

Obtenção de animais negativos para Circovírus suíno 2 oriundos de granjas positivas: estratégia de manejo

Obtention of Porcine circovirus 2-negative pigs from PCV2-positive herds: strategy of handling

Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro^{1*}, Fernando Gomes de Castro Júnior², Cintia Kiomi Mori¹, Taís Fukuta da Cruz³, Cintia Manzatto Baldin¹, Fábio Enrique Lemos Budiño², João Pessoa Araujo Júnior³, Leonardo José Richtzenhain¹

RESUMO: O objetivo do trabalho é descrever uma estratégia para a obtenção de animais negativos para o PCV2 oriundos de uma granja positiva para este vírus. Dezesesseis leitões foram obtidos de fêmeas que tiveram os títulos de IgG anti-PCV2 e o DNA viral testados durante a gestação. Esses leitões, aos sete e dez dias de idade, foram transferidos para a unidade de pesquisa. Durante o período de 7 e 10 aos 49 e 52 dias de idade, amostras de soro, suabes nasal e fecal foram coletadas, a cada sete dias. Após esse período, três animais permaneceram na unidade de pesquisa e foram acompanhados dos 49 aos 114 dias de idade, com coletas realizadas a cada 28 dias. Não houve diferença significativa ($p = 0,317$) de viremia entre marrãs ($n = 6$) e porcas ($n = 10$). Com relação aos níveis de IgG, observou-se diferença significativa ($p = 0,0213$) entre porcas e marrãs. Os leitões ($n = 16$), obtidos de duas fêmeas, foram transferidos para a unidade de pesquisa. Os animais entre 7 e 10 dias e aos 49 e 52 dias de idade apresentaram queda de IgG e ausência de IgM anti-PCV2; e as amostras de soro, suabe nasal e fecal foram negativas para o DNA de PCV2. Após os 49 dias, nos três animais mantidos isolados, a detecção de IgG, IgM e DNA para PCV2 permaneceu negativa. Concluindo, a estratégia de manejo utilizada permitiu obter suínos negativos para PCV2 oriundo de granjas positivas para o agente.

PALAVRAS-CHAVE: suínos; sanidade; enfermidade.

ABSTRACT: The present study describes a strategy to obtaining PCV2-negative animals from a PCV2-positive herd. Sixteen piglets were selected from females that had their IgG anti-PCV2 and viral circulation followed during pregnancy. These 7-days old piglets were transferred to the research unit. During the period from 7 to 49 days of age, serum, nasal and fecal swabs were collected every seven days. After this period, three animals remained in the research unit and were followed from 49 to 114 days of age, with samples taken each 28 days. No difference ($p = 0.317$) in viremia between gilts ($n = 6$) and sows ($n = 10$) were observed. Regarding the IgG levels, a significant difference ($p = 0.0213$) were found between gilts and sows. The piglets ($n = 16$), obtained from the two females, were transferred to the research unit. The animals between 7 and 10 and 49 and 52 days of age showed a decreased of the IgG title and absence of IgM; the serum and fecal and nasal swabs were negative for PCV2 DNA. After 49 days of age, the three remained animals negative for IgG, IgM and viral DNA for PCV2. In conclusion, the strategy of handling used herein allowed the obtention of PCV-2 negative pigs from PCV2-positive herds.

KEYWORDS: pigs; health; illness

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

²Instituto de Zootecnia (IZ) – Nova Odessa (SP), Brasil.

³Instituto de Biociências; Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Botucatu (SP), Brasil.

*Autor correspondente: almarnie@yahoo.com

Recebido em: 03/08/2012. Aceito em: 24/10/2013

INTRODUÇÃO

O controle de enfermidades representa um grande desafio para a suinocultura, tornando-se ainda maior nas últimas décadas, devido à disseminação de doenças associadas ao Circovírus suíno, a *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD), desencadeado pelo Circovírus suíno 2 (*Porcine circovirus 2* – PCV2), que, além de resultar na queda do desempenho dos animais, aumenta a susceptibilidade a agentes secundários (OPRIESSNIG *et al.*, 2007; GRAU-ROMA *et al.*, 2011).

Na década de 1950, essa preocupação levou vários produtores nos Estados Unidos a adotarem procedimentos para o estabelecimento de granjas com animais livres de patógenos específicos (*specific pathogen free* – SPF). Esses animais têm os micro-organismos presentes no ambiente, sendo estes livres de patógenos específicos para a espécie, porém, que se encontram ausentes no ambiente em que os animais estão sendo criados (MAJEROWICZ, 2005).

O estabelecimento de granjas SPF foi extenso nas décadas de 1960 e 1970. Na Europa, esse procedimento foi usado em um programa de repopulação, quando se adotou a estratégia de criação de uma granja primária com animais obtidos por histerectomia, histerotomia ou cesárea, utilizadas para repovoar as novas granjas, denominadas secundárias (CAMERON, 2000).

