um soroperfil dos animais e humanos. As vantagens oferecidas pela técnica são a praticidade, alta sensibilidade, podendo ser utilizada para detecção de antígeno e anticorpos no soro, leite e secreções, além de poder ser específica para uma determinada classe de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA ou IgE) e pela automação, pois pode-se testar um grande número de amostras ao mesmo tempo. Como desvantagens: o custo dos kits (micro-placa, reagentes) e espectrofotômetro de placa. Pode-se diagnosticar: VDA, PSC, PRRS, brucelose, PVS, dentre outros. Tem sido a técnica mais utilizada na monitoria e diagnóstico de doenças de suínos, devido a possibilidade de automação que a técnica oferece (QUIN, 2005).

A detecção de um antígeno imobilizado sobre uma placa de poliestireno, mediante anticorpos que, direta ou indiretamente, produzem uma reação e, posteriormente, adicionado um cromógeno para que o resultado possa ser mensurado por um espectrofotômetro que mede a absorbância no comprimento de onda, que varia entre 340 e 650nm, de acordo com o cromógeno utilizado. Esta absorbância será proporcional à quantidade de anticorpo ou antígeno específico presente em cada amostra testada (MADRUGA, 2001; TIZARD, 2002).

Existem vários tipos de ELISA, dentre eles, o indireto é o método de ELISA mais utilizado. Ele consiste na sensibilização de micro-placa de poliestireno com um determinado antígeno e, a seguir, adiciona-se as amostras de soro a serem testadas, realizando incubação e lavagens e, se houver anticorpos específicos no soro, eles irão permanecer fixados ao antígeno. Após, adiciona-se um anti-anticorpo conjugado a uma enzima, chamado simplesmente de conjugado, realizando nova lavagem e adicionado o substrato que inicia uma reação em contato com a enzima resultando em mudança de coloração. Deste modo, se houver anticorpos no soro, o conjugado irá se ligar, possibilitando a mudança de coloração (BERCHIERI, 2000).

c) Imunoperoxidase em monocamada (IPMA)

A técnica usada no presente trabalho seguiu a metodologia descrita por Balasch (1999) e Rodrigues-Arrijoja et al. (2000), com modificações propostas por Gava (2006) e Barbosa (2008).

A Imunoperoxidase em monocamada (IPMA) ou Imunocitoquímica (ICQ) é o conjunto de técnicas que usam anticorpos para identificar moléculas que funcionam como antígenos, nos tecidos. Esta identificação ocorre devido a reações específicas, interação anticorpo-antígeno, que confere cor aos compostos que se pretendem estudar/demonstrar, permitindo a sua visualização ao microscópio óptico. Os anticorpos podem ser mono ou policlonais, isto é, ter origem de uma única linhagem de produtores de anticorpos ou de múltiplas linhagens. (RODRIGUEZ-ARRIOJA *et al.*, 2000) Para a visualização da reação antígeno-anticorpo pode-se usar fluoresceínas, complexo avidina-biotina (ABC), peroxidase-anti-peroxidase, dentre outros. Esses “reveladores” podem estar associados ou não a um anticorpo e podem precisar ou não de um novo procedimento com algum corante específico para serem visualizados (BALASCH, 1999). Como os anticorpos são moléculas bastante grandes, que não têm acesso direto ao citoplasma, torna-se necessário fixar e permeabilizar as células. A fixação tem também a vantagem de permitir que o sinal do anticorpo secundário tenha um tempo de vida mais longo.

Rodriguez-Arrijoja *et al.* (2000) relataram que a importância dessa técnica está relacionada à obtenção de resultados que auxiliam o entendimento do padrão de infecção dentro do rebanho, sendo possível traçar estratégias de controle e realizar estudos epidemiológicos.

Nawagitgul *et al.* (2002) comentaram que IPMA exige experiência, não somente na preparação do cultivo celular, mas também na acurácia de interpretação dos resultados, pois como demonstraram McNair *et al.* (2004) ocorre uma grande variação nos títulos obtidos entre diferentes laboratórios.

d) Técnica de soro aglutinação rápida em placa

É o método sorológico mais simples e comumente utilizado. É um método sensível, quantitativo, porém de baixa especificidade. Muito utilizado para triagem em populações suínas para doenças como leptospirose, erisipelose, brucelose, dentre outras (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). É realizado sobre uma superfície de vidro, podendo ser uma placa específica para o teste ou lâmina simples. O teste é efetuado com a adição de uma gota de antígeno e uma gota da amostra do soro sobre esta superfície. Este material deve ser homogeneizado e após procede-se a leitura a olho nu ou com a ajuda de lentes e incidência de luz. Caso existam aglutininas no soro, observa-se a presença de grumos formados pelo complexo antígeno-anticorpo. A presença desses grumos é indicativa de que o soro possui anticorpos específicos para reagir com o antígeno utilizado (TIZARD, 2002). Esta aglutinação (grumos) pode ocorrer em distintos graus, sendo possível estimar através de tabelas comparativas se o soro possui concentrações de anticorpos baixas ou altas. Entretanto, se ocorrer um excesso na concentração de anticorpos, pode ocorrer inibição da reação de aglutinação, fenômeno este conhecido como pró-zona (TIZARD, 2002).

Teste do antígeno acidificado tamponado (TAAT)

O TAAT é uma prova qualitativa rápida prática e de boa sensibilidade (OMS, 1986). Foi desenvolvido a partir da observação de que a IgG1 bovina é menos ativa em pH 7, mudando de comportamento com a acidificação do meio. O pH $3,65 \pm 0,05$ aumenta o poder de aglutinação da IgG1 e reduz a reatividade da IgM (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Como se trata de um processo físico é provável que nem todas as IgM tenham sua reatividade reduzida.

Allan *et al.* (1976) concluíram que o teste também detecta IgM. Vale lembrar que a não detecção da IgM em fases iniciais da infecção não é tão importante porque, embora a IgM seja o primeiro anticorpo produzido, as IgGs aparecem logo depois (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Nicoletti *et al.* (1969) demonstraram que a TAAT detectou 95% de animais positivos ao cultivo. Hunter *et al.* (1972) ao compararem diferentes provas sorológicas, constataram que o TAAT detectou o maior número de reatores positivos ao cultivo. O TAAT é considerado a melhor alternativa para o diagnóstico massal de rebanhos (OMS, 2002)

e) Teste do Mercaptoetanol (2-ME)

O teste do Mercaptoetanol tem sua especificidade aumentada por inibição da atividade aglutinante da IgM mediante processo químico, que consiste no tratamento do soro com a droga 2-mercaptoetanol (FERRI *et al.*, 1977; TIMONEY *et al.*, 1988). A droga degrada a IgM em cinco sub unidades que conservam suas características de antigenicidade, mas deixam de compor o anticorpo plurivalente (IgM) e não passam a se comportar como anticorpos univalentes. Ainda que as sub-unidades estejam integradas por suas cadeias pesadas e leves, ao combinarem-se com o antígeno não originam complexos suficientemente grandes para provocarem o fenômeno da aglutinação, provavelmente devido a algum impedimento estérico em consequência de sua nova conformação espacial (FERRI *et al.*, 1977). A utilização do 2-ME impede a ocorrência da maioria das reações inespecíficas (CASAS-OLASCOAGA, 1976). Wright & Nielsen (1990) relatam que o tratamento com o mercaptoetanol promove uma maior reatividade da IgG1, ao passo que a reatividade da IgG2 diminuirá. Assim, embora o 2-ME detecte tanto IgG1 como IgG2, o tratamento com o 2-ME provoca aumento na sensibilidade do teste pela promoção da reatividade de IgG1, aumentando a tendência em detectá-la, enquanto que a reatividade da IgG2 será reduzida (NIELSEN & DUNCAN, 1990; WRIGHT & NIELSEN, 1990). Provavelmente o fenômeno ocorra devido ao pH ácido da droga (BADEN, 2002). A mistura de soro em diversas diluições a um mL de antígeno diluído a 2%, com um mL de 2-ME a uma concentração de 0,714% (ALTON, 1975), converte o meio de neutro para ácido. Nicoletti & Muraschi (1966) relataram concordância entre o 2-ME e a RFC em 97%.

f) Soroaglutinação lenta em tubos (SLT) ou prova de Wriht

Foi descrita por Wright & Smith, em 1897. Foi a primeira prova sorológica criada para brucelose. Executada num pH neutro, a SLT demonstra uma boa sensibilidade analítica na detecção dos isotipos bovinos com uma exceção importante: a IgG1 (WRIGHT & NIELSEN, 1990). Por isso, causa muitas reações falso positivas, devendo, portanto, dispor de provas mais específicas para confirmação do resultado (NIELSEN, 1995). Alton (1977) refere que a SLT, em vários experimentos, demonstrou sensibilidade e especificidade baixas em relação a outros testes.

g) Soro Aglutinação Microscópica (SAM)

A SAM é o método de referência preconizado pela Organização Mundial da Saúde (FAINE *et al.*, 1999) e o procedimento laboratorial mais empregado para o diagnóstico de leptospirose (BADKE, 2001; VASCONCELLOS, 2004), revela anticorpos contra antígenos estruturais das leptospiros (leptospiros mortos ou destruídas). Caracteriza-se por ser um teste de baixa sensibilidade, grande especificidade, não identifica portadores e não diferencia infecção de campo e vacinação. Cada soro é estudado nas seguintes diluições: 1:100; 1:200; 1:400,... e o título mínimo aceitável para indicar infecção é 1:100, enquanto os títulos iguais ou superiores a 1:400 são indicativos de infecção evolutiva recente (ANDRÉ-FONTAINE; 1990, BRASIL, 1999).

A SAM realiza diagnóstico de infecção aguda. Recomenda-se duas avaliações pareadas, uma em fase aguda e outra 3-4 semanas após, evitando assim os falsos negativos em função de coleta de amostra precoce, quando ainda não houve soroconversão. A presença de anticorpos no soro das matrizes ou de leitões recém nascidos (privados de colostro), no soro fetal ou no líquido tóraco-abdomin

al dos fetos é suficiente para diagnosticar um aborto por leptospira (ELLIS, 1999). A SAM é um teste considerado sorogrupo específico e a sua interpretação é complexa devido às reações cruzadas que acontecem entre sorogrupos distintos, principalmente na fase aguda da doença (FAINE, 1994; RENTKO, CLARK, ROSS, 1992; MÉRIEN & ARTHARID, 2005).

A interferência no diagnóstico também tem ocorrido com o uso de vacinas polivalentes (OLIVEIRA, 1999). Considera-se importante para a interpretação dos resultados o histórico do uso de vacinas contra a leptospirose suína nas reprodutoras que podem apresentar títulos de anticorpos vacinais. A vacina estimula a formação, principalmente, de IgG, mas por um período inicial também é produzido a IgM, a qual é detectada prioritariamente no teste de SAM. No entanto, os títulos vacinais detectáveis no teste da SAM não ultrapassam a 1:400 e tendem a diminuir até atingir níveis não perceptíveis a SAM em, aproximadamente, dois meses. Isso não impede que o suíno esteja protegido pelo período de até seis meses, através da formação de IgG estimulado pela vacinação (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Diagnosticar as patologias infecciosas causadoras de falhas reprodutivas em matrizes suínas, em infecções naturais, em rebanhos com problemas reprodutivos.

Objetivo Específico

- Investigar a ocorrência de co-infecção entre PCV2 e outras doenças causadoras de falhas reprodutivas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do Experimento

O projeto de pesquisa foi desenvolvido na Embrapa Suínos e Aves, localizada no município de Concórdia/SC, no Complexo de Sanidade e Genética Animal, Laboratório de Virologia e também no Centro de Diagnóstico em Saúde Animal (CEDISA), localizado nas instalações da Embrapa Suínos e Aves, além do Hospital Veterinário da Universidade de Passo Fundo (UPF), localizado no município de Passo Fundo/RS.

4.2 Metodologia de coleta

Na figura 1 é apresentada a seqüência dos procedimentos utilizados para realização dos diagnósticos propostos no projeto.

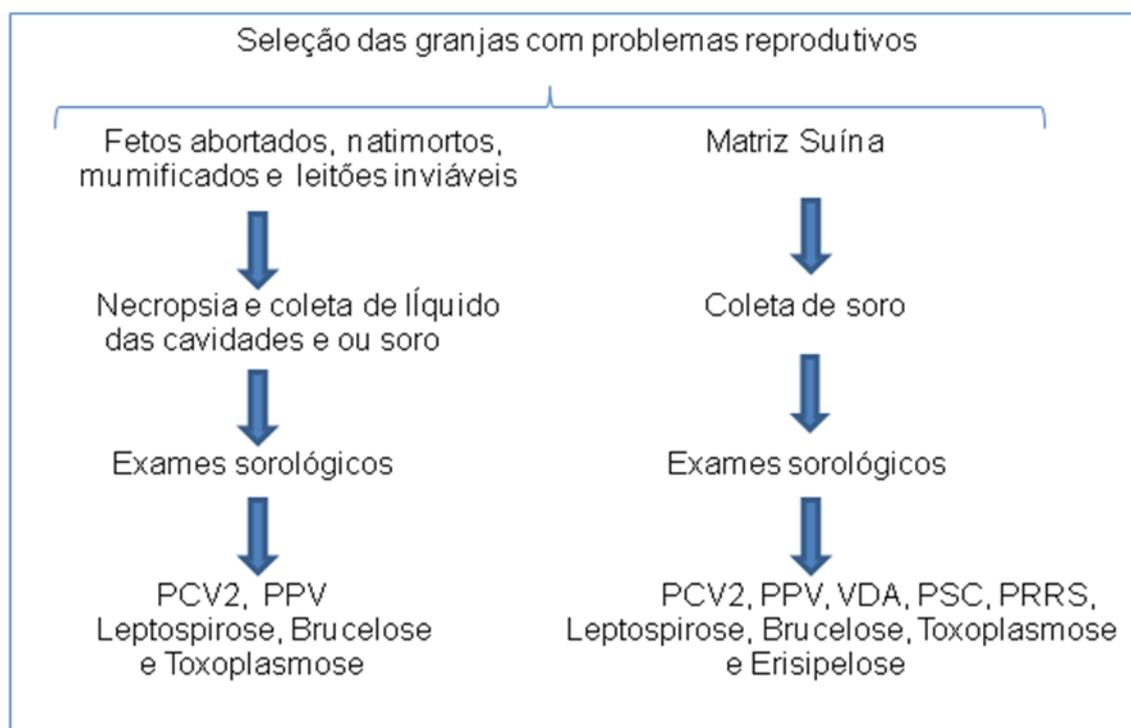


Figura 1- Procedimento para colheita de material e desenvolvimento do estudo.

No início do trabalho, os produtores de suínos ou agroindústrias integradoras foram contatados e convidados a participar do projeto de pesquisa que visava diagnosticar agentes causadores de falhas reprodutivas em fêmeas suínas. Em seguida foi aplicado um questionário com o objetivo de identificar os índices reprodutivos na granja naquele período conforme o anexo 1. As granjas selecionadas apresentavam pelo menos um item com alterações detectadas pelos parâmetros estabelecidos. Foram amostradas 27 granjas produtoras de suínos, sendo 22 granjas no Estado de Santa Catarina (SC) e 5 granjas no Paraná(PR), no período entre setembro de 2008 a julho de 2009. Todas as granjas estudadas usavam vacinas tríplice (Parvovirose, Leptospirose e Erisipela) aos 120 e 180 dias de idade e reforço 8-12 dias pós parto, sendo essas produzidas por 2 fabricantes diferentes.

As amostras provenientes de casos clínicos, como fetos abortados, natimortos, leitões mumificados ou inviáveis eram coletadas pela equipe do projeto ou por técnicos das agroindústrias e enviadas ao laboratório, sob refrigeração, para realização das necrópsias. Uma exceção foi a remessa de leitões inviáveis que eram enviados vivos, para serem sacrificados no momento da necrópsia para coleta de líquido das cavidades e/ou soro. Em fetos mumificados, em estado adiantado de desidratação, era efetuada lavagem da cavidade abdominal com solução de PBS com pH 7,2 e o líquido resultante era coletado e posteriormente centrifugado para utilização nos testes de diagnósticos.

No total, foram coletadas amostras de sangue de 120 porcas com problemas reprodutivos e de suas respectivas leitegadas, amostras de líquidos das cavidades de dois leitões (fetos mumificados, natimortos ou leitões inviáveis), oriundos de partos prematuros ou a termo, totalizando 321 amostras.

A colheita do sangue das matrizes foi realizada no máximo em 15 dias após o problema reprodutivo. O sangue foi coletado da veia cava, segundo metodologia descrita por Moreno *et al.* (1997). Após a colheita, o soro era transferido para tubos plásticos identificados. As amostras foram transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Virologia da Embrapa Suínos e Aves, onde foram processadas e armazenadas em tubos de microcentrífuga do tipo Eppendorf e acondicionadas a -20°C até o momento dos exames.

Foram utilizados testes já padronizados e empregados rotineiramente nos laboratórios. Alguns deles fazem parte de monitoria ativa para doenças de suínos, sendo recomendados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

4.3 Aplicação da Técnica de Inibição da Hemaglutinação (HI) para a detecção de anticorpos para parvovirose.

Foi utilizado o teste de inibição da hemaglutinação (HI) para detecção de parvovírus suíno (teste padronizado na Embrapa Suínos e Aves e CEDISA).

a) Preparação da amostra

As amostras de soro foram inativadas em banho-maria a 56°C, durante 30 minutos, após foi adicionado caolin 25% e hemácias de cobaio a 50% por amostra; a mistura do frasco foi homogeneizado por inversão, 10 vezes a cada 10 minutos durante 4 horas; a amostra decantou durante 12 horas sob refrigeração (2 a 8 °C). Após foi recuperado o sobrenadante e adicionado a este, hemácias de cobaio a 50% por amostra e novamente homogeneizado e decantado como descrito anteriormente. Em seguida foi recuperado o sobrenadante diluído 1:4, em frasco limpo, para posterior utilização na execução do teste (dentro 24 horas) ou congeladas para realização do teste posteriormente.

b) Anticorpos

Em uma placa de 96 poços foram feitas diluições duplas (1:2) a partir da amostra de soro preparada 1:4, até a diluição desejada. Em outra micro-placa foi colocado o soro controle positivo conhecido, contendo anticorpos contra o vírus da parvovirose suína (PVS) e outro soro controle negativo sem anticorpos para o PVS. O antígeno PVS cepa vacinal, origem CEDISA 1991, diluído contendo as 4 UHA foi dispensado em todos os poços da micro-placa, exceto nos poços com o controle de hemácias e das 4 UHA (Fig. 2 A). A placa foi incubada durante 1 hora em temperatura ambiente (18 a 25°C) para permitir a reação entre o antígeno e o anticorpo. Após esse período foi adicionada solução de hemácias de cobaio 0,6% em PBS / HI / PVS com BSA 0,4% em todos os 96 poços da placa e novamente incubado por 1 hora para, posteriormente, realizar a leitura.

c) Leitura e Interpretação

A reação está completa ou positiva quando a amostra escorre igual ao controle de hemácias da placa (Fig. 2 B,C,D). Considerou-se o seguinte resultado:

Títulos:

≤ 32 Negativo

Ausência de AC passivos ou de AC de infecção ativa ou vacinal na amostra testada;

$= 64$ Suspeito

Resultado inconclusivo. A amostra pode ter AC passivos ou AC de infecção ativa ou vacinal, ou não ter AC;

≥ 128 Positivo

Presença de AC passivos ou de AC de Infecção ativa ou de AC vacinais na amostra de soro testada.

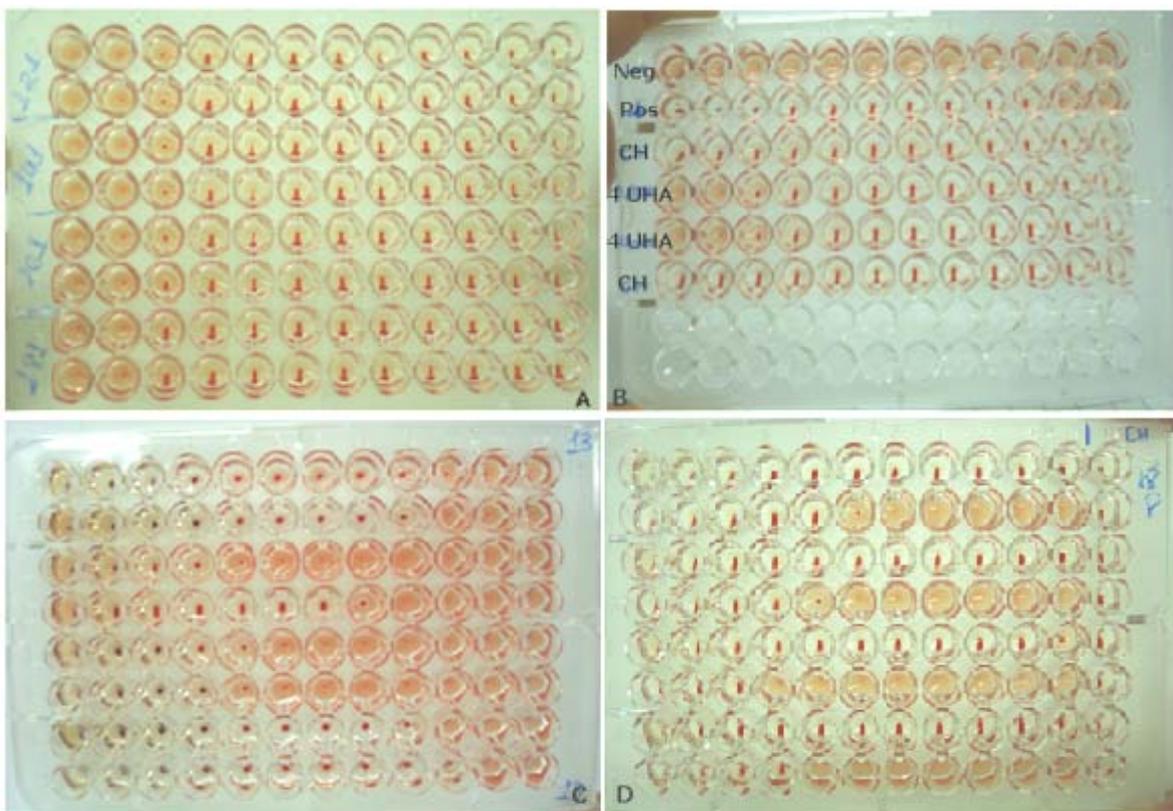


Figura 2. Teste HI para Parvovirose. A- Diferentes títulos 4UHAs, B- Placa controle, C- Placa teste , D- Placa teste com controle de hemácias

4.4 Aplicação da Técnica de ELISA para Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína

O teste de PRRSV foi realizado apenas nas matrizes, como medida de vigilância ativa, pois apesar do agente não haver sido diagnosticado em rebanhos brasileiros até o momento, é importante a realização de diagnóstico laboratorial que comprove a não ocorrência do vírus ou anticorpos para PRRSV.

Foi utilizado o teste de Elisa PRRSV utilizando IDEXX *HerdChek® Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test Kit*.

a) Preparação da amostra

Os ensaios foram realizados conforme orientação do fabricante. Para tanto as amostras foram diluídas previamente na proporção 1:40 (10 µl amostra em 390 µl de diluente da amostra). Em uma placa impregnada de antígeno de cultivo celular PRRSV (colunas ímpares) e impregnada com cultivo celular (colunas pares), foram distribuídos os controles negativos não diluídos (C1 e D1 e C2 e D2), controles positivos não diluídos (A1 e B1 e A2 e B2) e nos demais poços as amostras teste nos dois poços correspondentes (PRRSV e NHCl). A placa foi incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) e lavada 3 vezes com solução de lavagem fosfatada tamponada. Em seguida foi adicionado o conjugado peroxidase de raiz forte (HRPO) e tornado a incubar por 30 minutos. Foi repetida a tríplice lavagem, adicionando o substrato TMB e incubado por 15 minutos e então adicionada a solução de interrupção, para parar a reação.

b) Leitura e interpretação

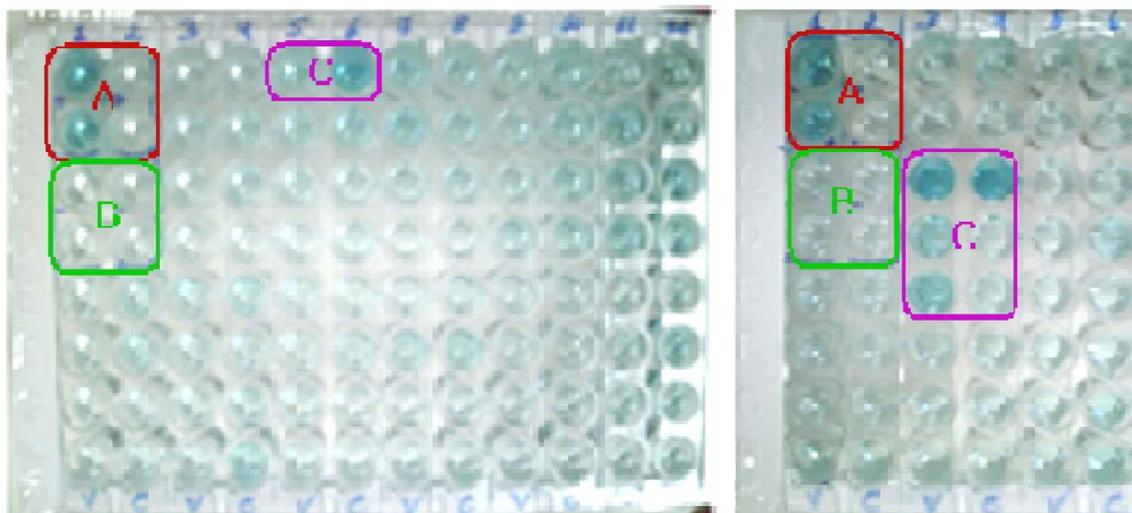
A leitura foi realizada no espectrofotômetro onde foram medidos os valores de A(650) para amostras e controles.

Para que o teste seja válido, a média do controle positivo nos poços virais PRRSV deve ser igual ou maior que 0,150. A média do controle negativo PRRSV deve ser menor ou igual a 0,150 e nas colunas impregnadas com cultivo celular, a média do controle positivo deve ser menor ou igual a 0,120 e o controle negativo menor ou igual a 0,250.

A presença ou ausência de anticorpos contra PRRSV é determinada calculando o coeficiente de amostra sobre controle positivo S/P para cada amostra.

Positiva: S/P maior ou igual a 0,4. Visualmente corado de azul (Fig. 3 A e C)

Negativa: S/P menor que 0,4. Aparentemente com ausência de cor (Fig. 3 B)



Resultados das Amostras Teste Elisa para PRRS A- Controles Positivos, B- Controles Negativos, C- Amostras Positivas.

4.5 Aplicação da Técnica de ELISA para Doença de Aujeszky

Foi realizado teste de Elisa *screening* apenas do soro das matrizes, utilizando kit da IDEXX *HerdChek* para prova de detecção de anticorpos anti-gpl do vírus da pseudorraiva. O ensaio foi realizado seguindo as indicações do fabricante, estas, seguem abaixo.

a) Reação antígeno-anticorpo

Em uma placa de plástico de Elisa revestida de antígeno (VDA) foram distribuídos os controles negativos, positivos e as amostras a serem testadas; a seguir a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e posteriormente submetida a 3-5 lavagens com solução de lavagem incluída no kit.

Foi adicionado conjugado HRPO Anti-PRV-gpl em todos os orifícios e incubada a placa durante 20 minutos. Repetida a lavagem, em seguida foi acrescido o substrato e a placa incubada por 15 minutos, finalmente foi adicionada a solução de interrupção da reação em cada orifício.

b) Leitura e interpretação

Procedeu-se à leitura no espectrofotômetro com densidade óptica A (650) das amostras e controles e após foram feitos os cálculos.

Para que o teste seja válido, a média do controle negativo menos a média do controle positivo deve ser maior ou igual a 0,3.

Resultados:

Positivo - S\P menor ou igual a 0,6. Visualmente incolor (Fig.4 B)

Suspeito - S\P menor ou igual a 0,7, mas maior que 0,6

Negativo - S\P maior que 0,7 a amostra é considerada negativa para anticorpos contra o antígeno gpl do VDA. Visualmente corada de amarelo como na Fig.4 A e demais poços.

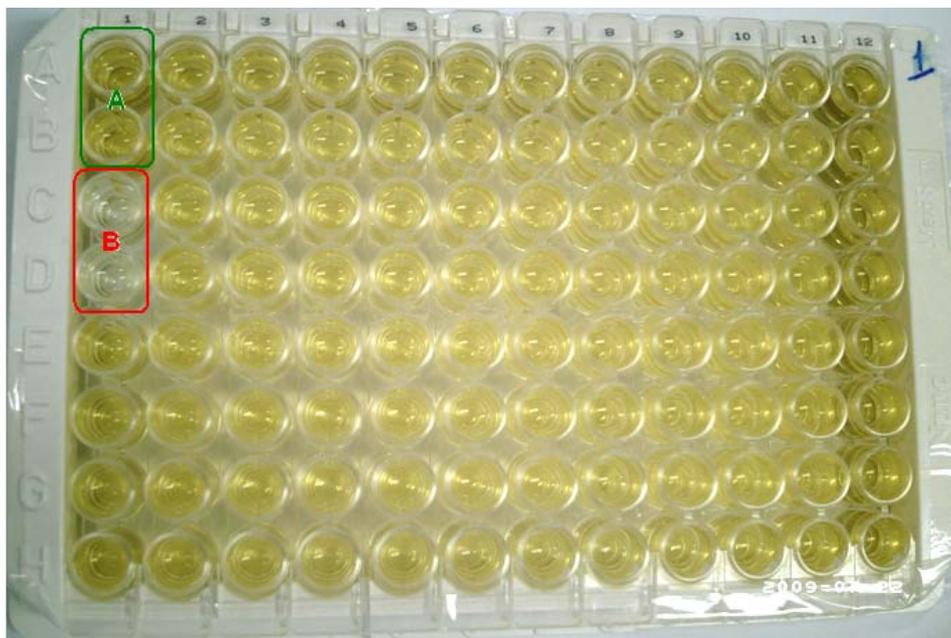


Figura 4. Resultados das Amostras do Teste de Elisa para Doença de Aujeszky A- Controles Negativos e B- Controles Positivos

4.6 Aplicação da Técnica de ELISA para Peste Suína Clássica

Foi realizado teste Elisa VPSC apenas nas matrizes, utilizando kit da IDEXX *HerdChek* para prova de detecção de anticorpos contra o Vírus da Peste Suína Clássica. O ensaio foi realizado seguindo as indicações do fabricante.

a) Reação antígeno-anticorpo

Na placa de 96 poços foi, inicialmente, colocado o diluente em todos os orifícios, depois foram adicionados os controles negativos, positivos e soros a serem testados. A placa foi levemente agitada para misturar o conteúdo, incubada por 2 horas a temperatura ambiente, em câmara úmida e depois de lavada 3 vezes com solução de lavagem, foi adicionado conjugado anti-VPSC HRPO em cada orifício e incubado por mais 30 minutos. Procedida novamente a tríplice lavagem, foi adicionado o substrato e incubado por 10 minutos e, em seguida, a reação foi parada com a solução *stop*.

b) Leitura e interpretação

Os anticorpos presentes na amostra a ser testada irão bloquear a ligação dos anticorpos monoclonais (AcMo) marcados com peroxidase ao antígeno do vírus da peste suína clássica.

A reação é negativa quando o soro testado não possui anticorpos específicos, os AcMo marcados com peroxidase se ligam ao antígeno do VPSC, reagindo com o substrato, que produz cor. No caso de desenvolvimento de cor fraca, anticorpos específicos contra VPSC estão presentes na amostra em teste. Se há desenvolvimento de cor forte na amostra testada, há ausência de anticorpos.

Foi medida a absorvância das amostras e controles a 450nm, usando um duplo comprimento de onda de 450nm e 560nm numa leitora de placas. Após, foi calculada a média dos valores de absorvância para amostras e controles. A percentagem de bloqueio da amostra foi calculada por meio da densidade ótica (DO_{450}), obtida com a amostra em teste e a DO_{450} do controle negativo.

Para o teste ser válido a média do controle negativo DO_{450} deve ser maior ou igual a 0,50 e a percentagem do controle positivo deve ser maior ou igual a 50%.

Resultados:

Positivos - (Anticorpos presentes) porcentagem de bloqueio maior ou igual a 40%. Cora-se fracamente como visto na figura 5 (B).

Suspeito - Se apresentar porcentagem de bloqueio entre 30-40%. Repetir o teste e/ou confirmar com soro neutralização.

Negativos - (Anticorpos ausentes) porcentagem de bloqueio menor ou igual a 30%. Corado em azul forte (Fig. 5 A e demais poços)

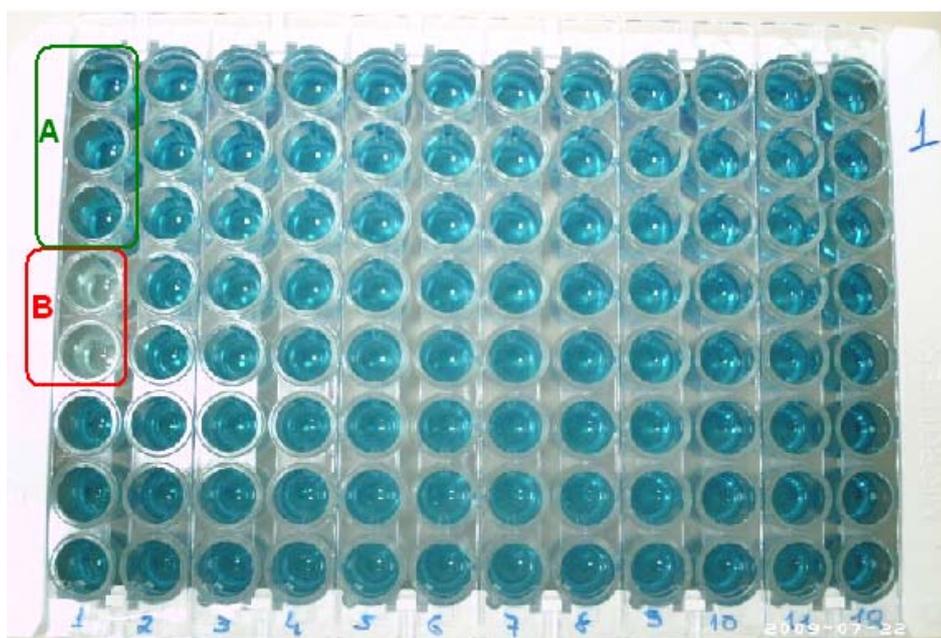


Figura 5. Resultados das Amostras no Teste de Elisa para Peste Suína Clássica. A- Controles Negativos, B- Controles Positivos

4.7 Aplicação da Técnica de *Indirect Immunoperoxidase Monolayer Assay* (IPMA) para detecção de Circovirose Suína

A técnica de IPMA para detecção de anticorpos contra o PCV2 seguiu a metodologia descrita por Balasch *et al.* (1999) e Rodríguez-Arrijoja *et al.* (2000), com as modificações propostas por Gava (2006) e Barbosa (2008). Foram testadas todas as amostras de soro (matrizes e fetos) e também líquidos fetais, conforme descrito anteriormente. Para realização da técnica foram seguidos os passos descritos a seguir.

a) Cultivo celular

Células da linhagem VERO (rim de macaco africano - *Cercopithecus aethiops*), negativa para PCV1 e PCV2 pela técnica de *nested-PCR*, foram inicialmente cultivadas em garrafas com área de crescimento de 25 cm, utilizando o meio de crescimento F10-199, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), antibiótico (gentamicina e neomicina) e antifúngico (fungizon). As garrafas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. À medida que as células formaram um tapete no fundo da garrafa foram transferidas para duas garrafas para aumentar a quantidade de células.

b) Inoculação Viral

Metade das garrafas permaneceram sem a inoculação do vírus e a outra metade foi inoculada com PCV2 isolado de *pool* de órgãos (linfonodos, pulmão e tonsila) de suíno (Antígeno Embrapa PCV2- F3554 e PCV2-F3552), positivo para PCV2 pela técnica de *nested-PCR*.

c) Inoculação e fixação da monocamada de células

Após três passagens virais (a cada 48 horas, cada uma), o meio das garrafas previamente infectadas foi retirado, as células foram tripsinizadas com solução tripsina 2,5% em PBS e distribuídas em placas de cultivo de 96 poços na quantidade de 3,5 x 10 ml/placa. Nas colunas de 1-11 foram colocadas células inoculadas com PCV2 e na coluna 12 células controle, livres de PCV2, previamente testadas por *nested-PCR*. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, durante 24 horas. Após, o meio foi removido, as células foram lavadas com TBS 0,05% Tween 20, pH 7,6 e fixadas com metanol 100%. Após a secagem, as placas foram armazenadas em sacos plásticos à temperatura -20°C até o momento da realização dos testes.

d) Bloqueio da monocamada de células

As placas foram estabilizadas a 37°C, logo após, bloqueadas com peróxido de hidrogênio 3% em água destilada por 10 minutos para minimizar as reações inespecíficas e lavadas três vezes com TBS 0,05% Tween 20. Foi acrescentado soro de coelho a 10% e incubado por 1 hora, a 37°C, seguido por tripla lavagem.

e) Anticorpos primário e secundário

Utilizou-se como controle positivo anti PCV2, soro suíno com título conhecido 1:5000, soro controle negativo sem anticorpos para PCV2, proveniente de suíno SPF livre de PCV1 e PCV2, proveniente do rebanho SPF da Embrapa Suínos e Aves, além das células não inoculadas com PCV2 e os soros teste nas diferentes diluições, sendo incubados durante a noite, a 4°C, em câmara úmida, seguido novamente por tripla lavagem. A seguir foi adicionado conjugado anti IgG de suíno ligado a peroxidase (Sigma, A-5670) diluído em TBS 1:400. As placas foram incubadas a 37°C, em câmara úmida, durante 1 hora e lavadas com TBS Triton.

f) Revelação

As placas foram coradas com solução previamente preparada de AEC, dissolvendo-se 20 mg de 3-amino-9-dietilcarbazol (AEC) (Sigma, A-5670) em 2,5ml de N,N-dimetilformamida. A solução foi alíquotada e estocada a 4°C. Imediatamente antes do uso, acrescentou-se 500µl da solução estoque de AEC em 9,5ml de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 4,0 e 100µl de peróxido de hidrogênio 3% em água destilada. Esta solução foi então colocada em cada poço da placa, incubando-se por 5 minutos em temperatura ambiente. Após as placas foram lavadas três vezes com água destilada.

g) Leitura e Interpretação

A leitura das placas foi realizada em microscópio óptico de luz invertida com aumento de 100x. As células positivas revelaram pigmento de cor vermelha no citoplasma

e núcleo claro (Fig. 6 B) e as negativas não apresentaram coloração (Fig. 6 A). Para interpretação do teste, os resultados sorológicos foram classificados em negativos (não reativo) ou reativos. Os reativos foram agrupados de acordo com o título: com títulos baixos (+) variando entre 1:20 a 1:160; reagente com títulos médios (++) variando entre 1:320 a 1:2560 e reagente com títulos altos (+++) com títulos maiores ou igual a 5120.

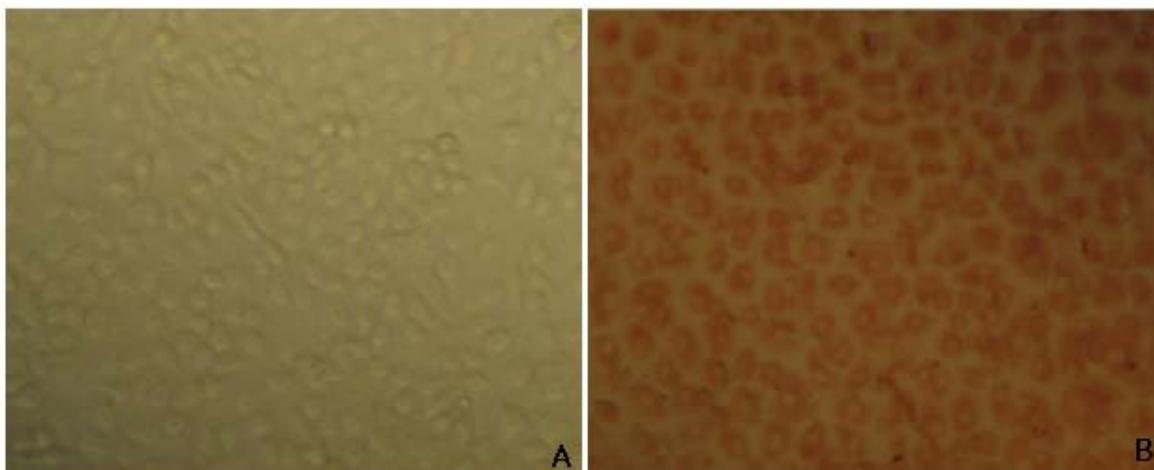


Figura 6. Monocamada de células VERO. A: células negativas, B: Células positivas

4.8 Aplicação das Técnicas de Antígeno Acidificado Tamponado (AAT ou TAAT), Soroaglutinação Lenta em Tubo (PLT) e 2B-Mercaptoetanol (2 ME) para diagnóstico de Brucelose Suína

As reações de aglutinação baseiam-se na propriedade dos anticorpos presentes no soro ou plasma sanguíneo formarem reações cruzadas entre antígenos, resultando na formação de complexos insolúveis.