Com o intuito de evitar o procedimento cirúrgico, foi desenvolvido o sistema conhecido como desmame precoce segregado medicado (*medicated early weaning* – MEW). A estratégia consiste em separar grupos pequenos de fêmeas suínas, as quais são vacinadas entre quatro e seis semanas de prenhez em unidades de gestação distante da granja. Matrizes e leitões são medicados com altas doses de antibiótico durante a permanência nessa unidade de parição. Os leitões são desmamados aos cinco dias de idade e transferidos para uma unidade isolada da creche. Depois, são levados para a unidade de crescimento para, então, comporem a granja a ser repovoada (ALEXANDER, 1982). Esse sistema foi utilizado com sucesso para eliminar *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Serpulina hyodysenteriae* e os vírus da gastroenterite transmissível, da diarreia epidêmica suína, da pseudorraiva e da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos.

HARRIS; ALEXANDER (1999) modificaram o MEW, desenvolvendo o sistema conhecido como desmame precoce segregado medicado modificado (*modified medicated early weaning* - MMEW). Com ele, a parição era realizada na própria granja, após vacinação contra os seus patógenos, não sendo medicadas as fêmeas. Os leitões recebiam medicação durante os períodos de lactação e desmame, que ocorriam entre 8 e 28 dias de idade. Nesse momento, eram transferidos para a unidade isolada de creche e crescimento para, então, comporem a nova granja a ser repovoada.

Independente do sistema utilizado, um dos principais impactos do estabelecimento dessas granjas com alto *status* sanitário foi a utilização dos animais nas pesquisas de infecção experimental direcionadas para o estudo da dinâmica de vários agentes, dentre eles o PCV2.

O PCV2 é responsável pela circovirose suína (PCVAD), que engloba várias condições clínicas: infecção subclínica, infecção sistêmica, pneumonia, enterite e distúrbios reprodutivos, e síndrome de dermatite e nefropatia. O impacto na suinocultura é grande, uma vez que afeta o desempenho dos animais e, conseqüentemente, a produtividade da granja (OPRIESSNIG *et al.*, 2007).

Esse agente, descrito pela primeira vez em 1992 no Canadá, encontra-se hoje disseminado nas granjas de suínos dos principais países produtores, dentre eles o Brasil. O impacto na produtividade está ligado principalmente ao aumento do índice da conversão alimentar e dos problemas respiratórios associados ao PCV2 e à queda no desempenho (OPRIESSNIG *et al.*, 2007; GRAU-ROMA *et al.*, 2011).

O conhecimento atual acerca da complexa patogenia do PCV2 permite ter uma ideia do impacto da enfermidade nos rebanhos brasileiros. No entanto, um conhecimento mais amplo sobre a patogenia dos isolados brasileiros de PCV2 depende da disponibilidade de animais negativos para o agente. Visando atender a essa necessidade, o presente estudo descreve uma estratégia para a obtenção de animais negativos para PCV2 oriundos de uma granja positiva para o agente.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado conforme os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob protocolo nº 1185/2007 conforme consta em declaração emitida pelo Presidente da Comissão de Bioética em 20/09/2007.

Manejo das fêmeas

Nove marrãs e nove matrizes de uma granja positiva para PCV2, que mantinha um esquema de vacinação de leitões para o agente, foram separadas. As fêmeas foram inseminadas com sêmen de machos da própria granja. Aos 42 dias de gestação, 16 de 18 fêmeas não retornaram ao cio e receberam uma dose reforço de vacina para PCV2. Aos 57 dias de gestação foi coletado sangue delas.

Manejo dos leitões

Dezesseis leitões, sendo 3 fêmeas e 13 machos, foram selecionados das 16 fêmeas da granja. Essa seleção baseou-se no *status*

imunológico e virêmico das porcas aos 57 dias de gestação, sendo os leitões provenientes de 2 porcas com alto título de anticorpos e ausência de DNA de PCV2 no soro. Durante a permanência na granja (entre sete e dez dias de idade), os leitões receberam o manejo padrão da propriedade. Posteriormente, aos setes e 10 dias de idade, esses animais foram transferidos para a unidade de suinocultura localizada no Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, São Paulo, onde permaneceram por 6 semanas (49 e 52 dias de idade). O barracão, todo de alvenaria com janelas e uma única porta, permitindo o controle de trânsito, foi mantido sem abrigar suínos por mais de dois meses antes de receber os animais. Ele foi desinfetado com Virkon-S® (Du Pont) e uma solução do produto foi mantida no pé de lúvio durante a permanência dos animais. Os suínos receberam banho de água morna com antisséptico de amplo espectro para degermação da pele a base de Polivinilpirrolidona Iodo (Riodeine Degermante - Rioquímica®). Posteriormente, foram secos com papel toalha e identificados com brincos; cada um deles recebeu 0,1 mL/kg via subcutânea de cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina® LA - Pfizer).