Foram utilizados os testes: Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), prova rápida usando o antígeno Rosa de Bengala para anticorpos contra *Brucella abortus*, utilizando técnica padronizada no CEDISA. Para teste confirmatório foi utilizada a prova de Soroaglutinação lenta com 2B-mercaptoetanol (2 ME) e a Prova Lenta em Tubo (PLT). Quando estas últimas provas tiveram resultado positivo, as amostras foram enviadas ao Laboratório Lanagro, em Pernambuco, para realização do teste de fixação de complemento (FC) e confirmação do resultado.

a) **Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)**

O AAT, soros controles do teste, conhecidamente positivos e negativos e as amostras foram colocadas em placa de vidro. Após, os soros e o antígeno foram homogeneizados com bastão de cobre, em forma de tridente e a placa foi então colocada no homogeneizador de placas a 30 movimentos por minuto, durante 4 minutos, virando a placa na metade do tempo.

Leitura e Interpretação do teste:

A leitura foi realizada em caixa de leitura de fundo escuro, com o auxílio de uma fonte de luz indireta. O soro foi considerado negativo quando não havia grumos de aglutinação (Fig. 7 A) e positivo quando havia presença de grumos (Fig. 7 B), em qualquer intensidade.

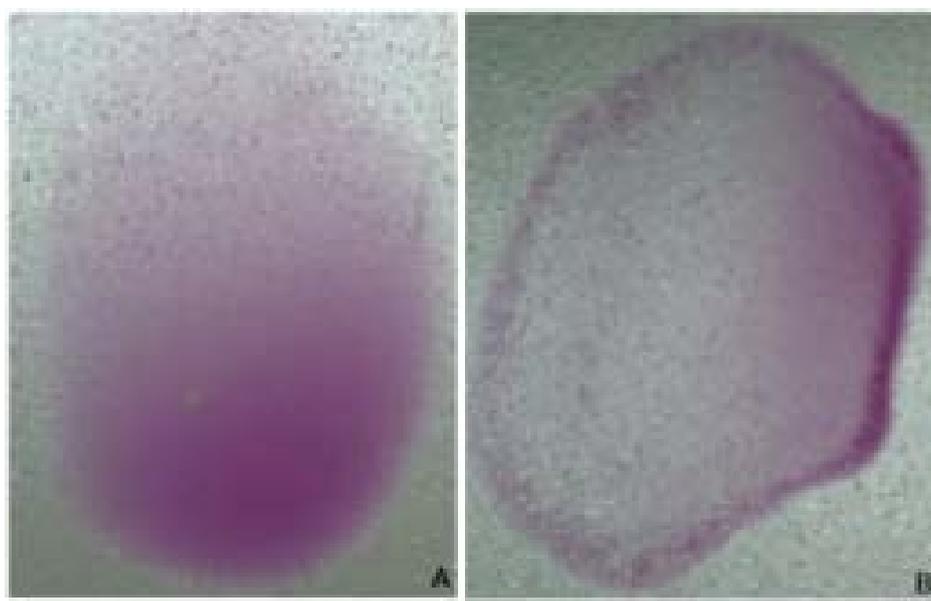


Figura 7. Resultados do Teste AAT para Brucelose Suína. A- Amostras Negativas e B- Amostras Positivas

b) Soroaglutinação Lenta com 2ME (2 ME) e Prova Lenta em Tubo (PLT)

Cada amostra de soro foi distribuída em oito tubos de vidro, diluídas a 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200, sendo um tubo de cada diluição para teste 2ME(M) e um para PLT(T). Também foram incorporados ao teste, os controles negativo e positivo, nas mesmas diluições das amostras teste.

Na fileira T foi adicionada, a cada tubo, solução salina fenolada 0,5% e na fileira M, também, solução de 2-ME a 0,1M. Após, os tubos foram agitados para homogeneizar as amostras e incubados por 30 minutos, a 21°C. Logo após foi adicionada solução de antígeno a 50%, em cada tubo e novamente agitado. Em seguida os tubos foram incubados a 37°C, durante 48 horas (+-3hs) e após procedeu-se à leitura.

Interpretação da leitura:

A leitura dos tubos foi feita contra um fundo escuro, com auxílio de uma fonte de luz. Iniciada sempre pelos controles e pelas menores diluições. Primeiramente sem agitar os tubos observou-se se o aspecto era turvo ou límpido e se havia formação de depósito no fundo do tubo e então, agitava-se o tubo suavemente e se observava a firmeza dos grumos, caso houvesse depósito no fundo do tubo, caso não houvesse aglutinação do antígeno não haveria presença de grumos. Quando há presença de aglutinação do antígeno, os grumos se desprendem. A interpretação baseia-se no aspecto do sobrenadante (turvo ou límpido) e na presença ou ausência de aglutinação (grumos) e sua característica após a agitação suave dos tubos. As reações podem ser interpretadas como completas (+), incompletas (I) ou negativas (-), de acordo com os critérios abaixo:

Reação Completa - o líquido da mistura soro-antígeno aparece límpido e há aglutinação total no fundo do tubo. Agitando-se levemente os tubos, os grumos são ressuspendidos.

Reação Incompleta - há aglutinação parcial no fundo do tubo, o líquido aparece parcialmente límpido e a agitação suave revela grumos.

Reação Negativa - o líquido apresenta-se turvo, com ou sem depósito. Agitando-se levemente os tubos, os depósitos se dissolvem (não revela grumos).

Interpretação dos resultados:

A interpretação dos dados foi feita pela diferença entre os títulos dos soros sem tratamento na PLT (IgG e IgM) frente ao soro tratado com 2-ME (somente IgG). Abaixo é apresentada a interpretação dos resultados para animais não vacinados.

Interpretação	PLT	2-ME
Negativo	≤ 25	< 25
Inconclusivo	≥ 50	< 25
Positivo	≥ 25	≥ 25

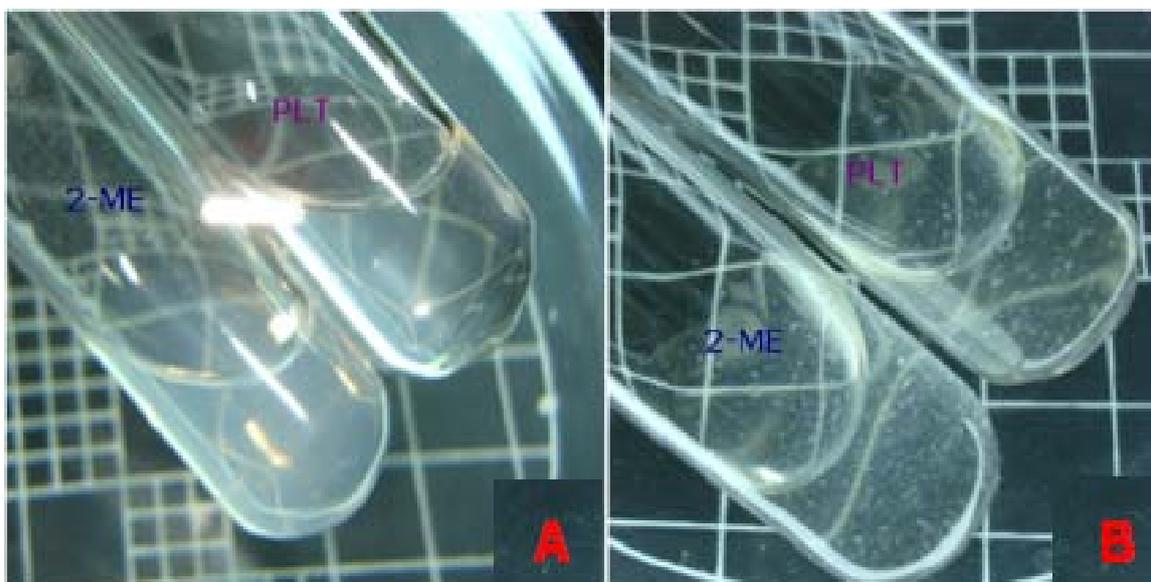


Figura 8. Resultados do Teste 2-ME e PLT para Brucelose Suína. A- Controles Negativos e B- Controles Positivos

Obteve-se uma amostra com resultado positivo no AAT, no 2-ME e PLT foi inconclusiva, esta, foi encaminhada para o Lanagro, no Estado de Pernambuco, para ser realizado o teste de fixação de complemento (FC') e o resultado deste teste foi negativo.

4.9 Aplicação da Técnica de Microsoroaglutinação em placa (SAM) para Leptospirose

Foi realizado o teste de SAM, recomendado pelo MAPA e padronizado no CEDISA. Foram testadas todas as fêmeas e seus respectivos fetos através do teste de Microsoroaglutinação em placa com sorovares vivos para anticorpos contra leptospiras. Os sorovares utilizados foram: *Leptospira autumnalis*; *L. hardjo*; *L. canicola*; *L. grippityphosa*; *L. bratislava*; *L. icterohaemorrhagiae*; *L. pomona*; *L. ballum*; *L. wolffi*; *L. tarassovi*; *L. australis*; *L. bataviae*; *L. cynopteri*; *L. djasiman*; *L. pyrogenes* e *L. patoc*.

As leptospiras foram armazenadas em meio semi sólido EMJH (*East McDowell Junior Hight*) e transferidas para um meio líquido através de passagens, a cada 4 dias, até que todo o meio semi-sólido foi eliminado. A partir de então, utilizou-se o antígeno para o teste.

a) Triagem:

As amostras de soro e os controles (negativo e positivo) foram colocados em tubos de vidro, diluídos usando 50µl de soro em 2,4ml de PBS-Lepto, pH 7,2. Após, a solução foi distribuída em placas de plástico com fundo chato, com 96 poços e em seguida foram adicionados os sorovares. Nesta etapa, a diluição foi de 1:100. As placas foram agitadas e incubadas em estufa a 28°C, durante 2-4 horas e a leitura foi iniciada na 2ª hora de incubação. porque o tempo de leitura não pode exceder 4 horas, pois as leptospiras começam a se auto-aglutinar.

A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro, na própria micro-placa e, também, com uma gota em lâmina, com auxílio de alça bacteriológica.

Considerou-se positivas as amostras que apresentaram um grau de aglutinação de 50% ou superior a este, comparando com o respectivo controle. E, negativas, aquelas que não aglutinaram ou lisaram nenhuma leptospira ou, então, o fizeram no máximo com 75% de leptospiras vivas.

O soro, que apresentou na prova de triagem, uma redução de 50-100% do número de leptospiras livres, em relação ao controle, foi submetido a titulação sorológica com o sorovar que apresentou aglutinação.

b) Titulação:

Em tubos de vidro foram colocados 2,4ml de PBS-lepto e 100µl da amostra e agitados. Na micro-placa do teste foi colocado PBS-Lepto em todos os poços usados, exceto na primeira coluna (amostras diluídas 1:100). A amostra foi colocada na primeira coluna (1:100) e diluída até a coluna H (1:12800). Depois de adicionada a suspensão antigênica, correspondente à cepa aglutinada na triagem, em todos os poços, a placa foi incubada a 28°C. durante 2-4 horas. A leitura foi realizada em microscópio de campo escuro, somente na gota em lâmina, comparando com os controles.

Foi considerado título positivo o que apresentou um grau de aglutinação de 50% ou superior, considerando como referência o seu respectivo controle.

Interpretação dos resultados:

Títulos sorológicos	Resultados	Interpretação
1:0 – 1:50	Negativo	Caso negativo
1:100 - 1:200	Baixos	Suspeitos - enviar 2º amostra em 15 dias
1:400	Moderados	Início infecção. Anticorpos pós-infecção, resposta vacinal
>= 1:800	Moderados a altos	Infecção provável (repetir amostra em animais vacinados)
> 1:800	Altos	Infecção ativa, medicar e vacinar em massa o plantel

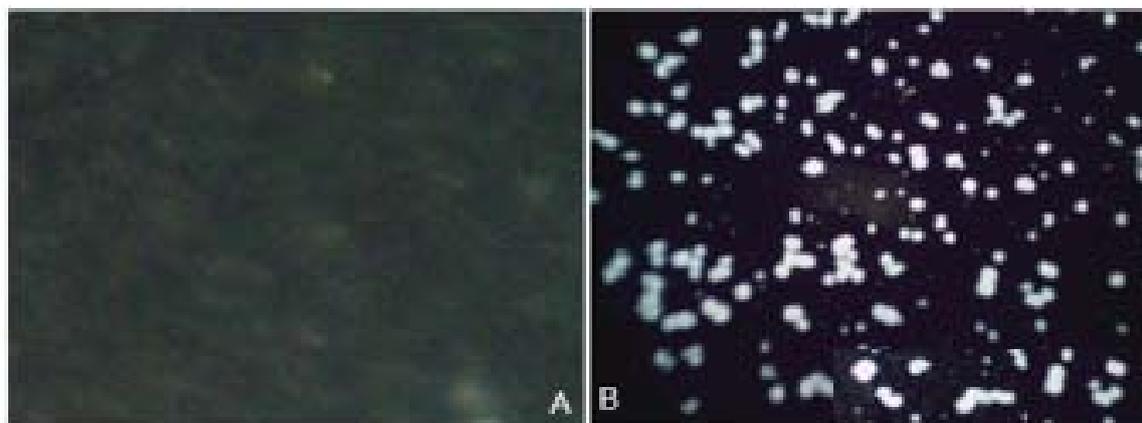


Figura 9. Resultados do Teste SAM para Leptospirose Suína. A- Controles Negativos e B- Controles Positivos

4.10 Aplicação da Técnica de ELISA para diagnóstico de Erisipela Suína

Utilizo-se kit comercial SE - Hipra[®]. O antígeno específico de *Erisipelothrix rhusiopathiae* veio impregnado em uma microplaca (Kit) com 96 poços. Durante a incubação inicial, com a amostra diluída, os anticorpos específicos de *E. rhusiopathiae* ligam-se ao antígeno adsorvido na cavidade, onde permanecem durante as lavagens. Posteriormente, adicionou-se a solução do conjugado que se liga aos anticorpos suínos retidos na cavidade. Em seguida, o excesso de conjugado foi lavado e o substrato cromógeno adicionado. A coloração aparente em cada cavidade é proporcional à quantidade de anticorpos específicos de *E. rhusiopathiae* presentes em cada amostra.

Leitura e interpretação do teste:

A leitura da placa é realizada em uma leitora de placas de ELISA utilizando filtro de DO₄₀₅.

Validação do teste

O teste é validado se a DO₄₀₅ média do controle positivo é > 0,9 e a DO₄₀₅ média do controle positivo é maior ou igual a cinco vezes a DO₄₀₅ média do controle.

Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados é obtida através de IRPC (índice relativo x 100). A seguinte fórmula é aplicada para obter o valor de IRPC (utilizando os valores médios de DO₄₀₅ obtidos pelo controles):

$$\text{IRPC} = \frac{(\text{DO}_{405} \text{ Amostra} - \text{Média DO}_{405} \text{ Controle Negativo})}{(\text{Média DO}_{405} \text{ Controle Positivo} - \text{Média DO}_{405} \text{ Controle Negativo})} \times 100$$

As amostras são consideradas positivas quando o IRPC for maior que 40,0 e negativa quando o IRPC for igual ou menor que 40,0.

4.11 Aplicação da Técnica de Hemaglutinação Indireta (HAI) para Toxoplasmose

Foi utilizado, para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no soro suíno por Hemaglutinação Indireta, o kit comercial Imuno-Hai do Laboratório Wama Diagnóstica. A técnica de HAI foi realizada segundo instruções do Kit, sendo os critérios de positividade adotados conforme Silva *et al.* (1981) e Chaplin *et al.* (1984).

a) Teste qualitativo (Screening):

Os soros e líquidos fetais foram mantidos a 56°C, durante 30 minutos, para o complemento ser inativado e reduzir as reações falso-positivas, essas ocasionadas pela ocorrência de lise por ativação do complemento em sua membrana.

As amostras foram diluídas em tubos de ensaio, com uma solução previamente adicionada com 2-ME, para diminuir as reações inespecíficas. Nesta etapa o soro encontrava-se diluído 1:32. A placa teste de micro-titulação, com 96 poços e fundo em V, foi colocada sobre pano úmido, para neutralizar as forças eletrostáticas e então foi adicionado o controle negativo e o controle positivo. Em seguida, as amostras de soro/líquido fetal foram transferidas dos tubos de ensaio para a placa teste. Posteriormente foi adicionada uma solução de hemácias de aves, estabilizada e sensibilizada, com componentes antigênicos do *T. gondii* altamente purificados. Em seguida a placa foi agitada levemente, para que todos os componentes se homogeneizassem. Após, a placa foi incubada em estufa, a 23°C (+-2), durante 2 horas e findo esse período procedeu-se à leitura.

Todos os soros que apresentaram reação positiva foram re-testados quantitativamente.

Interpretação dos resultados:

Nos soros positivos, os anticorpos contra *T.gondii* irão se ligar ao antígeno presente na superfície das hemácias, aglutinando-as indiretamente. Desta forma será formada uma rede que manterá as hemácias em suspensão, o que será visualizado como um véu avermelhado homogêneo, sem sedimento no fundo da cavidade (Fig. 10 B). No caso de

soro negativo, como não há formação dessa rede, em função da ausência de anticorpos específicos, as hemácias sedimentarão, formando um botão no fundo do orifício (Fig.10 A).

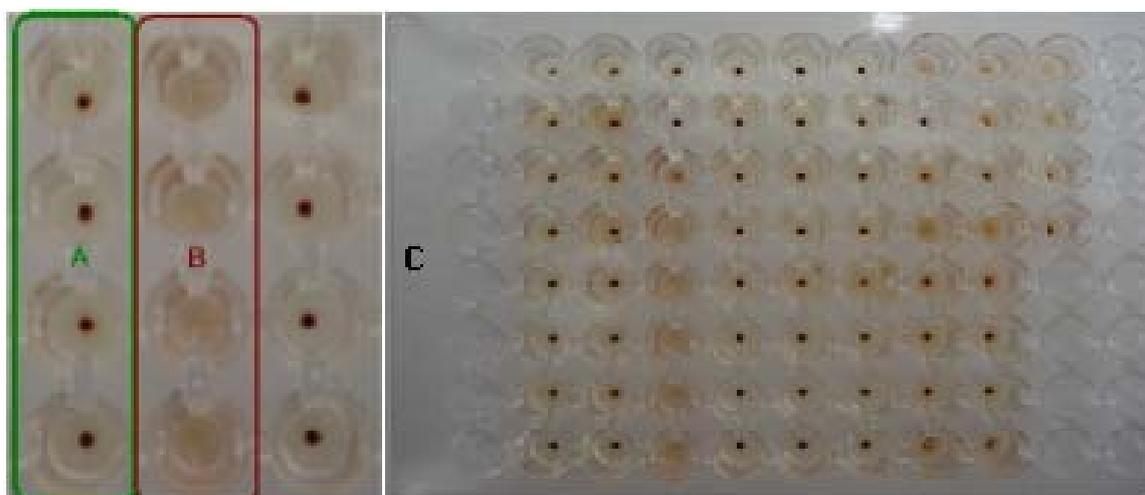


Figura 10. Resultados do Teste HAI para Toxoplasmose Suína.
A- Controles Negativos e B- Controles Positivos C- Placa teste.

b) Teste semi quantitativo:

Foi posto o diluente na placa de 96 poços a partir da linha B, em seguida adicionada a amostra diluída em 1:32, nos poços A1 e B1. Após homogeneizada, foram diluídas as amostras até a diluição desejada, no caso até H2. Em seguida foi adicionada a solução de eritrócitos, em todos os poços, agitando mecanicamente durante 3-4 minutos. Logo após as amostras terem sido incubadas por 2 horas, em estufa, à temperatura ambiente (21-23°C), procedeu-se à leitura.

Interpretação da leitura:

Negativa: Quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade formando um botão.

Positiva: Quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade formando um tapete, às vezes com bordas irregulares.

4.12 Análise dos Dados

Foi realizada Análise descritiva dos dados para a determinação da prevalência e aplicação do teste Qui-quadrado para correlacionar diferentes resultados, executado através do programa SAS (2003).

5. RESULTADOS

Foram analisadas 120 amostras de soro de matrizes suínas e 201 amostras de líquido fetal e/ou soro de fetos abortados, natimortos, mumificados ou inviáveis, provenientes de 27 granjas. Vale lembrar que entre os fetos amostrados há animais de diferentes tamanhos e fases de gestação, sugerindo uma relação entre a fase de desenvolvimento dos fetos com a produção e detecção de anticorpos, devido a imunocompetência adquirida a partir de determinada fase da gestação.

A principal falha reprodutiva observada nas porcas foi a natimortalidade, com 60 casos (49,5%). Outras falhas observadas foram: a mumificação fetal, com 50 casos (41,32%); o retorno ao cio, com 6 casos (4,96%) e os abortos, com 5 casos (4,13%).

Uma análise descritiva dos dados foi realizada e observa-se na tabela 1, que a maioria das fêmeas 113 (94,17%) resultaram positivas na sorologia por HI para PVS, 5 (4,17%) foram classificadas como suspeitas e 2 (1,67%) tiveram resultados negativos. Dos fetos, 176 (87,56%) foram negativos na sorologia, 19 (9,45%) suspeitos e 6 (2,99%) positivos.

Tabela 1 - Resultados dos testes sorológicos (HI) para parvovirose em fêmeas e fetos suínos.

Animal testado	Resultados		
	Negativo	Suspeito*	Positivo**
Porcas*	2 (1,67%)	5 (4,17%)	113 (94,17%)
Fetos**	176 (87,56%)	19 (9,45%)	6 (2,99%)

- * Título Porcas: Neg 0-256; Susp- 512; Pos \geq 1024
- ** Título Fetos: Neg 0-32; Susp- 64; Pos \geq 128.

A tabela 2 apresenta os resultados da correlação entre títulos para PVS dos fetos e o tamanho dos mesmos. Nela observa-se que os 6 fetos positivos para PVS (2,99%) tinham comprimento maior que 20 cm. Dentre os animais suspeitos, 17 (8,45%) tinham

comprimento maior que 20 cm e apenas 2 (1,01%) com comprimento menor ou igual a 20cm.

Tabela 2 - Correlação entre títulos para PVS dos fetos e o tamanho dos mesmos.

Título (PVS)	Tamanho <=20 cm	Tamanho >20 cm	Total	Probabilidade χ^2
8	10	56	66	
16	7	59	66	
32	0	42	42	
64	2	17	19	
128	0	1	1	
256	0	3	3	
1024	0	2	2	
Total	19	180	199	P 0,2711

* Porcas: Neg 0-256; Susp- 512; Pos >=1024

** Fetos: Neg 0-32; Susp- 64; Pos >=128.

O teste Qui-quadrado aplicado aos dados (P 0,2711), não permitiu rejeitar a hipótese de independência entre títulos para PVS dos fetos e o tamanho dos mesmos. Isso significa que com os dados aqui obtidos não se pode afirmar que exista dependência entre tamanho do feto e detecção de anticorpos contra PVS.

Para parvovirose suína não houve correlação direta entre os títulos das porcas e dos fetos, ou seja, apenas 3 fetos filhos de mães positivas, com títulos acima de 2048, sugestivos de infecção, apresentaram títulos acima de 128, sugestivos de infecção no feto. Destes, 2 com título 256, de 2 porcas com título 16384 e 1 feto com título 1024, filho de uma porca que apresentou título 4096. Entretanto, outros 3 fetos tiveram resultado positivo, dois destes filhos de porcas com titulação 128 e um filho de porca com título 256, consideradas negativas, como pode-se verificar na tabela 3.

Tabela 3 - Relação entre os títulos para PVS das porcas e dos leitões

Título das Porcas *	Títulos dos leitões**							Total	Probabilidade χ^2
	8	16	32	64	128	256	1024		
32	0	1	0	0	0	0	0	1	
64	1	1	1	0	0	0	0	3	
128	1	4	3	4	0	1	1	14	
256	4	4	5	3	1	0	0	17	
512	3	1	1	0	0	0	0	5	
1024	5	12	5	4	0	0	0	26	
2048	4	6	7	1	0	0	0	18	
4096	3	1	7	2	0	0	1	14	
8192	0	0	1	0	0	0	0	1	
16384	3	0	3	0	0	2	0	8	
Total	24	30	33	14	1	3	2	107	P 0,4333

* Porcas: Neg 0-256; Susp- 512; Pos \geq 1024

** Fetos: Neg 0-32; Susp- 64; Pos \geq 128.

O teste Qui-quadrado aplicado aos dados (P 0,4333) não permitiu rejeitar a hipótese de independência entre títulos para PVS dos fetos e o tamanho dos mesmos. Isso significa que não se pode afirmar que exista uma dependência entre tamanho do feto e detecção de anticorpos contra PVS.

Todas as fêmeas testadas para PCV2 apresentaram reação positiva (tabela 4), sendo 32 (26,67%) reagentes(+), 84 (70%) reagentes(++) e 4 (3,33%) reagentes(+++). Dos fetos dessas fêmeas 193 apresentaram reação negativa e apenas 8 (3,98%) apresentaram-se reagentes(+).

Tabela 4 - Resultados dos testes sorológicos (IPMA) para circovirose em fêmeas e fetos suínos.

Animal testado	Resultados			
	Não Reagente	Reagente +	Reagente ++	Reagente +++
Porcas	0 (0%)	32 (26,67%)	84 (70%)	4(3,33%)
Fetos	193 (96,02%)	8 (3,98%)	0 (0%)	0 (0%)

Foi relacionado o resultado dos testes para PCV2 com o tamanho dos fetos, considerando o desenvolvimento do sistema imune. Observa-se na tabela 5 que fetos com tamanho menor ou igual a 20 cm não apresentaram título para PCV2. Só apresentaram título para PCV2 fetos maiores que 20 cm, num total 8 fetos (3,98%). Destes, 4 tiveram título 1:20 (2,01%); 1 teve título 1:40 (0,5%); 2 obtiveram título 1:80 (1,01%) e 1 teve título 1:160 (0,5%).

Tabela 5 - Títulos para circovirose. em fetos. relacionando ao tamanho dos mesmos.

Título (PCV2)	Tamanho <=20 cm	Tamanho >20 cm	Total	Probabilidade χ^2
0	19	172	191	
20	0	4	4	
40	0	1	1	
80	0	2	2	
160	0	1	1	
Total	19	180	199	P = 0,9274

O teste Qui-quadrado aplicado aos dados (P= 0,9274) não permitiu rejeitar a hipótese de independência entre tamanho do feto com seus títulos. Isso significa que não se pode afirmar que exista dependência entre tamanho do feto e detecção de anticorpos contra PCV2. Mesmo aplicando o teste de χ^2 classificando os animais que apresentaram título (8 fetos) e os que não apresentaram título (191 fetos), não foi significativo (P= 0,3483).

Não houve relação entre o título da mãe e o título do feto para PCV2, possivelmente porque a frequência de fetos reativos foi baixa, como apresentado na tabela 6.

Tabela 6 - Relação entre o título da fêmea para PCV2 e o título do feto.

Porcas	Leitões		Total	Probabilidade χ^2
	Não reativo	Reativo(+)		
Reativo (+)	25	2	27	
Reativo (++)	62	5	67	
Reativo (+++)	12	1	13	
Total	99	8	107	P = 0,9995

O teste Qui-quadrado aplicado aos dados (P = 0,9995) não permitiu rejeitar a hipótese de independência entre o título da fêmea para PCV2 e o título do feto. Isso significa que se pode afirmar que exista dependência entre o título da fêmea e o título do feto na detecção de anticorpos contra PCV2.

No diagnóstico para leptospirose (tabela 7), da totalidade das fêmeas testadas, 117 (97,5%) não apresentaram título, 1 (0,83%) apresentou título 1:100 para o sorovar *L. grippityphosa* e 2 (1,67%) com título reagente 1:400 para o mesmo sorovar. Nenhum dos fetos apresentou aglutinação neste teste.

Tabela 7 - Resultados sorológicos (SAM) para para *Leptospiras spp.*

Animal testado	Resultados		
	Não Reagente	Reagente Título 1:100*	Reagente Título 1:400*
Porcas	117 (97,5%)	1 (0,83%)	2 (1,67%)
Fetos	201 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

* Referente ao título *L. grippityphosa*

Na tabela 8 estão os resultados dos testes para diagnóstico das outras doenças pesquisadas.

Tabela 8 – Resultados dos diagnósticos das demais doenças reprodutivas estudadas.

Doença \ Teste Sorológico	Resultados	
Brucelose (AAT, SAL e 2-ME)	Não Reagente	Reagente
Porcas	120 (100%)	0 (0%)
Fetos	201 (100%)	0 (0%)
Toxoplasmose (HI)	Não Reagente	Reagente
Porcas	120 (100,%)	0 (0%)
Fetos	192 (95,52%)	9 (4,48%)
PRRS (Elisa)	Não Reagente	Reagente*
Porcas	118 (98,33%)	2 (1,66%)*
Aujeszky (Elisa)	Não Reagente	Reagente
Porcas	120 (100%)	0 (0%)
Peste Suína Clássica (Elisa)	Não Reagente	Reagente
Porcas	120 (100%)	0 (0%)
Erisipela (Elisa)	Não Reagente	Reagente
Porcas	104 (86,66%)	16 (13,33%)

* Os fetos destas 2 porcas foram testados por PCR e apresentaram resultado negativo. Uma destas foi recoletada, retestada apresentando sorologia negativa e outra foi descartada antes do reteste.

Nos testes para PRRS, VDA e PSC, brucelose e toxoplasmose nenhuma das porcas foi positiva.

Nenhum feto foi positivo para brucelose e 9 (4,48%) apresentaram infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

Foram identificadas 16 (13,4%) porcas soropositivas para Erisipela suína.

Tabela 9 - Frequência dos resultados sorológicos considerando grupos de doenças virais, bacterianas, parasitárias e combinações entre elas.

Animal testado	Com Título indicativo de Infecção					Sem Título, com Título baixo ou suspeito
	Viral (PCV2, PVS, VDA,PSC)	Bacteriana (Brucelose, Leptospirosee Erisipela)	Parasitária (Toxoplasmose)	Viral e Bacteriana	Viral e Parasitária	
Porcas	77 (64,17%)	19 (15,83%)	0 (0%)	9 (4,76%)	0 (0%)	33 (27,5%)
Leitões	12 (5,97%)**	0 (0%)*	9 (4,47%)	0 (0%)	0 (0%)	180 (89,55%)

* Não foram testados para *Erisipelotrix sp.* ** Testados somente para PCV2 e PVS

As fêmeas com sorologia alta para doenças virais e bacterianas foram 8 positivas para PVS e *Erisipelotrix sp.* e 1 positiva para PCV2 e *Erisipelotrix sp.*

6. DISCUSSÃO

As doenças reprodutivas, na suinocultura industrial, causam prejuízos econômicos em todo o mundo. A manifestação clínica dessas doenças é bastante variável podendo apresentar desde uma infecção subclínica até interrupção da gestação. O padrão da doença é largamente influenciado pela fisiologia reprodutiva do suíno e pelo patógeno envolvido (GRESHAM *et al.*, 2003; BARCELLOS *et al.*, 2009).

Na suinocultura mundial, um grande número de agentes infecciosos tem sido associado ao aborto e falhas reprodutivas podendo incluir os vírus (ex: Parvovírus suíno – PVS, Vírus da Doença de Aujeszky - VDA, vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Porcina – PRRSV, Vírus da Peste Suína Clássica - VPSC), os agentes bacterianos específicos (ex: *Erysipelothrix rhusiopathie*, *Leptospira pomona*, *Brucella suis*) e os protozoários (ex: *Toxoplasma gondii*). Recentemente o circovírus suíno tipo 2 (PCV2), agente etiológico da circovirose suína, foi associado com abortamento tardio em porcas (NEILL *et al.*, 1985; SADTLER *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1997; FRANTZ *et al.*, 2002; MALDONADO *et al.*, 2005; SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Há duas rotas principais para a infecção reprodutiva. A primeira é a infecção ascendente, na qual os agentes infecciosos são introduzidos no útero através da vagina durante o estro ou parto. A segunda ocorre pela corrente sangüínea, sendo que os agentes infecciosos atingem o concepto após episódios de viremia e ou bacteremia (VANNIER, 1999). Alguns agentes causam eventos individuais e esporádicos, enquanto outros são responsáveis por epidemias de aborto e morte fetal em diversas granjas (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007). Geralmente o diagnóstico etiológico de abortos é bastante difícil e conclusivo em apenas 30-40% dos casos (STRAW *et al.*, 1999).

Considerando o fato do aborto, muitas vezes, poder ser um problema multifatorial (HOLLER, 1994) sugere-se um procedimento sistemático de coleta de material, independente da suspeita inicial ou do diagnóstico presuntivo. Quando a necropsia é realizada no laboratório, o patologista pode coletar e enviar amostras apropriadas para a histopatologia, virologia e bacteriologia. Quando a necropsia é realizada a campo, a coleta e o seu envio tornam-se mais críticos. O histórico completo da granja, incluindo a idade correta dos animais afetados, quantos animais abortaram, o *status* de vacinação do rebanho,

se houve introdução de animais novos na granja, mudança de alimentação, ambiente ou alguma doença prévia diagnosticada no rebanho, pode contribuir de forma significativa no diagnóstico (HOLLER, 1994). A presença de títulos no fluido fetal geralmente tende a ser mais significativa que a presença de títulos observados no soro sanguíneo da fêmea suína (SOBESTIANSKY & BARCELLOS, 2007).

Parvovirose Suína

Os resultados deste levantamento sugerem que o PVS pode ser uma importante causa de mumificação fetal e natimortalidade em fêmeas suínas. No teste de HI para PVS, a maioria das fêmeas 113 (94,17%) teve título de anticorpos considerado positivo, com altos títulos em todos os rebanhos amostrados, 5 foram classificadas como suspeitas (4,17%) e somente 2 com resultado negativo (1,67%). Dos fetos, 176 foram negativos (87,56%), 19 suspeitos (9,45%) e 6 positivos (2,99%).

Estes fetos positivos foram confirmados pela técnica de PCR e Imunohistoquímica (SÁROCHA, dados não publicados¹; MORÉS, dados não publicados² respectivamente). Todos os fetos positivos tinham comprimento maior ou igual a 20 cm e dentre os suspeitos apenas 2 com comprimento inferior a 20cm (1,01%). Esses dados são reforçados como descrito por Joo *et al.* (1976) e Mengeling & Cutlip (1976) que por volta dos 70 dias de gestação o feto torna-se imunocompetente, ele é capaz de produzir anticorpos próprios e sobreviver à infecção. Como pode ser observado na tabela 3 não houve correlação direta entre os títulos das mães e dos fetos, ou seja, 3 fetos positivos são filhos de porcas consideradas negativas, dois destes filhos de porcas com titulação 128 e um filho de porca com título 256. Entretanto, apenas 3 fetos filhos de mães positivas, com títulos acima de 2048, sugestivos de infecção, apresentaram títulos acima de 128, sugestivos de infecção no feto, sendo 2 com título 256 de 2 porcas com título 16384 e 1 feto com título 1024 filho de uma porca que apresentou título 4096, embora o teste estatístico tenha concluído pela não dependência do tamanho do feto com o seu próprio título, nem a dependência do título do feto em relação ao título da mãe.

¹ Camila Sárocha, Mestranda CAV-UDES, 2009

² Nelson Mores, Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, 2009

A prevalência de fêmeas positivas é superior ao previamente descrito em outros países (NASH, 1990) e os dados obtidos variam de 44% de fêmeas positivas (ORAVAINEN *et al.*, 2005), 64,5% (STAFFORD *et al.*, 1992), 73,1% (FONI *et al.*, 1989) a 84,6% (ORAVAINEN *et al.*, 2006). O presente estudo foi direcionado e todas as fêmeas amostradas tiveram problemas reprodutivos o que não era o caso dos outros trabalhos anteriormente citados.

No Brasil, já foram realizados levantamentos sorológicos em criações comerciais antes da introdução da vacina frente ao PVS (GOUVEIA *et al.*, 1984) e após seu uso (BARTHASSON *et al.*, 2006; PIMENTEL *et al.*, 2006) e em criações rústicas para fins de subsistência (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Em todos os trabalhos, foram observadas elevadas porcentagens de animais com títulos heterogêneos anti-PVS. Assim como em relatos de outros países, a maioria destes estudos sorológicos não apresenta outros parâmetros reprodutivos, tornando uma avaliação sobre a vacina ou cepas de campo circulantes difícil de ser realizada.

Conforme Streck (2008) o PVS circula nos rebanhos brasileiros entre 15 e 18%, nas diferentes categorias animais, porém, através do teste de HI foi demonstrado que 84,7% de fêmeas eram positivas, 7,3% suspeitas e 8,1% negativas (GAVA *et al.*, 2009).

Na Região Sul foi demonstrado grande homogeneidade em criações comerciais, variando de 80,0% (MARTINS *et al.*, 1984) a 80,5% de suínos positivos (DAMBROS *et al.*, 1995). Por outro lado, o mesmo não foi evidenciado em criações extensivas ou de subsistência no Brasil, que apresentaram de 14,6% (BARTHASSON *et al.*, 2006) a 51,5% de animais positivos (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Possivelmente, essa homogeneidade encontrada em criações comerciais seja por possuírem um maior número de animais, propiciando a manutenção da circulação de agentes infecciosos entre os mesmos.

Existe uma grande controvérsia quanto ao título de anticorpos anti-PVS considerado protetor. Paul *et al.* (1980) consideram que apenas títulos maiores ou iguais a 80 ou 160 protegem os animais da infecção. Contudo, outros autores afirmam que títulos menores que 80 não protegem contra a infecção, mas podem proteger contra a infecção trans-placentária e conseqüente transtorno reprodutivo em fêmeas vacinadas. Foi demonstrado que em animais vacinados desafiados por via oral e nasal com PVS, títulos a partir de 10 já forneceram proteção (MENGELING *et al.*, 1979). Com o surgimento de vacinas comerciais no início dos anos 90, a vacinação (com vacina inativada) passou a ser

uma prática comumente utilizada nas criações comerciais brasileiras, cabe salientar que a infecção natural produz títulos mais altos do que a vacinação e que todas as matrizes aqui testadas foram vacinadas.

A distinção entre títulos de anticorpos vacinais e oriundos de desafios de campo poderia ser realizada através do nível de anticorpos, porque a estimulação humoral realizada pelas vacinas geralmente não excede títulos de 512 em HI (ORAVAINEN *et al.*, 2006). Entretanto, a impossibilidade de diferenciar anticorpos estimulados por vacinas de uma resposta estimulada por vírus circulantes, juntamente com a falta de uniformização de métodos sorológicos, dificultam este tipo de análise. Devido a isto, informações sobre as perdas reprodutivas da granja e diagnóstico por detecção direta passaram a ser necessários (ORAVAINEN *et al.*, 2005).

JOHNSON *et al.* (1976) evidenciou o caráter ubiqüitário do vírus, assim como sua ampla capacidade de disseminação dentro de uma granja através de um estudo que mostrou que animais jovens, abaixo de seis meses, apresentavam títulos baixos (supostamente oriundos da imunidade passiva) e, após este período, quase todos os animais estudados (95-100%) apresentavam títulos acima de 256 (oriundos da imunidade ativa).

Tradicionalmente a detecção direta do PVS é realizada a partir de tecidos ou envoltórios fetais (JOO *et al.*, 1976; ORAVEERAKUL *et al.*, 1990; SOARES *et al.*, 1998; WOLF *et al.*, 2008).

Não existem trabalhos semelhantes que relatem a pesquisa de anticorpos anti-PVS, através do teste HI, no soro de fetos, natimortos ou abortos, ou ainda em animais com falhas reprodutivas a campo para se poder comparar com os resultados aqui obtidos.

Diferentemente da detecção indireta, através de sorologia, a detecção direta do PVS poderia fornecer a comprovação de que o vírus está replicando no hospedeiro, podendo levar a perdas reprodutivas. Tradicionalmente, esta é realizada através da técnica de isolamento viral (LESLIE-STEEN e KIRKBRIDE, 1983) e da PCR (MORENO *et al.*, 2007; PESCADOR *et al.*, 2007; WOLF *et al.*, 2008) em tecidos oriundos de abortamentos. Apesar dessas técnicas serem sensíveis, uma reação de autólise nos tecidos fetais poderia degradar as partículas virais, mascarando os resultados, o que não ocorre na sorologia.

O teste de ELISA para o PVS possui eficácia equivalente ao HI (HOHDATSU *et al.*, 1988; WESTENBRINK *et al.*, 1989), além de ter vantagens como a leitura automatizada, alta reprodutibilidade e possibilidade de vendagem em kits, que tornam este

teste uma boa opção para o diagnóstico sorológico, principalmente para a análise de grande número de amostras pela agroindústria. Outros métodos sorológicos também já foram adaptados para o PVS, como a micro-aglutinação em tubo (JOO *et al.*, 1975), imunodifusão em gel de ágar (TOO *et al.*, 1983), imunofluorescência (RIVERA *et al.*, 1986) e a aglutinação rápida em placa (LÜ *et al.*, 2006). Entretanto nenhuma destas técnicas conseguiu obter a praticidade ou confiança do HI ou ELISA para o PVS (WESTENBRINK *et al.*, 1989).

Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína

Embora o aborto, a ocorrência de natimortos sejam sinais reprodutivos da fase aguda da PRRS (SOBESTIANSKY & BARCELLOS , 2007) e estes estivessem presentes nas fêmeas testadas, o teste ELISA para PRRS detectou apenas duas porcas positivas. Destas porcas, uma já tinha sido descartada e a outra foi re-coletada E re-testada apresentando resultado negativo, considerada falso positiva. Seus respectivos fetos foram testados pela técnica de *Nested RT-PCR* e os resultados foram negativos. Este resultado confirma os obtidos por Ciacci-Zanella *et al.* (2004) que ao estudarem a prevalência de PRRS em testes sorológicos em granjas que importavam material genético, portanto suscetíveis à introdução do agente patogênico, usando testes mais sensíveis apresentaram resultados negativo, permitindo aos autores concluir pela não ocorrência da doença no país.

Na presente pesquisa, também não foi observado, nas necropsias, nenhum feto com sinais clínicos descritos por Ciacci-Zanella *et al.* (2004), ou seja, manchas hemorrágicas no cordão umbilical, aumento do volume do cordão, acúmulo de fluido âmbar distendendo as membranas dos rins, etc.

TIZARD (2002) lembra que a baixa especificidade do teste ELISA podem causar resultados falso positivos, assim como a vacinação prévia, a administração de soros hiperimunes ou imunoglobulinas, a transferência passiva de anticorpos e falhas técnicas.

No Brasil não há relato ou descrição da PRRS até a presente data, apesar do fato de estar próximo de países que possuem a síndrome, como o Chile (RUIZ *et al.*, 2003) e a Venezuela (BOULANGER *et al.*, 2006) e ainda, importar animais, de países que apresentam a doença de forma endêmica. Apesar de haver a necessidade de monitorar constantemente a PRRS no Brasil como vigilância, há poucos levantamentos feitos e que

confirmam a ausência da enfermidade em nosso meio (RISTOW, 2000; CIACCI-ZANELLA *et al.*, 2001; RISTOW & LAGE, 2001). Após a entrada do vírus em um rebanho, o vírus se dissemina rapidamente e de 85 a 95% dos animais do rebanho se tornam soropositivos dentro de dois a três meses (ALBINA, 1997), demonstrando assim a alta transmissibilidade e a alta infectividade do agente etiológico.

Ciacchi-Zanella *et al.* (2001) analisaram 3785 amostras, em oito Estados do país, entre o ano de 1990 a 2001 e também não encontraram indícios da enfermidade. Sabe-se que o vírus da PRRS pode entrar em um país através da importação de suínos vivos infectados, sêmen contaminado e importação de produtos de origem suína contaminados, sendo a entrada de suínos vivos infectados a principal forma de disseminação da PRRS nos países atualmente positivos (ALBINA, 1997). Visto isso, é interessante citar um estudo evidenciando a ausência da PRRS na Suíça (CORBELLINI *et al.*, 2006) que analisou os resultados de levantamentos feitos para o vírus nos anos de 2001 e 2004, não encontrando evidências de que o vírus está presente neste país. Os autores deste estudo comentam que as importações restritas feitas somente de granjas negativas sorologicamente para a doença nestas últimas décadas é uma possível explicação para a contínua ausência da infecção pela PRRS no país. No geral, os países livres da síndrome da PRRS caracterizam-se por pequenos números de rebanhos e animais, pequena atividade comercial internacional de produtos e subprodutos suínos e por utilizar métodos mais tradicionais de produção. O Brasil, particularmente, está fortemente inserido no contexto internacional como importante produtor de suínos e exportador de carne e não apresenta estas características de produção de menor escala, o que aumenta consideravelmente a susceptibilidade do país frente ao agente e importância de se manter com o status de livre da PRRS. Com isso, a promoção de uma vigilância através de medidas de biossegurança como quarentenários, com testes laboratoriais rotineiros e eficazes, obtenção de animais e sêmen de fontes seguras, controle na importação de produtos e subprodutos suínos, adequado destino de dejetos e carcaças contaminadas e todas as medidas de biossegurança internacionais que asseguram a posição do Brasil como negativo para PRRS, diminuindo os custos de produção e trazendo vantagens comerciais e econômicas ao país.

Doença de Aujeszky

Não foram observadas porcas soro positivas para o VDA, através da técnica de Elisa. Não é conhecida no Brasil a prevalência do VDA nos rebanhos comerciais e nas criações de fundo de quintal. Por outro lado, as Granjas de Reprodutores de Suínos Certificadas (GRSC) que comercializam reprodutores estão livres. Devido à capacidade do VDA estabelecer infecção latente nos suínos, sem o aparecimento de sintomatologia clínica, o suíno infectado sub clínico é um disseminador do vírus, tornando cada vez mais importante a aquisição de reprodutores apenas de granjas com certificação sanitária oficial emitida pelo MAPA (SOBESTIANSKY *et al.* 2007).

Peste Suína Clássica

Nenhum dos animais testados foi soro-reagente no teste de ELISA anti Peste Suína Clássica (PSC). Isso está de acordo com o descrito em um estudo de Freitas e colaboradores (2004) que na região Sul o número de surtos de peste suína clássica atingiu 31 em 1993, diminuindo para zero em 1999, condição que é mantida até agora. Em 2000 foram investigadas sorologicamente anti vírus da PSC, 2066 granjas de suínos, sendo das 28.717 amostras de soro, nas quais foram detectadas 277 (0,96%) reativas em 83 (4%) granjas de suínos (FREITAS *et al.*, 2004). Independente das estratégias aplicadas durante 26 anos, foi demonstrado que o número de surtos de PSC de 1978 até 2004 caiu drasticamente em todo país, especialmente nos quatorze Estados inclusos na “Zona Livre de PSC”, *status* este adquirido em 4/01/2001. Os resultados sugerem que a eficácia dos programas de erradicação depende da continuidade das estratégias definidas como a vigilância rigorosa, notificação, rastreamento do vírus e medidas sanitárias que agilizem a ação no momento de detecção de vírus da PSC (FREITAS *et al.*, 2004). Edwards (1990) considera que o número de surtos de peste suína clássica pode indicar se as estratégias aplicadas para controlar a doença foram eficientes, mas em muitos países não foram.

Os resultados do presente trabalho, obtidos nos testes para Doença de Aujeszky e Peste Suína Clássica estão de acordo com o esperado considerando a condição de Estados

livres para estas doenças como consequência dos trabalhos de erradicação anteriormente executados para essas doenças.

Circovirose Suína

No presente estudo todas as fêmeas testadas reagiram sorologicamente para PCV2 (tabela 1), sendo 32 (26,67%) reagentes (+), 84 (70%) reagente (++) e 4 (3,33%) reagente (+++). Neste trabalho foi realizado o teste de Imunoperoxidase em monocamada (IPMA) do soro de fetos e/ou líquido torácico/abdominal, no qual obteve-se 8 (3,98%) fetos reagentes ao PCV2 com títulos variando entre 20 até 160. Cabe salientar que todos estes fetos reagentes eram maiores que 20 cm, fase em que ocorre o início do desenvolvimento do sistema imune do feto. Isto poderia indicar o contato do feto com o agente patogênico. Pensaert *et al.* (2004), demonstraram que o PCV2 pode atravessar a barreira placentária e causar infecção em embriões ou fetos mesmo em matrizes soropositivas. Neste estudo, os autores demonstraram que o PCV2 pode causar viremia de forma livre no plasma ou associada à célula. Kim *et al.* (2004) e Park *et al.* (2005) relataram que o PCV2 pode atravessar a barreira placentária em qualquer idade de gestação.

Os dados sorológicos encontrados nesse trabalho reforçam a indicação de Larochelle e colaboradores (2003) de que foram encontrados anticorpos para PCV2 em suínos provenientes de todos os continentes e que a infecção pelo PCV2 pode estar amplamente distribuída entre a população suína mundial. Lukert e Allan (1999) citam a ocorrência em diversos países europeus e em algumas propriedades nos EUA. Segales e Domingo (2002) informam que geralmente a prevalência muito elevada, índices próximos de 100% dos rebanhos são reagentes por sorologia, indicando que a infecção pelo PCV2 é disseminada e que pode ocorrer em rebanhos afetados e não afetados clinicamente pela síndrome.

A prevalência de 3,98% encontrada no presente trabalho assemelha-se mais as pesquisas realizadas por Pescador *et al.* (2007) nas quais, relataram 5,7% das amostras positivas ao PCV2 do total de 121 fetos investigados. Entretanto, Moreno *et al.* (2007) realizaram estudo por meio de PCR com 1727 fetos mumificados, natimortos e abortados, sendo que todas as amostras foram negativas para o PCV2. Resultados estes também encontrados por Maldonado *et al.* (2005) que não relataram participação efetiva do PCV2 como patógeno

fetal, mesmo na Espanha onde a SRM é amplamente disseminada. Entretanto, Zlitzlavsky *et al.* (2008) relataram República Checa, uma frequência de 21,7% a 54,1% entre os anos de 2005 a 2007, já Kim *et al.* (2004) em estudo realizado na Coreia do Sul observaram frequência do PCV2 em 13,1% de 350 fetos mumificados, natimortos e provenientes de aborto. Desta forma, há necessidade de outros estudos para avaliar a frequência de detecção do PCV2 em fetos suínos, bem como do impacto deste agente no desempenho reprodutivo do plantel.

Observando os altos níveis de anticorpos das fêmeas, vale considerar os achados de Barbosa *et al.* (2008) onde valores de títulos de anticorpos médios a altos para o PCV2 podem coexistir com a presença dos sinais clínicos característicos da síndrome e a presença do antígeno viral nos tecidos, e McNeilly *et al.* (1999) e Rodríguez-Arriola *et al.* (2003) correlacionaram altos títulos de anticorpos para o PCV2 com grande quantidade de antígeno viral nas lesões histopatológicas, alterações macroscópicas e sinais clínicos sugestivos da síndrome.

No presente trabalho, anticorpos anti-PCV2 foram detectados por imunoperoxidase em monocamada (IPMA), conforme descrito por Rodriguez-Arriola *et al.* (2000), utilizando diluições seriadas (de 1:20 às 1:20480) e agrupando os resultados como não reagente ou reagente com título baixo (1:20 a 1:80), médios (1:320 a 1:1280), e altos (1:5120 a 1:20480). O mesmo autor relatou que a importância da técnica está relacionada à obtenção de resultados que auxiliam o entendimento do padrão de infecção dentro do rebanho, sendo possível traçar estratégias de controle e realizar estudos epidemiológicos.

Nawagitgul *et al.* (2002) comparou técnicas sorológicas e concluíram que a IPMA exige experiência, não somente na preparação do cultivo celular, mas também na acurácia de interpretação dos resultados. Nawagitgul *et al.* (2002) relata o desenvolvimento de Métodos de ELISA, os quais podem ser automatizado, o que facilita a precisão e diminui o tempo para a liberação dos resultados para a detecção de anticorpos anti-PCV2. Estes testes de ELISA utilizavam como antígeno a suspensão viral oriunda de células infectadas com PCV2 (ELISA-PCV2) ou proteína recombinante da região ORF-2 do PCV2 (ELISA-ORF-2). Esses métodos, quando comparados com a técnica de IFI, apresentaram uma acurácia, sensibilidade e especificidade diagnóstica maiores que 90% . Entretanto BLANCHARD *et al.* (2003) desenvolveram um ELISA indireto, com uma proteína do capsídeo viral codificada pela ORF-2 do PCV2. Quando comparado com o teste de IP

observou-se sensibilidade 98,2 % e a 94,5% de especificidade diagnóstica. Já McNair *et al.* (2004) destacam a necessidade de procedimentos padronizados comercialmente para este vírus, pois a imunofluorescência indireta (IFI) e IPMA demonstram uma grande variação nos títulos obtidos entre diferentes laboratórios. Os testes exigem um nível de conhecimentos e equipamentos, que não pode estar presente em todos os laboratórios. Isso permite questionar a validade e utilidade das informações epidemiológicas sorológicas de estudos baseados em PCV2, como a relação entre níveis de anticorpo e a interpretação da doença. Mahé D. *et al.* (2003) concluíram que se houvesse comercialmente um método sorológico para PCV2 como o ELISA que é específico, sensível e fácil de usar, nos permitiria diagnóstico sorológico em larga escala em rebanhos.

Estudos recentes têm demonstrado a presença de PVS em suínos infectados naturalmente por PCV2 (ALLAN *et al.*, 1999) em casos de SDMS. Em outros trabalhos há relatos de co-infecção em 2,5% dos casos (PESCADOR, 2008, ALTHERR *et al.*, 2003).

No presente estudo não foi observada sorologia indicativa de co-infecção entre PCV2 e PVS, nem relação entre o título da mãe e o título do feto para PCV2 e PVS porque a frequência de títulos dos fetos foi muito baixa, como pode ser visto nas tabelas 2, 3 e 4.

Brucelose

Os resultados deste estudo mostraram que apenas uma amostra foi positiva no TAAT e resultou inconclusivo no 2-ME e PLT para brucelose. Essa amostra foi encaminhada para o laboratório Lanagro para realização do teste fixação de complemento (FC) que é mais sensível e indicado pelo MAPA para confirmação do resultado. Com isso confirmou-se que nenhuma das amostras foi positiva para a Brucelose suína. Considerando-se o número de animais testados, a ocorrência de animais soropositivos no presente estudo difere do descrito por Viana (1975), Figueiredo (1984) e Mota *et al.* (1997), cujas prevalências obtidas foram 13,0%, 8,7% e 60,0%, respectivamente, nos animais avaliados. As prevalências encontradas por Silva *et al.* (1984), por Poester (1989) e por Poester *et al.* (2002) respectivamente, 0,65%, 0,2% e 0,34% foram as mais próximas encontradas quando comparadas com o presente estudo (0%). Os resultados obtidos no presente trabalho, a exemplo do exposto por Poester (1989), não permitem estimativas sobre a prevalência da brucelose suína porque a amostragem não foi elaborada dentro dos

parâmetros estatísticos requeridos para estudos de prevalência. Todavia, para os objetivos do estudo apresentado aqui foi suficiente para demonstrar o perfil sorológico das amostras testadas.

Leptospirose

Das porcas testadas sorologicamente para leptospirose pelo método SAM, 117 (97,5%) não apresentaram qualquer título, 1 (0,83%) apresentou título 1:100 para o sorovar *L. grippityphosa* e 2 (1,67%) com título reagente 1:400 também para o mesmo sorovar, título este sugestivo de infecção recente. Nenhum feto suíno apresentou aglutinação neste teste. Todos os rebanhos analisados eram vacinados e apresentaram resultado negativo, indicando que não houve produção de anticorpos pelo animal ou o título baixou a ponto de não ser mais detectado pelo teste. O que chama atenção é o fato de que 100% das granjas utilizavam a vacinação como forma de prevenção, deixando claro que existem falhas nos protocolos vacinais e/ou manejo de vacinação e que, somente a vacinação não é um método de controle adequado, devendo ser trabalhados todos os fatores de risco, como por exemplo o controle de roedores e melhorar a qualidade da água.

Diversos inquéritos sorológicos já foram realizados no Brasil empregando a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em suínos indicando a maior ocorrência dos sorovares *L. icterohaemorrhagiae*, *L. tarassovi*, *L. hardjo*, *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. gryppothiphosa* em Santa Catarina (GRIEBELER & BATAZZO, 2007) e *L. icterohaemorrhagiae* no estado do Paraná (DELBEM *et al.*, 2004). Na presente pesquisa somente o sorovar *L. grippityphosa* foi identificado. Em Goiás, Souza (2000) também identificou *L. grippityphosa* porém, dentre os sorovares mais importantes esse ocupou o terceiro lugar.

A prova utilizada no presente trabalho (SAM) não é indicada para determinar proteção, mas sim a infecção ou contato, porque detecta principalmente anticorpos da classe IgM, que sofrem um declínio rápido ao longo da infecção. De acordo com Thierman (1984), a SAM não permite diferenciar animais infectados e vacinados, principalmente com títulos até 1:400. Conforme Ellis (1999) os animais infectados podem apresentar título abaixo de 1:100 podendo ser considerados falso negativos. Segundo André-Fontaine (1990) um animal pode ser excretor e sorologicamente negativo. Títulos elevados de SAM

não permanecem altos mais de dois meses após inoculação, o que explica que este teste pode não ser compatível com o nível de infecção da granja.

As coletas da presente pesquisa foram realizadas no momento do parto ou aborto ou no máximo 15 dias após este ter ocorrido, o que difere do sugerido por Pritchard (1986) ao recomendar que os veterinários devem ser prudentes na interpretação do teste porque para diagnóstico de problemas reprodutivos a sorologia normalmente é praticada no momento do aborto e repetida após 3 semanas, sendo que as vezes não se consegue detectar títulos altos.

A baixa prevalência da doença na maioria dos rebanhos estudados, favorece a oportunidade de se iniciar um programa de erradicação baseado em estratégias de antibioticoterapia e controle dos fatores de risco, como por exemplo o controle de roedores.

Erisipela Suína

Através da técnica de ELISA foram identificadas 16 de porcas soropositivas com títulos elevados para Erisipela (13,4%), os quais são sugestivos de infecção, mesmo as porcas estando vacinadas. Estes títulos demonstram a importância da doença como causadora de falhas reprodutivas em suínos como descrito por Penrithh & Spencer (2004), onde informaram que infecções por *Erysipelothrix* sp, têm sido demonstradas como causa de aborto em fêmeas suínas. Pescador (2007) também relatou a ocorrência da doença em um feto suíno abortado. Já Hoffmann & Bilkei (2002) verificaram mumificação fetal, aumento de natimortos em final de gestação. Segundo Fóscolo & Ristow (2009) a doença pode ser agrupada conforme a sintomatologia em aguda, subaguda ou crônica.

A prevalência encontrada de 13,4%, reforça o descrito por Bersano et al. (1982) que no Brasil, há um grande número de suínos portadores de *Erysipelothrix* sp. distribuídos, por todo o território. Pezerico (2004) verificou a ocorrência do agente em 19,41% de tonsilas de 510 suínos amostrados. Esta mesma autora, também relatou a ocorrência de 25,93% em Goiás, 23,08% no Paraná, 20,51% em Minas Gerais, 14,67% em São Paulo e 12,71% em Mato Grosso do Sul, indicando que a presença do *Erysipelothrix* sp. está disseminada em todo país.

Toxoplasmose

Todas as porcas testadas para toxoplasmose foram negativas, porém de suas leitegadas foram encontrados 9 fetos infectados (4,48%), todos de uma mesma granja, do Estado do Paraná, com títulos variando entre 32 a 256. O fato destes fetos serem positivos e as respectivas mães serem negativas pode sugerir inespecificidade do teste sorológico.

Como informa Tenter (1999) os animais podem se infectar, por via oral, pela ingestão de oocistos eliminados nas fezes de felídeos. Com isso, o gato doméstico que convive nas instalações de suínos, em especial nas fábricas de rações, representa um enorme risco. Bezerra *et al.* (2009) observaram que o sistema de criação (intensiva x extensiva) e Da Silva *et al.* (2008) que o grau de tecnificação são apontados como fatores de risco para a infecção de suínos. Pereira (2005) relata que o contato direto ou indireto com outras espécies de animais, tais como gatos e roedores, também tem sido incriminado como fator de risco. Para Tsutsui (2003) além desses já mencionados, fatores relacionados ao manejo, como a presença de lâmina d'água nas baias, bebedouro tipo canaleta e a presença de áreas alagadiças nas propriedades, foram associados à maior prevalência da infecção.

O presente estudo teve uma prevalência de 4,48%, porém Giralaldi *et al.* (1996) registraram casos de toxoplasmose congênita natural em granjas de suínos, em Londrina, no Paraná, de um total de 43 matrizes associadas com abortamento, natimortos ou mortos após o nascimento, 24 eram positivas (55,81%) para anticorpos anti-*T. gondii*. Conforme Pereira (2005) a prevalência da toxoplasmose suína no Brasil pode variar de região para região, conforme os hábitos sócio-culturais, fatores geográficos e climáticos.

Nos testes foi utilizada a técnica de hemaglutinação. Vários estudos epidemiológicos utilizando a mesma técnica já foram realizados em criatórios de suínos de vários Estados. Foram encontradas soroprevalências que variaram de 1,16% no Estado de Santa Catarina (WENTZ, SOBESTIANSKY & CHAPLIN, 1988) a 20% no Estado do Rio Grande do Sul (FIALHO & ARAUJO, 2003), a frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, foi 20% de soros iguais ou superiores a diluição 1:64. (FIALHO & ARAUJO, 2003). Vieira *et al.* (2005) detectaram o agente em 16% dos soros testados de fêmeas reprodutoras de criações de suínos tecnificadas, indicando que o *T. gondii* está presente nestas criações e é capaz de infectar estes animais. Já Carletti *et al.* (2002), no Paraná,

utilizando a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), verificaram uma prevalência de 42,85% e Carletti *et al.* (2005) encontraram 4% de animais positivos. Esses estudos apontaram também uma maior frequência de positivos em matrizes, quando comparadas aos animais de terminação.

Comparando os testes diagnósticos disponíveis como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste aglutinação direta modificada (MAT) que reconhecem anticorpos dirigidos a antígenos de superfície do parasito, enquanto que a hemaglutinação (HA) e o ELISA, normalmente reconhecem também antígenos citoplasmáticos, tendendo a detectar anticorpos mais tardios (SILVA, 2010). Ishizuka *et al.* (1986) compararam os resultados das provas de imunofluorescência indireta (IFI) e de hemaglutinação (HA), de anticorpos anti-Toxoplasma, em soros de suínos e obtiveram concordância de 69,2%. O índice de co-positividade de HA, em relação à IFI, foi de 72,8% e o de co-negatividade foi de 100%. Os resultados de Minho *et al.* (2004) são interessantes, pois não encontraram diferenças entre a IFI e o MAT. Segundo Dubey *et al.* (1995), o MAT é um teste de elevada sensibilidade para uso em suínos, em 1997 o mesmo autor conclui que o mesmo teste tem elevada especificidade analítica. Para Will *et al.* (2006) o teste é menos sensível apenas que o ELISA.

Dentre as doenças estudadas, as infecções virais foram as mais reagentes sendo identificadas em 77 porcas (64,17%) e 12 fetos (5,97%). As infecções bacterianas foram observadas em 19 porcas (15,83%) e a com maior prevalência foi Erisipela suína com 16 animais (13,4%) positivos. A doença parasitária pesquisada (Toxoplasmose) foi detectada apenas em 9 (4,76%) dos fetos testados. Não foi detectado título para nenhuma das doenças testadas em 33 porcas (27,5%) e 180 fetos (89,55%), sendo esses considerados negativos neste estudo. A associação de títulos altos para doenças virais e bacterianas ocorreu em 9 porcas, destas, 8 positivas para PVS e *Erisipelotrix sp.*, e 1 positiva para PCV2 e *Erisipelotrix spp.* Estes dados diferem dos encontrados por Kirkbride *et al.* (1978) e Broll *et al.* (1993) que fizeram levantamentos de causas de aborto em suínos e relataram uma prevalência de 8,2% a 16,5% por agentes bacterianos.

Na suinocultura moderna, a maioria dos problemas de fertilidade deve-se a transtornos não infecciosos dificultando o diagnóstico dos veterinários de campo já que normalmente os fatores de risco associados a este tipo de problema estão correlacionados entre eles, ou com transtornos infecciosos (HANSEN & WOLLMANN 2008).

Considerando que atualmente a suinocultura tem várias técnicas de imunodiagnóstico à disposição, o estudo sorológico é uma ferramenta auxiliar no diagnóstico, indicando que os suínos entraram em contato com o agente e a análise dos resultados e a interpretação dos títulos dos anticorpos permitem a verificação da eficácia dos programas de vacinação ou a detecção de desafios de campo na agroindústria. Esse controle simultâneo de inúmeros patógenos permite o estabelecimento de um perfil sorológico para as diversas enfermidades. Deste modo, permite traçar planos vacinais e profiláticos exclusivos para cada propriedade, região, época do ano e categoria animal.

Os resultados obtidos no presente estudo refletem a ocorrência dos agentes nas granjas estudadas, o que reforça a necessidade de se conhecer o perfil sorológico da granja ao realizar diagnósticos diferenciais e não apenas diagnósticos individuais. Ressalta-se, ainda, que a análise sorológica aplicada isoladamente não é suficiente para a detecção de doenças no rebanho.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O diagnóstico sorológico diferencial de falhas reprodutivas foi realizado em 120 fêmeas e de suas respectivas leitegadas em 27 granjas. Foram amostradas um total de 321 amostras.
- Testes de diagnóstico específicos já padronizados nos laboratórios participantes deste estudo foram realizados dentro dos padrões exigidos.
- Análises estatísticas foram realizadas para estudar a correlação entre os resultados dos testes e também entre os resultados e tamanho do feto ou leitão amostrado.
- A elevada sorologia positiva nas porcas (94,17%) para PVS indica ampla difusão da infecção em porcas com 2 ou mais fetos abortados, natimortos, mumificados ou inviáveis.
- Todos os fetos com sorologia positiva (2,99%) para PVS, também foram positivos no PCR realizado por outros autores no mesmo projeto, indicando que a prova sorológica do fluido fetal se constitui num bom material para diagnóstico da infecção por PVS.
- Não foram encontrados títulos de anticorpos sanguíneos das porcas contra os agentes de PRRS, VDA, PSC, Brucelose e Toxoplasmose.
- Todas as matrizes suínas avaliadas tiveram título de anticorpos para PCV2, contudo isso foi verificado em apenas (3,98%) de seus fetos.
- Títulos de anticorpos sugestivos de infecção para leptospirose suína foi detectada em apenas 1,67% das matrizes suínas.
- Foi evidenciado que 13,4% das matrizes suínas com patologia reprodutiva apresentavam anticorpos sanguíneos sugestivos de infecção por *Erysipelothrix spp.*

- Apesar das porcas serem negativas para anticorpos para *T. gondii*, 9 fetos (4,48%) demonstraram títulos anti-*T. gondii*. Isso sugere uma falta de sensibilidade do teste empregado, indicando a necessidade de se utilizar outro teste de diagnóstico sorológico para *T.gondii* para comparar esses resultados.

- A baixa frequência de anticorpos no fluído fetal para os agentes testados é coerente com os resultados de outros testes de diagnóstico do agente realizados no mesmo projeto, onde 89,55% dos fetos foram negativos para patógenos infecciosos.

- Nas porcas, os títulos de anticorpos indicativos de infecções virais tiveram maior frequência (64,17%) do que os títulos de anticorpos indicativos de infecções bacterianas (15,00%).

8. CONCLUSÕES

- Apesar da elevada frequência de títulos de anticorpos para PCV2 nas porcas ainda não está claro qual o papel do PCV2 na patogenia das falhas reprodutivas e qual a relação das co-infecções na severidade da doença.
- Apesar dos objetivos deste trabalho não serem de estudo de prevalência, os resultados deste estudo indicam que os fatores infecciosos tem um papel importante em problemas reprodutivos, mas não são os mais frequentes, indicando que fatores de manejo por exemplo são mais significantes e devem ser controlados para se evitar perdas relacionadas a falhas reprodutivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br>>. Acesso em: 11 jan. 2010.
- AKKERMAN J.P.W.M. Ziekte van Aujeszky bij het varken in Nederlan. **Tijdschr Diergeneeskd Journal**, v.89, p.146-159, 1964.
- ALBINA, E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. **Vet.Microbiol.**, v.55, p.309-316, 1997.
- ALBINA, E. et al. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky`s disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. **Veterinary Microbiology**, n.77, p.43-57, 2000.
- ALLAN, G.M. et al. Experimental Reproduction of Severe Wasting Disease by Co-infection of Pigs with Porcine Circovirus and Porcine Parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v.121, p. 1-11, 1999.
- ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 12, n. 1, p. 3-14, 2000.
- ALLAN, G.M. PMWS/PCVD: Diagnosis, disease, and control: What do we know? In: International Pig Veterinary Society Congress, 19, 2006, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen, Dinamarca: IPVS, 2006. p.1-9.
- ALLAN, G.M. et al. PMWS: experimental model and co-infections. **Veterinary Microbiology**. v. 98, n. 2, p. 165-168, 2004.
- ALLAN, G.S. et al. A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. **Journal of Hygiene**, Cambridge , v. 76, p. 287-298, 1976.
- ALLENDE, R. et al. A. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Description of Persistence in Individual Pigs upon Experimental Infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 22 , p. 10834–10837, nov. 2000.
- ALMEIDA, L.P.; MARTINS, L.F.S.; BROD, C.S. Levantamento soropidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana da região sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 76-81, 1994.

ALMOND, G.W. et al. Diseases of the Reproductive System. In: Straw B, D'Allaire S, Taylor D, Zimmerman J, eds. **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr. p. 113-148, 2006.

ALTHERR, B. et al. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) in aborted fetuses. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASE, 4., 2003, Rome. **Proceedings...**Rome, 2003. p. 218-219. Palazzo dei Congressi, June 29th-July 2nd, 2003

ALTON, G.G. Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 54, p. 551-557, 1977.

ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIETZ, D.E. **Laboratory technique in brucellosis**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 1975. 175 p.

ALTON, G.G. et al. **Techniques for the brucellosis laboratory**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988. 545 p.

ANDRE-FONTAINE G.; GANIERE J.P. New topics on leptospirosis. **Compendium of Immunological and Microbiological Infection Disease**, Oxford, v. 13, p.163-168, 1990.

ANNELLI, J.F. Status of Aujeszky's disease (Pseudorabies) in the Americas. In: OIE SYMPOSIUM BANGKOK, 1994, Paris. **Annals...**, Paris, OIE, 1994, p. 71-75.

ARAJ. G. F. et al. Elisa versus routine tests in the diagnosis of patients with systemic and neurobrucellosis. **Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 171-174, 1988.

ARAUJO, F.A.P. de. **Avaliação soropidemiológica de anticorpos para Toxoplasma gondii Nicolle & Manceaux, 1909 em soros de suínos (Sus scrofa) da região da Grande Erechim, RS – Brasil, detectados através das técnicas de imunofluorescência indireta de imunoenzimática**. 1999. 125 f. Tese (Doutorado na Área de Protozoologia) – Instituto Oswaldo Cruz, São Paulo, 1999

AYNAUD, J.M. et al. Peste porcine chronique: propriétés in vitro et in vivo de 7 souches de virus isolées dans des élevages présentant des troubles de La reproduction. **Bull. Acad. Vét. de France**, v. 50, p. 371-384, 1977.

AYNAUD, J.M. et al. Peste porcine chronique: propriétés in vitro et in vivo de 7 souches de virus isolées dans des élevages présentant des troubles de La reproduction. **Bull. Acad. Vét. de France**, v. 50, p. 371-384, 1977.

BACHMANN, P.A. 1969. Vorkommen und verbreitung von Picodna (Parvo) – virus beim Schwein. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 16, p.341, 1969.

BADKE, M. R. T.; Leptospirose. **Congresso Abraves**, Santa Catarina, 2001 Disponível em : <http://www.cnpsa.embrapa.br/abraves-sc/pdf/Memorias2001/1_manoelrenato.pdf>. Acesso em 15 jan. 2009.

- BALASCH, M. et al. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **J. Comp. Pathol.**, v. 121, p. 139–148, 1999.
- BARBOSA C.N. et al. Perfil sorológico para circovírus suíno tipo 2 em granjas comerciais de suínos no Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 815-820, ago. 2008.
- BARBOSA, C.N. **Circovirus suíno-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunistoquímica e estudos sorológicos.** 2005. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- BARCELLOS D.E.S.N. et al. Uso de perfis sorológicos e bacteriológicos em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, p.117-128, 2009. (Supl 1).
- BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J. **Atlas de doenças dos suínos.** 1. ed. Goiânia: Art 3 impressos especiais, 2003. 207 p.
- BARTHASSON D.L. et al. Detecção de infecção por parvovírus suíno e gastroenterite transmissível em suínos criados de forma extensiva do Estado de Goiás. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE SUINOCULTURA, 3., 2006, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2006..p.125.
- BASTOS, M. **Leptospirose.** Disponível em: <<http://www.cca.ufes.br/caklbacteri.htm>>. Acesso em: 25 mar. 2008.
- BERCHIERI, A.J.; MACARI, M. **Doenças das Aves.** Campinas: FACTA, 2000. 490 p.
- BERSANO J.G. et al. Dados preliminares sobre a ocorrência e anticorpos para o parvovírus suíno no Estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 1993, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1993. p.17.
- BERSANO, J.G. et al. Diagnóstico precoce da Peste Suína Clássica através da biópsia das amígdalas. **Biológico**, São Paulo, v. 51, n. 7, p. 181-184, 1985.
- BEZERRA R.A. et al. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet.**, Jaboticabal, v.18, p. 78-80, 2009.
- BIRONT, P.; LEUNEN, J.; VANDEPUTTE, J. Inhibition of virus replication in the tonsils of pigs previously vaccinated with a Chinese strain vaccine and challenge oronasally with a virulent strain of classical swine Fever virus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 14, n. 12, p. 105-113, jun. 1987.
- BLAHA, T. **Applied veterinary epidemiology.** New York: Elsevier, 1989. 343 p.
- BOGDAN, J. et al. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs a retrospective study, 1995-1998. **Can. Vet. J.**, v. 42, p. 548-550, 2001.
- BOLIN, C. A, et al. Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans*

- serovar.Bratislava.infection of swine. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**,v. 3, p. 152-154, 1991.
- BOULANGER, A. et al. Seroepidemiology of PRRSV infection in four pig farms in Venezuela. In: CONGRESS OF THE IPVS, 19, 2006, Copenhagen. **Proceedings....Copenhagen, Denmark, 2006.** v. 2, p. 32.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 31, de 10 de maio de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 maio 2002.
- BRASIL. Instrução Técnica nº 12 de junho de 1999. Normas para certificação de granjas de suínos com um mínimo de doenças (GSMD) e granjas de suínos certificadas (GSC). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 25.jun. 1999, Seção 1, p. 155.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCEBT.** 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Defesa Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina.** 9 p. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dda/programa.htm>>..Acesso em 5 set. 2008.
- BRENTANO, L. Doença de Aujeszky dos suínos: etiologia – diagnóstico – patogenia – controle. **Suinocultura Dinâmica**, Concórdia, v. 1, n. 5, out. 1992.
- BROLL S. et al. The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 40, n. 9/10, p. 641-653, 1993.
- CAMARGO M.E. Toxoplasmose: diagnóstico sorológico. **Boletim Médico do Laboratório Bronstein**, Porto Alegre, 1996. 4 p.
- CAMARGO, M.E. Introdução as técnicas de imunofluorescência. **Rev Bras Patol Clín.**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 87-107, 1974.
- CAMPBELL, J.B.; PEERBAYE, Y.A. Saponin. In: Forum Immunology, 44, 1992, Oxford. **Research...** Oxford, 1992. v. 143, p. 526-530.
- CARBREY, E.A; STEWART, W.C.; YOUNG, S.H. The changing picture of hog cholera: case studies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 12, p. 1720-1724, 1966.
- CARIOLET, R. et al. Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes..**Proceedings....European Society for Veterinary Virology** , PMWS, p. 128, 2001.
- CARLETTI, R.T. et al. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no estado do Paraná, Brasil. **Semin, Cienc. Agrar.**, v. 26, p. 563-568, 2005.

- CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M. *Brucella*. In: _____. **Essentials of veterinary bacteriology and mycology**. 4.ed. Philadelphia: London, p.196 - 201, 1991.
- CARTWRIGHT S.F.; HUCK R.A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. **Veterinary Record**, v. 81, p. 196-197, 1967.
- CARVALHO, L.F.O.S. Vacinas e vacinações em suinocultura intensiva. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS - AVESUI, SUINOCULTURA: SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 4., 2005, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: 2005, p. 14.
- CASAS-OLASCOAGA, R. Diagnóstico serológico de la brucelosis animal. **Bol. Centro Panam.Zoon.**, Ramos Mejia: Oficina Sanitária Panamericana/Organizacion Mundial de la Salud: Buenos Aires, v.18 n. 3/4, p.107-139, 1976.
- CASTRO, A.M.M.G. de. et al. Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n.3, p. 281-291, jul./set., 2007.
- CHAE, C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of etiology, diagnosis and pathology..**The Veterinary Journal**, v.168, p. 41-49. 2004.
- CIACCI – ZANELLA, J.R et al. Toxoplasmose em rebanho suíno com histórico de mumificação fetal. In: CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Memória**, Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2000, p.15.
- CIACCI – ZANELLA, J.R. et al. **Mumificação fetal em suínos associada à toxoplasmose**. Concordia- SC: Embrapa Suínos e Aves, 2001. (Comunicado Técnico).
- CIACCI – ZANELLA, J.R. et al. Identificação do circovirus suíno tipo 2 (PCV2) por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 36, n. 5, p. 1480-1485, 2006.
- CIACCI_ZANELLA, J.R. et. al. Erradicação da Doença de Aujeszky em Santa Catarina: Importância da Condição Sanitária dos suínos de reposição. **Comunicado técnico 391**, 5 p., jun. 2005
- CIACCI-ZANELLA JR, H et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.2, p. 449-455, 2004.
- CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N. Diagnostic of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG, v. 55, p. 522-527, 2003.
- CIACCI-ZANELLA, J.R. PRRS: Atualização e desafios para a suinocultura brasileira. **Revista Suínos & Cia**, São Paulo, v. 2, n.7, p.10-13, 2004.
- CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Estudo da prevalência do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos em plantéis de suínos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO

DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, 2001. v. 2, p. 83.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão desmamado (SMDLD) causada por circovirus suíno. In: CONGRESSO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Memória**. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2000. p. 16.

CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Ocorrência de circovirus suíno tipo 2 (PCV2) em suínos ou materiais com suspeita clínica de síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) enviados para diagnóstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Embrapa Suínos e Aves, 2003, p. 95-96.

CIACCI-ZANELLA, J.R. et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p.449-455, mar./apr. 2004.

CLARK, E.G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS, 28, 1997, Quebec. **Proceedings ...** Quebec, 1997. p. 499-501.

CLARK, L.K. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. **Animal Reproduction Science**, v.42, n.1/4, p. 447-454, 1996.

COACKLEY W.; SMITH V.W. Porcine parvovirus in Westerns Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 536. 1972.

CÓDIGO ZOOSANITÁRIO INTERNACIONAL Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 11 jan. 2009.

CORBELLINI, L. et al. Analysis of national serological surveys for the documentation of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome in Switzerland. **Vet. Microbiol.**, v. 118, n. 3/4, p. 267- 273, 2006.

CORRÊA, M.N. et al. Natimortalidade em suínos. II. Caracterização de fatores de risco. In: CONGRESSO ABRAVES, 9., 1992, Porto Alegre. **Anais...**Porto Alegre: Embrapa Suínos e Aves, 1992.

COSTA T.L. et al. Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose. **News**, v. 85, p. 88-104, 2007.

COSTA, M.C.R. et al. Avaliação da imunidade cruzada entre *Leptospira hardjo* e *L. wolffi*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 50, n. 1, p. 11-17, 1998

CRANDELL, R.A; MESFIN, G.M.;MOCK, R.E. Horizontal transmission of pseudorabies virus in cattle. **Am. J. Vet. Res.**,v. 43, n. 2, p. 326-328, 1982.

DA SILVA AV, BOARETO H, ISBRECHT FB, et al. Ocorrência de anticorpos anti-Toxoplasma gondii em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. **Vet Zootec.**, v. 15, p. 263-266, 2008.

DAMBROS, R.M.F; MARQUES, J.L.L; JAENISCH, F.R.F. Demonstrativo sorológico para o parvovirus suíno no estado de Santa Catarina no ano de 1994. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 7., 1995, Blumenau. **Anais...**Blumenau: Embrapa Suínos e Aves, 1995.

D'ANGELINO, J.L.; ISCHIZUKA, M.M. Toxoplasmose suína. III. Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. **Bol Ofic Sanit Panam**, v. 100, n. 6, p. 634-647, 1986.

DAVIES,E.B.; BERAN, G.W. Spontaneous shedding of pseudorabies virus from clinically recovered postparturient sow. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.176, p. 1345-1347, 1980.

DEA, S. et al. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome vírus using recombinante E. coli-expressed nucleocapsid protein as antigen. **Journal of Virological Methods**, v. 87, p. 109-122, 2000. Disponível em:

<www.elsevier.com/locate/jviromet>. Acesso em: 15 outubro 2008.

DELBEM, Á. B. et al. Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 847-852, mai/jun, 2004.

DEPNER, K. R. et al. Classical swine fever in wild boar (*Sus scrofa*) – experimental infection and viral persistence. **Deustsch Tierarztl Wochenschr**, German, v. 102, n. 10, p. 381-384, 1995.

DESCHAMPS, J. C. (Orgs.) et al. **Agronegócio brasileiro: ciência, tecnologia e competitividade**. Brasília: CNPq, 1998. cap. 18, p. 239-255.

DUBEY J.P. 2005. Toxoplasmosis in cats and dogs. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 30., México. Disponível em:

<<http://www.vin.com/proceeding/Proceeding>>. Acesso em: 15 jun. 2008.

DUBEY, J.P. et al. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of Toxoplasma gondii infection in naturally infected sows. **Am J Vet Res.**, v. 56, p.1030-1036, 1995.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis, sarcocystosis, isosporosis, and cyclosporiasis. In: PALMER, S.R.; SOULSBY, L.; SIMPSON, D.I.H. **Zoonoses**. Oxford : Oxford University, 1998. 948 p.

DUNNE, H.W. Hog cholera. London: **Academic Press**, v.17, p. 315-359, 1973.

- DUNNE, H.W.; HOKANSON, J.F.; LUEDKE, A.J. The pathogenesis of hog cholera. I. Route of the virus into the animal body. **American Journal of Veterinary Research**, v. 20, p. 615, 1959.
- EAMENS, G.J. et al. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Australian pigs, small ruminants, poultry and captive wild birds and animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, p. 249-252, 1988.
- EAMENS, G.J.; CHIN, J.C.; TURNER, B.; ARCHIA I. Evaluation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccines in pigs by intradermal challenge and immune responses. **Vet. Microbiol.**, v. 30, p. 283, 2007.
- EDWARDS, J.D.; DAINES, D.A. Leptospirosis outbreak in a piggery. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 27, n.11, p. 247-248, 1979.
- EDWARDS, S. Hog cholera and African swine fever in Europe. **Pig Veterinary Journal**, London, v. 25, p. 9-16, 1990.
- ELIOT, M. et al. Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. **The Veterinary Record**, London, v. 124, p. 91-94, jan. 1989.
- ELLIS, J. et al. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 159-163, 2004.
- ELLIS, W. A. *Leptospira australis* infection in pigs. **Pig Veterinary Journal**, v. 22, p. 83-92, 1989.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis. In: LEMAN, A. D. et al. **Diseases of swine**. 7. ed. Ames: Iowa State Univ., 1999. p. 483-493.
- ELLIS, W.A.; THIERMANN, A.B. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar bratislava from sows in Iowa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 7, p. 1458-1460, 1986.
- ENZMANN, P.; HARTNER, D. Studies on the structure of swine fever virus. In: Hog cholera classical swine fever and african swine fever commission of the european communities. Luxembourg, Deutschland, p.75-84, 1977.
- ESTEIN, S.M. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la Epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. **Archivos Medicina Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 5-17, 1999.
- FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne: Australia, MediSci, p. 272, 1999.
- FARREL R.L. et al. Toxoplasmosis. Toxoplasma isolated from swine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 13, p. 181-184, 1952.

- FERNANDES, L.T. et al. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) isolado no Brasil e parvovírus suíno (PPV) em suínos SPF. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 1-8, 2006.
- FERRI, R.G.; CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.C. **Imunologia**. São Paulo: EDUSP, 1977. 316p.
- FIALHO, C.G.; ARAÚJO, F.A.P. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33 n.5, 2003.
- FIGUEIREDO, B.L. **Brucelose como doença ocupacional**. Belo Horizonte, 1984. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1984.
- FONI, E.; GUALANDI, G.L. A serological survey of swine parvovirus infection in Italy. **Microbiologica**, v. 12, p. 241-245, 1989.
- FÓSCOLO, C. B.; RISTOW, L. E. **Relato de Caso: Erisipela**. Fonte: Tecsa Laboratório. Disponível em:
<http://www.suinos.com.br/mostra_noticia.php?id=4756&comunidade=Curiosidade&cd=12>. Acesso em: out. 2008.
- FRANTZ, F.J. et al. Micobacteriose Neonatal em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002,.. **Anais...2002**. p.13-28.
- FRANTZ, J.C.; HANSON, L.E.; BROWN, A.L. Effect of vaccination with a bacteria containing *Leptospira interrogans* serovar bratislava on the breeding performance of swine herds. **American Journal Veterinary Research**, v. 7, n. 50, p. 1044-1047, 1989.
- FREITAS, J.C. et al. Isolation of *Leptospira spp.* from dogs, bovine and swine naturally infected. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 853-856, 2004.
- FREITAS, T. R. P. **Conceitos básicos, métodos e técnicas em laboratório de virologia animal**. 1. ed. Pedro Leopoldo, MG: Tavares, 2006. 76 p.
- FUJISAKI, Y. Haemagglutination-inhibition test for porcine parvovirus. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 28, n. 3, p. 135-138, 1975.
- FUJISAKI, Y. Haemagglutination-inhibition test for porcine parvovirus. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 28, n. 3, p. 135-138, 1975.
- GARCIA, J.L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná – Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 1999.
- GAVA, D. et al. Atualização sobre a parvovirose na suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, p. 105-115, 2009. (Supl 1).

GAVA, D. **Padronização de técnicas de diagnóstico para circovírus suíno tipo 2 e estudo do papel do macho na epidemiologia da doença**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GENOVEZ, M. E., **Leptospirose, uma doença para além da época das chuvas**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/leptospirose/index.htm>. Acesso em: ago. 2008.

GIRALDI, N. et al. Estudo da toxoplasmose congênita natural em granjas de suínos em Londrina, PR. **Arq Bras Med Vet Zoot.**, v. 48, p. 83-90, 1996.

GIRALDI, N. et al. Toxoplasmose congênita natural em suínos na região de Londrina, PR. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 1, p. 1-5, 1991.

GODFROID, J.; KÄSBOHRER, A. Brucellosis in the european union and norway at the turn of the twenty-first century. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 135-145, 2002.

GOUVÊIA A.M.G., GOMEZ M.C.; REIS R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 17-22. 1984.

GRESHAM, A. Infectious reproductive disease in pigs. **Farm Animal Practice in Practice**, v. 25, n. 8, p. 466-473, 2003.

GUIDA, V.O. Identificação sorológica de amostras de *Leptospira* (*L. hyos*), isoladas de suínos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 25, p. 73-75, 1958.

GUIDA, V.O. et al. Leptospirose suína provocada pela *L. canicola* em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 26, p. 49-54, 1959.

GUT, M. et al. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex. **Veterinary Microbiology**, Holland, v. 69, p. 239-249, 1999.

GUTIÉRREZ-MARTÍN, C. B. et al. Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 9-13, 2000.

HAESEBROUCK, F et al. Efficacy of vaccines against bacterial disease in swine what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 255-268, 2004.

HANSEN, D.; WOLLMANN, E. Abordagem prática dos transtornos infecciosos reprodutivos em suínos: o exemplo da leptospirose. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 4., Curitiba, 2008. **Anais... Curitiba, 2008. – Pork Expo 2008**, Seminário Técnico de Sanidade; 30 de setembro a 02 de outubro.

HANSON, R.P. The origin of the Hog Cholera. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 131, p. 211, 1956.

- HARDING, J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. **Swine Health and Production**, v. 6, p. 249-254, 1996.
- HARMS, P.A. et al. Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 528-539, 2001.
- HILL, D.E., et al. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. **Vet Parasitol.**, v. 141, p. 9-17, 2006.
- HIPRA. Disponível em: http://www.hipra.com/english/civtest_cerdospop.asp?kits=nueve. Acesso em: 15 out. 2009.
- HOFFMANN, C. W.; BILKEI, G. Case Study: chronic Erysipelas of the sow: a subclinical manifestation of reproductive problems..**Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 119-120, 2002.
- HOLLER, D. Diagnosis of swine abortion..**Swine Health and Production**, v. 2, n. 6, p. 29-31, 1994.
- HUNTER, D.; ALLEN, J. An evaluation of milk and blood test used to diagnose brucellosis. **Vet. Rec.**, v. 91, p. 310-312, 1972. Disponível em: <<http://trc.ucdavis.edu/mjguinan/apc100/modules/reproductive>>. Acesso em: 15 out. 2008.
- IMADA, Y. et al. Serotyping of 800 strains of Erysipelothrix isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2121-2126, 2004.
- ISHIZUKA, M. M.; D'ANGELINO, J.L.; SOUZA, J. M. P. Toxoplasmose suína: 2. Estudo comparativo das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação para a avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros suínos / Swine toxoplasmosis: 2. Comparative study of indirect immunofluorescence and hemagglutination tests for the evaluation of anti-Toxoplasma antibodies in swine serum. **Bol. Oficina Sanit. Panam**, v. 100, n. 5, p. 524-30, mayo 1986.
- ISHIZUKA, M.M. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta em suínos de matadouro do município de São Paulo. **Rev Fac Vet Zootec USP**, v. 15, n. 2, p. 151-154, 1978.
- JANKE B. Case report: porcine circovirus as a cause of reproductive problems. **Proceedings of the Iowa Veterinary Medicine Association**, Ames, p. 101, 2000.
- JOHNSON R.H., DONALDSON-WOOD C. & ALLENDER U. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 80-84, 1976.
- JOHNSON, R.H.; COLLINGS, D.F. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. **Research in Veterinary Science**, v. 12, p. 570-572. 1971.

- JOLIE, R.; RUNNELS, P.; MCGAVIN, D. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in a group of caesarian derived colostrums deprived pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000., **Proceedings...** Cit Harding, 2000.
- JOO H.S.; JOHNSON R.H. Serological response in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. **Australian Veterinarian Journal**, v. 53, p. 550-553, 1977.
- JOO, H.S., DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A microneutralization test for the assay of porcine parvovirus antibody. **Archives of Virology**, v. 47, p. 337-341, 1975.
- JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 422-444, 1976.
- KAWAZOE U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D.P. (Ed.) **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.
- KEMENES, F.; SZEKY, A. Contribution to the diagnosis of infectious swine abortion. **Zentralblatt Veterinärmedizin B**, v. 18, p. 170-176, 1971.
- KIM, J. et al. Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. **Veterinary Record**, v. 149, n. 8, p. 304-305, 2001.
- KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record**, v. 155, n. 16, p. 489-492, 2004.
- KINKER, D. R. et al. Evaluation of serological testes for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. **Veterinary Microbiology**, Holland, v. 55, p. 99-106, 1997.
- KIRKBRIDE, C. A.; MCADARAGH, J. P. Infectious Agents Associated with Fetal and Early Neonatal Death and Abortion in Swine. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 172, n. 4, p. 480-483, 1978.
- KLUGE, J. P. et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: LEMAN, A. D. (Ed) *et al.* Diseases of Swine. 7th. Ames: Iowa State University Press, 1992. cap. 24, p. 312-323.
- KLUGE, J. P. et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: STRAW, Barbara E. (Ed.) *et al.* **Diseases of swine**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 233-246.
- KLUGE, J. P. et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: LEMAN, A.D. **Diseases of swine**. 7.ed. Ames: Iowa State University, 1993. cap.24, p. 312-323.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present and future. **Journal Postgrad Medicine**, v. 3, n. 51, p. 210-214, 2005.
- KORN, G.; SCHOJERNING, T.; LIEBRE, H. La mise em évidence d'antigènes et d'anticorps dans um foyer de peste porcine classique ayant débuté par la mort de porcelets. **Bull. Off. Int. Epiz.**, v. 72, p. 531- 542, 1969.

- LACERDA, J.B. **Relatório sobre a Peste dos Suínos no Estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte- MG, 1899.
- LAROCHELLE, R et al. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4629-4632, 2000.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serological and virological study of herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EMERGING AND RE-EMERGING PIG DISEASES, 4., 2003, Rome. **Proceedings...** Rome, 2003..p. 336
- LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p. 296-326, 2001.
- LEVINE N.D. et al..A newly revised classification of the Protozoa. **Journal Protozoology**, v. 27, p. 37-58.,1980.
- LINDSAY, D.S.; BLAGBURN, B.L.; STUART, B.P. Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). In: LEMAN, A.D. *et al.* **Diseases of swine**. 7.ed. Ames : Iowa States University, 1992. 1021 p.
- LIU, Q. et al. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 9, p. 3474-3477, 2000.
- LOBATO, Z.I.P. Evaluation of serological response of pigs immunized against porcine parvovirus with an experimental inactivated vaccine and by the feedback method. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 155-156, 1992.
- LOBO, E.A. et al. Estudo comparativo do padrão sorológico de animais domésticos potencialmente transmissores de leptospirose no Município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, entre os anos de 2002 e 2003. **Caderno de Pesquisa- Série Biologia**, v. 16, n. 2, p. 47-64, 2004.
- LOVEDAY, R.K. Acute swine erysipelas in suckling pigs. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v. 33, p. 3-5, 1962.
- LÜ, J. et al. A slide latex agglutination test for the rapid detection of antibodies in serum against porcine parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, p. 59-61, 2006.
- LUKERT, P.D.; ALLAN, G.M.; Porcine Circovirus, In: Straw B.E., (ed.) **Disease of Swine**. 8th ed. Iowa State University Press, Ames. 1999..p. 119-124.
- LYOO, K.S.; PARK, Y.H.; PARK, B.K.L Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v. 2, n. 3, p. 201-207, 2001.
- MADEC, F. et al..Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in

- France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 223-233, 2000.
- MADRUGA, C.R.; ARAUJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360 p.
- MAES, D. et al. **Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview** theriogenology, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, 2008.
- MAHE, D. et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. **J. Gen. Virol.**, v. 81, p. 1815-1824, 2000.
- MAILLOUX, M. Leptospiroses=Zoonoses. **International Journal of Zoonoses**, v. 78, n. 12, p. 1158-1159, 2001.
- MALDONADO, J. et al. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 454-456, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 19/02. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 fev. 2002. n. ° 41, Seção 1. 2002
- MARTINS R.M. et al. Sorologia de parvovírus suíno em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 5., 1984, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Embrapa Suínos e Aves, 1984. p.39.
- MATOS, M. P. C. et al. Ocorrência de *Ac p.Brucella sp.* em soros de matrizes suínas de granjas que abastecem o mercado consumidor de Goiânia, estado de Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 105-108, abr./jun. 2004.
- McNEILLY, F. et al. A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **J. Virol. Meth.**, v. 80, p. 123- 128, 1999.
- MEEHAN, B. et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **Journal of General Virology**, v.79, p. 2171-2179, 1998.
- MELO, M. , Sanidade em suínos. **Revista suinocultura industrial**, ago. 2008. Disponível em :
<http://www.suinoculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?tipo_tabela=cet&id=34768&categoria=saude_animal> . Acesso em: ago. 2008
- MENGELING W.L. & CUTLIP R.C. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1393-1400, 1976.

- MENGELING W.L. Porcine Parvovirus. In: STRAW, B.E. *et al.* (Eds). **Diseases of Swine**. 8. th ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 119-124.
- MENGELING W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 2239-2248, 1972.
- MENGELING W.L. Prenatal infection following maternal exposure to porcine parvovirus on either the seventh or fourteenth day of gestation. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 43, p. 106., 1979.
- MENGELING, W.L., LAGER, K.M.; VORWALD, A.C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 199–210, 2000.
- MENGELING, W.L. et al. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. **Veterinary Microbiology**, n. 49, p.105-115, 1996.
- MENGELING, W.L.; PACKER, R.A. Pathogenesis of chronic hog cholera: host response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 3, p. 409-417, 1969.
- MÉRIEN, F.; ARTHARID, A.B. Leptospirosis a zoonotic under monitoring in New Caledonia and in the Pacific. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 200, n. 374, p. 45-50, 2005.
- METCALF, H.E. (Eds.) et al. **Handbook of zoonoses**. section A: bacterial, rickettsial, chlamydial, and mycotic. 2.ed. Raton: CRC Press, 1994. p. 9-39. 1994.
- MIKAMI, O. et al. Nonsuppurative myocarditis caused by porcine circovirus type 2 in a weak-born piglet. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 735-738, 2005.
- MINHO, A.P. et al. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in experimentally infected pigs. **Pesq Vet Bras**, v. 24, p. 199-202., 2004.
- MOENNIG, V.; PLAGEMANN, G.W. The pestivirus. **Advances in Virus Research**, v. 41, p. 53-97, 1992.
- MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. Parvoviridae. In: FLORES, E.F. (Ed). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM., 2007. p. 377-396.
- MORENO, A.M. et al. Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento em suínos no Brasil. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13., 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Embrapa Suínos e Aves., 2007. p. 249-252.
- MORENO, A.M. et al. Associação entre circovírus suíno tipo 2 e as doenças respiratórias no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM

- SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia, GO. **Resumos...** Goiânia: Embrapa Suínos e Aves., 2003. p.101-102..
- MORES, N. et al. Programa de erradicação da doença de aujeszky no estado de Santa Catarina, **Circular técnica**, Concórdia-SC, n. 44, nov. 2005.
- MORÉS, N. Pesquisador Embrapa Suínos e Aves. Dados Não Publicados [mensagem pessoal].
- MORIMOTO, T. et al. Isolation of Japanese encephalitis virus and hemagglutinating DNA virus from the brain of still born piglets. **National Institute of Animal Health**, v. 12, p. 127-136, 1972.
- MORRISON, R.B. Elimination of Aujeszky's disease virus from swine herds. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY, 13., 1994., Bangkok Thailand. **Proceedings...** Bangkok: IPVS, 1994. p. 5-10.
- MORTENSEN, S. et al. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 53, p. 83-101, 2002.
- MOTA, R.A.; BARROS, M.A.S.M.; OLIVEIRA, A.A.F. Impacto da brucelose suína na produtividade de rebanho na Região Metropolitana do Recife. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997, Gramado-RS. **Anais...** Gramado – RS, 1997. 308 p.
- MÜLLER T., et al. Eradication of Aujeszky's disease in Germany. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 50, p. 207-213, 2003.
- MURPHY, F.A. (Eds.) et al. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. 6 th. **Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Springer-Verlag, Wien, p.415-427. 1995.
- NAKAMINE, N. et al. Dual Infection with enterotoxigenic Escherichia coli and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus observed in weaning pigs that died suddenly. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 5, n. 60, p. 555-561, 1998.
- NAUWINCK, H.J., PENSAERT, M.B. Programmes for the eradication of Aujeszky's disease virus (pseudorabies virus) in the member states of the European Union. In: OIE SYMPOSIUM BANGKOK, 1994, Paris. **Annals...**, Paris, OIE, 1994, p. 55-65.
- NAWAGITGUL, P. et al. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 33–40., 2002.
- NECOCHEA, R.R. **Nuevo cuadro clinico de la colera porcina**. Mexico: Porcira, v. 33, p. 15, 1974.
- NEILL, S.D. et al. Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophila*. sp. **International**

Journal of Systematic Bacteriology, v. 35, p. 342-256, 1985.

NEUMANN, E.J. et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 227, n. 3, p. 385-392, 2005.

NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica**. São Paulo: Atheneu, 2003. 474 p.

NICOLETTI, P.; MURASCHI, T.F. Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problems cattle herds. **Am. J. Vet. Res.**, v. 27, p. 689-694, 1966.

NICOLETTI, P. Further evaluations of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 30, p. 1811-1816, 1969.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une protozoaire nouveau du gondii, Toxoplasma. **Archives de L'institut Pasteur de Tunis**, v. 2, p. 216-218, 1909.

NIELSEN, K.; DUNCAN, J.R. **Animal brucellosis**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 453 p.

NIELSEN, K. A brief review of diagnosis of bovine brucellosis by detection of antibody. **Arch. Med. Vet.**, v. 27, p. 9-17, 1995. N. Extraordinary.

O'CONNOR, B. et al. Multiple porcine circovirus 2 associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 551-553, 2001.

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE). **Código Zoosanitário Internacional**. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em: 11 jan. 2008

OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE). World Organisation for animal health. Leptospirosis. In: __. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines, 5th ed. Paris, 2004. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/mormes/mmanual/A_00043.htm>. Acesso em: 15 jan. 2008.

OHLINGER, V.F.; SCHMIDT, U.; PESH, S. Studies on pathogenic aspects of the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). INTERNATIONAL PIG.VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 16., 2000, LOCAL..**Proceedings ... 2000**.

OIE, world organisation for animal health. **Animal Disease Data**: diseases notifiable to the OIE. 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/engmaladies_en_classification_2008.htm>..Acesso em: 15 maio 2008.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. **Porcine reproductive and respiratory syndrome**. Disponível em: <http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00099.htm>. Acesso em: 15.fev 2010.

OIRSCHOT, J.T. VAN; TERPSTRA, C. A congenital persistent of fever infection. I Clinical and virological observations. **Vet. Microbiol.**, v. 2, p. 121-132, 1977.

- OLIVEIRA JUNIOR, A. R. de, **Parvovirose suína**. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/artig145.html>>. Acesso em: jul. 2008
- OLIVEIRA, S. J. et al. Isolation of *Arcobacter* (*Campylobacter*) *cryaerophia* from aborted pig fetuses. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 25, p. 171-172, 1995.
- OLIVEIRA, S. J. Nova ameaça à reprodução em suínos, além da leptospirose? **A Hora Veterinária**, v. 19, n. 111, p. 87-90, 1999.
- OLIVEIRA, S.J. et al. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 347-354, 1997.
- OPRIESSING T.; MENG X.; HALBUR P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal Veterinary of Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 591-6115, 2007.
- OPRIESSNIG, T. et al. Genomic and in vivo comparison of PCV2 – isolates from clinical PMWS cases with and without hallmark microscopic lesions of lymphoid depletion. **American Association of Swine Veterinarians**, p. 387-390, 2005.
- ORAVAINEN J. et al. Parvovirus antibodies in vaccinated gilts in field conditions - results with HI and ELISA tests. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 91-93, 2006.
- ORAVAINEN J. High porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 40, p. 57-61, 2005.
- ORAVEERAKUL K., CHOI C.S.; MOLITO, T.W. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 85-91, 1990.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. Código zoosanitário internacional, Enfermidades dos bovinos da lista B, Recomendações aplicáveis à enfermidades específicas. Disponível em: <http://http://www.oie.int/eng/en_index.htm>.. Acesso em: 15 fev. 2010.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis. Ginebra: OMS, 1986. 149 p. (Série de informes técnicos, 740).
- PARK, J. S. et al. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal Comparative Pathology**, v. 132, p. 139-144, 2005.
- PAUL P.S., MENGELING L.W.; PIRTLE E.C. Duration and biological half-life of passively acquired colostral antibodies to porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 1376-1379, 1982.
- PAUL P.S., MENGELING W.L.; BROWN T.T. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. **American Journal of**

Veterinary Research, v. 41, p. 1368-1371, 1980.

PENHA, A.M. Casos de Peste dos Porcos observados em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 5, p. 137-141, 1934.

PENNY, R.H.C. Older diseases, new arrivals: leptospirosis and brucellosis. **Pig Journal**, v. 33, n. 40, p. 30-40, 1994.

PENRITH, M. L.; SPENCER, B. T..Erysipelothrix rhusiopathiae. infections. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C..**Infections. disease of livestock** . 2.ed. Oxford: Oxford University, 2004. v.3, p.1908-1912.

PENSAERT, M.B. et al. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus type 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 175-183, 2004.

PEREIRA IC. **Soroprevalência de anticorpo para Toxoplasma gondii em suínos e características epidemiológicas de estabelecimentos de criação industrial e artesanal da região de Pelotas- RS**. 2005..Tese (Doutorado em Saúde Animal.) -Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2005.

PESCADOR, C.A. **Causas infecciosas de abortos e natimortalidade em suínos no sul do Brasil**. 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.,Porto Alegre.,2008.

PESCADOR C.A. et al. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,v. 27, p. 425-429, 2007.

PEZERICO, G.B. Isolamento de Erysipelotrix sp. de tonsilas de suínos em frigoríficos. 2004. 74 f. Tese (Doutorado em Saúde Animal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004.

PIG FORT. Fort Dodge Saúde animal Ltda. Mumificação fetal em suínos. **Informativo técnico Pigfort**, n. 4, abr. 2006. Disponível em: <http://www.fortdodge.com.br/fd/suinos/tecnolog/pigfort_4.pdf> . Acesso em: ago. 2008.

PIZZI H.L. **Toxoplasmosis**. Argentina: Rhône Poulenc Rorer Argentina, 1997. 91 p.

POESTER, F. P. Brucelose suína em rebanhos de alto valor zootécnico no Rio Grande do Sul. **Bol IPVDF**, Eldorado do Sul, v. 1, n. 100, p. 28-35. 1989.

POESTER, F. P.; GONÇALVES, V.S.P.; LAGE, A .P. Brucellosis in Brazil.**Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62. 2002.

PRESCOTT, J.F. et al. Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey. **Canadian Veterinary Journal**,. n. 32, p. 481-486, 1991.

- PRIETO, C. et al. Semen changes in boars after experimental infection with Porcine Epidemic Abortion and Respiratory Syndrome (PEARS) virus. In: INT. PIG VETERINARY SOCIETY CONGR, 13., 1994, Bangkok.. **Proceedings...** Bangkok (Thailand), 1994. p. 98.
- PRITCHARD, D.G. Some examples of the use of epidemiological techniques in the study of leptospirosis. In: ELLIS, W.A.; LITTLE, T.W.A. **The present state of leptospirosis diagnosis and control**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p. 123-148.
- PRITCHARD, D.G.; LITTLE, T.N.A.; WRATHALL, A.E.; Jones, P. Epidemiology of leptospirosis in relation to reproductive diseases in pigs. **Pig Vet. Soc. Proc.**, t v. 12, p. 65-82, 1985.
- QING L. et al. The recombinant nonstructural polyprotein NS1 of porcine parvovirus (PPV) as diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated pigs. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 175-190, 2006.
- QUIN, P.L et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512 p.
- RADOSTITIS, O.M. et al.. **Veterinary medicine**. 8.ed. London: Baillière Tindall, 2003, 1763 p.
- RAMOS, A.C.F.; LILENBAUM, W. Fatores que influenciam na ocorrência de aglutininas anti-Leptospira em suínos de criação tecnificada do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n.2, p. 20-29, 2002.
- RENDE, J. C. et al, Infecção experimental em suínos jovens com *Leptospira interrogans* sorovar wolffi: determinação de parâmetros bioquímicos. **Revista Ciência. Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2.,p. 458-463, mar./abr. 2007.
- RENTKO, V.T.; CLARK, N.; ROSS, L.A. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. **Journal Veterinary International Medical**., v. 6, p. 235-244, 1992.
- RISTOW L.E.. Monitoramento global da sanidade de granjas de suínos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUÍNA, 3., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2007. p.50-56.
- RISTOW, L.E. **Síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS)**: levantamento sorológico no Estado de Minas Gerais. 2000. 25 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária., Belo Horizonte, 2000.
- RISTOW, L.E.; LAGE, A.P. Levantamento sorológico da síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS) no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2001. v. 2, p 85
- RIVERA, E., SJÖLAND, L.; KARLSSON K.A. A solid phase fluorescent immunoassay

for the rapid detection of virus antigen or antibodies in fetuses infected with porcine parvovirus. **Archives of Virology**, v. 88, p. 19-26. 1986.

RODRIGUES, C.A.; GARDNER I.A.; CARPENTER, T.E. Financial analysis of pseudorabies control and eradication in swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 197, n. 10, p. 1316-1323, 1990.

RODRÍGUEZ, C.A.R., Soroprevalência de anticorpos anti-parvovirus suíno em suínos do município de Uruara, estado do Pará. **Arquivo do inst. Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 501-503, out./dez., 2003.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G. M. et al. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. **Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 50, p. 99-101, 2003.

RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M. et al. Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. **Vet. Rec.**, v. 146, p. 762-764, 2000.

RODRIGUEZARRIOJA, G.M. et al. Identification of porcine circovirus tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, v. 146, p. 40-43, 2000.

ROEHE, P.M.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. Parvovirose. In: SOBESTIANSKY J. & BARCELLOS D.E.S.N. (Eds). **Doenças de Suíno**, . Goiânia: Cânone Editorial, 2007. p. 286-293.

ROIC, B. et al. Immune complex-based vaccine for pig protection against parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, p. 17-23, 2006.

ROIZMAN, B.; PELLET, P.E. The Family Herpesviridae: a brief introduction. In: Knipe D.M., Howlet P.M. (ed). **Virology**. Lippincott Williams & Wilson: Philadelphia. 2001. p. 2381-2397

ROSE, G.W. Mechanism of tissue cell penetration by *Leptospira pomona*: active, penetration studies in vitro. **American Journal Veterinary Research**, n. 27, p. 1461-1471, 1966.

RUIZ, A.; CUEVAS, L.; NARANJO, J. Chile: Program to eradicate PRRS virus. In: ZIMMERMAN, J; YOON, K. J.. **PRRS Compendium**. 2 nd ed. National Pork Board: Iowa, U.S.A, 2003. p. 221-222..

RUIZ, V.L.A et al. Pesquisa da ocorrência de circovírus suíno e de possíveis co-infecções com parvovirus suíno através da reação em cadeia pela polimerase em oito estados brasileiros.. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, p. 484-486, 2004. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 17., São Paulo. Resumos..Resumo 233. 2004.

- SANCHEZ, R.E. et al. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p.169-176, 2001.
- SANFORD,S.E. PCV2 related reproductive failure in start-up herds. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIATION CONGRESS, 17., 2002, Ames, Iowa. **Proceedings**... Ames, Iowa.,2002. p.1-171.
- SANTA ROSA, C.A. et al. Leptospirosis in wildlife in Brazil: isolation of sorovars canicola, pyrogenes, and grippotyphosa. **International Journal of Zoonoses**, v. 7, p. 40-43, 1980.
- SARAZÁ, M.L.; SÁNCHEZ-VAZCAÍNO, J.M. Mecanismo de infeccion de lãs enfermidades animales. **Porcine**, n. 68, p. 13-26, 2002.
- SARMA, P.C.; SARMA, D.K. Localization of hog cholera virus antigen in tissues of infected piglets and rabbits by ELISA. **Indian Journal of the Virological.**,v. 12, n. 2, p. 105-108, 1996.
- SÁROCHA, C. Mestranda CAV-UDESC. Dados não publicados [mensagem pessoal].
- SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Anim. Health Res. Rev.**, v. 6, p. 119-142, 2005.
- SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 3, p. 109-124, 2002.
- SEGUNDO, R. ; CABRÉ, C.A. **Revista Pork Word**, p.36-39, maio/jun.,2006.
- SHIBATA, I.; MORI, M.; URUNO K. Experimental infection of maternally immune pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.12, n. 60.,p. 1285-1291, 1998.
- SHIMABUKURO, F.H. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiros pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. Botucatu. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em.Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Botucatu, 2003.
- SILVA J.M.L. Sobre um caso de Toxoplasmose espontânea em suínos. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária**, v. 12, p..425-428, 1959.
- SILVA, A. V. et al..*Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. Artigo de Revisão. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 1, 2010.
- SILVA, J.A. et al. Prevalência da brucelose em suínos de granjas tecnificadas do Estado de Minas Gerais. **Arq Bra. Med Vet e Zootec**, n. 36, v. 6, 1984.
- SILVEIRA C. Toxoplasmose - Levantamento bibliográfico de 1997-2000. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 64, p. 263-270, 2001.

- SOARES R.M. et al. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 191-198, 1999.
- SOBESTIANSKY J. & BARCELLOS D.E.S.N. (Eds). **Doenças de Suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, 770 p, 2007.
- SORENSEN, K.J. et al. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Microbiology**, n. 60, v. 2-4, p. 169-177, fev.1998.
- SOTO, F.R.M., et al, Leptospirose suína. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 379-395, out./dez, 2007.
- SOTO, F.R.M. et al. Detection of leptospires in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 582-586, 2006.
- SOUZA, A.S. Estudo da prevalência de *Leptospira interrogans* em reprodutores suínos em produção e aspectos epidemiológicos da infecção em Goiás. 2000. 74 f. Dissertação. (Mestrado em produção Animal) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiânia, Goiás, 2000.
- SPLENDRE A. Um nuovo protozoo parassita de' conigli – incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia Chericorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade de Ciencias**, v. 3, p. 109-112, 1908.
- STEGEMAN, A. et al. Evaluation of tests for detection of antibodies to aujeszky's disease (pseudorabies) vírus glycoprotein E in the target population. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 55, p. 107-111, 1997.
- STRECK, A.F. et al. Técnicas de diagnóstico imunológico em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. 125-130, 2008.
- STUDDERT, M.J. Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.70, n. 4, p. 121- 122, 1993.
- SUZUKI H. & FUJISAKI Y. Immunizing effects of inactivated porcine parvovirus vaccine on piglets. **Bulletin of the National Institute of Animal Health**, v. 72, p. 17-23, 1976.
- TABATA, R. et al. Cross neutralizing antibodies in hamsters vaccinated with leptospiral bacterins produced with three serovars of Serogroup Sejroe. **Braz.J. Microbiol.**, São Paulo, v. 33, p. 265–268. 2002.
- TAKAHASHI, T. et al. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 469-473, 1992.

- TENTER AM. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. *Tokai J Exp Clin Med*, v. 23, p. 291, 1999.. Disponível em: <<http://mj.med.utokai.ac.jp/pdf/230631.pdf>>. Acesso em: 6 jan. 2010
- TENTER, A.M. et al. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1217-1258, 2000.
- THIERMANN, A.B. Leptospirosis: current developments and trends. *J.Am, Vet. Med.Assoc.*, v. 184, n. 6, p. 722-725, 1984
- TIMONEY, J.F. et al. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. London: Comstock Publishing Associates. **Division of Cornell University Press**, p.135-144. 1988.
- TISCHER, I. et al. A very small porcine virus with a circular singlestranded DNA. *Nature*, v. 295, p. 64-66, 1982.
- TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, Abt.1 Originale A, v. 226, p. 153-167, 1974.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinaria**: uma introdução. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.
- TODD, D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol.*, v. 29, p. 373-394, 2000.
- TOO H.L. et al. Evaluation of a gel diffusion precipitin test for porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*, v. 60, p. 161-165, 1983.
- TSUTSUI, V.S. et al. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos do norte do Paraná. *Arch. Vet. Sci.*, v. 8, p. 27-34, 2003.
- VAN OIRSCHOT, J. T.; OEI, H. L. Comparison of two ELISAs for detecting antibodies to glycoprotein of Aujeszky's disease vírus. *The Veterinary Record*, London, v. 125, p. 63-64, jul. 1989.
- VAN OIRSCHOT, J.T. et al. The use of marker vaccines in the eradication of herpesviruses. *J. Biotech.*, v. 4, p. 75-81, 1996.
- VANNIER, P. Infectious causes of abortion in swine..**Reproduction in Domestic Animals** , v. 34, p. 367-376, 1999.
- VANNIER, P. Les formes actuelles de la peste sont plus insidieuses. L'Élevage **Porcine**, v.103, p. 22-24, 1981.
- VANNIER, P.; VEDEAU, F., ALLEMEERSCH, C. Eradication and control programmes against Aujeszky's disease (pseudorabies) in France. *Vet. Microbiol.*, v. 55, p. 167-173, 1997.

- VASCONCELOS, S. A, **Leptospirose animal**. CONPAVET 2004. Disponível em: <<http://www.spmv.org.br/conpavet2004/palestras%20-%20resumos/Resumo%20leptospirose%20Silvio.doc>>. Acesso em: 24 set. 2008.
- VIANA, F. C. Brucelose suína: prevalência em suínos abatidos em matadouros de Belo Horizonte e comparação da soroglutinação com outros métodos sorológicos. 1975. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1975.
- VIDOR T. Doença de Aujeszky etiopatogenia e controle. **Hora Vet.**, Porto Alegre., p. 47-52, 1988.
- VIDOTTO, O. et al. Toxoplasmose experimental em porcas gestantes. III. Alterações patológicas e reisolamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 795-814, 1987.
- VIDOTTO, O. et al. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina–PR. **Semina**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1990.
- VIEIRA, M. I. et al. Detecção de anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em suínos provenientes de granjas.com presença de felídeos domésticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., 2005, Fortaleza. **Anais...Fortaleza: Embrapa Suínos e Aves**, 2005. p.189-190.
- VITALE, M, et al. Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 1, p. 25-27, 2005.
- WABACHA, J.K. et al. An outbreak of urticarial form of swine erysipelas in a medium-scale piggery in Kiambu District, Kenya. **South African Veterinary Association**, v. 69, p. 61-63, 1998.
- WEST, K.W.; BYSTROM, J.; WOJNAROWICZ, C. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus-2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 530-532, 1999.
- WHITTEMORE, C. **Ciencia y práctica de la producción porcina**. 1 ed. Acrilia, 1993.
- WHYTE, P.B. et al. Protection of pregnant swine by vaccination against leptospira infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 2, n. 59, p. 41-45, 1982.
- WILHELM S. et al. Tissue distribution of two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. **Journal of Veterinary Medicine B.**, v. 52, p. 323–326, 2005.
- WILLIAM, T. C. Stillbirths, mummies, abortion, and early embryonic death. **Swine Reproduction.**, v. 8, n. 3, p. 623-639, 1992.

WOLF V.H.G. et al. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p..509-517, 2008.

WOOD, R. L.; HARRINGTON, R. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 1833-1840, 1978.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: STRAW, B.E..*et al.* **Disease of swine**. Ames: Iowa State University,.1999. p. 419-430.

WRATHALL A.E. et al. An inactivated, oil emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. **Research in Veterinary Science**, , v. 36, p. 136-143, 1984.

WRIGHT, P.; NIELSEN, K.H. Current and future serological methods. In: ADAMS, G. (Ed.). **Advances in brucellosis research**. Austin: Texas A&M University Press, College Station, 1990. p. 305-319.

ZIZLAVSKY, M. et al.; Significant role of PCV2 in reproductive disorders of sows. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 20., 2008, Durban, África do Sul. **Anais...** Durban: IPVS, 2008.

ANEXOS

ANEXO 1:

Questionário aplicado para selecionar granjas para o projeto Diagnóstico de Doenças Reprodutivas



Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SEG - Sistema Embrapa de Gestão

Índices reprodutivos da granja nos últimos 6 meses considerando objetivo e momento de interferência			
Problemas na gestação	Objetivo	Nível de interferência	Situação da granja
Retorno ao cio (Total)- %	10	15	
Retorno regular - %	6	8	
Retorno irregular - %	3	5	
Negativo (teste prenhez) %	3	5	
Aborto %	2	4	
Falsa gestação - %	1	3	
Natimorto - %	7	10	
Mumificado - %	3	5	

Responsável pelas informações: _____

ANEXO 2

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA IMUNOPEROXIDASE EM MONOCAMADA

- **PBS (SALINA TAMPÃO FOSFATO)**

a. Solução estoque: (Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4)

- Fosfato de sódio dibásico (NaHPO_4) $7\text{H}_2\text{O}$: 11,4 g
- Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $2\text{H}_2\text{O}$: 3,3 g
ou (NaH_2PO_4) H_2O : 2,54 g ou 2,92 g

*Manter a solução estoque refrigerada.

b. Solução trabalho: (Tampão fosfato salino 0,01 M pH 7,2-7,4)

- Solução estoque: 100 ml
- Cloreto de sódio: 8,5 g
- Água destilada: 900 ml

- **TVS (SOLUÇÃO TRIPSINA-VERSENE)**

- PBS: 97,5 ml
- Tripsina 2,5%: 2 ml (2,5 g tripsina em 100 ml de PBS)
- Versene 10%: 0,25 ml (10 g EDTA dissódico em 100 ml água destilada)

- **TBS**

- Tris base: 5,9 g
- NaCl: 8,7 g

Completar com 1 litro de água destilada (pH 7,6)

Para TBS 0,05% Tween, somente adicione 0,5 ml de Tween 20 a solução acima.

- **AEC**

a. Solução estoque

- AEC: 20 mg
- Dimetilformamida: 2,5 ml (manter a 4°C)

b. Solução trabalho

- Solução estoque: 0,1 ml
- Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0: 1,9 ml

c. Solução de H_2O_2 1%

Adicionar 20 μl de H_2O_2 1%, imediatamente antes do uso na solução trabalho.

- H_2O_2 30v: 100 μl
- H_2O destilada: 900 μl

- **TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,05 M pH 4**

- Acetato de sódio 0,05 M: 0,68 g
- Água destilada: 1000 ml

*para corrigir o pH até 4 usar ácido acético glacial 0,1M

ANEXO 3

SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TESTE DE HI PARA PARVOVIROSE SUINA

- **SOLUÇÃO DE HEPARINA SÓDICA 1000 U (para colheita de sangue de cobaio)**
 - Lique mine (heparina sódica) com 5.000 U: 0,25 mL
 - PBS-HI-PVS estéril: 1 mL
 - Armazenar (2-8 °C).
- **SOLUÇÃO M/15 DE $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ (PM: 138) (Fosfato de Sódio Monobásico):**
 - NaH_2PO_4 : 0,92 g
 - Água deionizada ou Milli-Q q.s.p.: 100 mL
 - Autoclavar 15 minutos a 121 °C
 - Armazenar em temperatura ambiente.

Solução M/15 de Na_2HPO_4 Anidro (PM: 142) (Fosfato de sódio dibásico):

- Na_2HPO_4 anidro: 0,95 g
- Água deionizada ou Milli-Q q.s.p. 100 mL.
- Autoclavar 15 minutos a 121°C.
- Armazenar em temperatura ambiente.

Preparo Tampão Salina com Fosfatos (PBS) (pH 7,2 \pm 0,2) para HI PVS:

- Na_2HPO_4 anidro: 1,3 g
- NaH_2PO_4 : 0,322 g
- NaCl: 8,5 g
- Água deionizada ou Milli-Q: q.s.p. 1000 mL.
- Ajustar pH em 7,2 (\pm 0,2) com uma solução M/15 de NaH_2PO_4 ou Na_2HPO_4 .
- Armazenar em temperatura ambiente.

Solução de soro albumina bovina (BSA) fração V 10%

- BSA: 10 g
- Água deionizada ou Milli-Q: q.s.p. 100 mL.
- Armazenar sob congelamento.

Solução de caolin 25% (pH 7,2 \pm 0,2; Reagen) em PBS-HI-PVS

- Caolin: 25 g
- PBS-HI-PVS: 100 mL
- Armazenar sob refrigeração (2 a 8 °C).

Solução de hipoclorito de sódio a 2%:

- cloro ativo 10 a 12%: 200 mL
- Água: 9,8 L.

Solução de hipoclorito de sódio a 1%:

- cloro ativo 10 a 12%: 20 mL
- 900 mL de água destilada.

Solução de álcool etílico hidratado 96% GL a 70%:

- Álcool anidro 96% GL: 729 mL
- Água destilada: qsp 1000 mL.

Solução de álcool etílico hidratado 92% GL a 70%:

- Álcool anidro 92% GL: 761 mL
- Água destilada: qsp 1000 mL.