Os animais foram alocados aleatoriamente em gaiolas suspensas com bebedouro tipo chupeta, com acesso a água clorada, e comedouros individuais, distribuídos pelo barracão, com ventilação artificial sem filtro. As gaiolas suspensas apresentavam dimensões de 2,0 x 1,5 m, suspensas a 0,6 m de altura, com piso ripado e aquecimento com campânula. Os animais foram inspecionados diariamente para que fossem avaliadas as suas condições físicas. A ração, adequada para atender às exigências nutricionais propostas pelo *Nutrition Resource Center* (NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION, 1998), foi oferecida três vezes ao dia e água *ad libitum*. Diariamente foi realizada a desinfecção com Virkon-S® (Du Pont), e a cada três dias realizou-se a pulverização do galpão com Virkon-S® acrescido de Colosso Pulverização® (Ouro Fino) para controle de insetos.

Durante o período, dos 7 aos 49 dias de idade, os animais apresentaram desenvolvimento adequado para a fase e não houve óbito. Após isso, 13 de 16 animais foram transferidos para outra unidade e 3 (fêmeas) permaneceram no barracão de alvenaria fechado. Estas 3 foram acompanhadas até 114 dias de idade, quando aumentou o intervalo das coletas das amostras para a cada 28 dias.

Amostras

A coleta de sangue, semanalmente ou a cada 28 dias, foi realizada manualmente, com os animais sedados (Destress®), por meio da punção da veia jugular e/ou veia cava cranial. O sangue armazenado em tubo de polipropileno para retração do coágulo foi centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos a 20°C, e o soro armazenado para posterior realização das técnicas laboratoriais.

Amostras de fezes e secreções nasais foram coletadas, semanalmente ou a cada 28 dias, utilizando suabes com ponta

de *rayon*, friccionado na ampola retal e nas mucosas nasais, respectivamente. Estes foram colocados em tubo contendo meio de Stuart e armazenados a 4°C. No laboratório, os suabes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) e armazenados a -20°C até o momento de sua utilização.

Técnicas laboratoriais

Os títulos de IgG e IgM anti-PCV2 dos leitões de 7 a 49 dias de idade e dos 3 animais que foram acompanhados até 114 dias de idade foram quantificados pelo teste de ELISA (INGEZIM Circovirus IgG/IgM, Ingenasa, Espanha), conforme instruções do fabricante.

O título de IgG anti-PCV2, das 16 fêmeas da granja, foi quantificado pelo ELISA indireto com anticorpo de captura para PCV2, com os resultados expressos pelo índice de ELISA, conforme descrito por CRUZ (2010).

A extração de DNA do soro, das fezes e secreção nasal foram realizadas utilizando o método proteinase K e fenol:clorofórmio. A Polymerase Chain Reaction (PCR) qualitativa para detecção de DNA de PCV2 nas amostras coletadas das fêmeas da granja (9 matrizes e 9 marrãs) e dos 16 leitões foi realizada com o par de *primers* Fa (5' ATT ACC AGC AAT CAG ACC CCG T 3')/ Ra2 (5' CAA CCC TTC TCC TAC CAC TCC 3'), que amplificou um fragmento de 476 pb (CASTRO *et al.*, 2007).

A PCR quantitativa realizada nas amostras de soro coletadas das fêmeas da granja (nove matrizes e nove marrãs) foi realizada segundo o protocolo descrito por LADEKJAER-MIKKELSEN *et al.* (2002) para a ORF1 do Circovírus suíno 2 com o sistema de detecção SYBR Green I. Os resultados quantitativos foram expressos em cópias de DNA/mL de soro.

Uma PCR qualitativa direcionada para o gene da β -actina foi realizada em todas as amostras testadas pela PCR (qualitativa e quantitativa) com o objetivo de excluir os falsos negativos. Para isso foi utilizado o par de *primers* AC1 (5' TGA GAC CTT CAA CAC GCC 3')/AC2 (5' ATC TGC TGG AAG GTG GAC 3'), que amplificou um fragmento de 850 pb (HU1 *et al.*, 2004).

Análise dos dados

O teste de Mann Whitney não paramétrico foi aplicado para determinar a significância das diferenças ($p < 0,05$) da quantidade de DNA da PCRq e nível de IgG no soro de porcas e marrãs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de DNA de PCV2 e título de IgG no soro das porcas e marrãs foram propositalmente baseadas em resultado pontual, utilizando uma única coleta e dificultando a

detecção de animais negativos. A quantidade de DNA de PCV2 variou de 1 a 380 cópias de DNA de PCV2/mL de soro, sendo os valores mais baixos observados em duas matrizes. Apesar do número pequeno de amostras e a alta variação entre os dados, não houve diferença significativa ($p = 0,3517$) de viremia entre marrãs e porcas (Fig. 1). Com relação aos níveis de IgG, observou-se diferença significativa ($p = 0,0213$) entre marrãs e matrizes, com alta variação (0,714 a 0,959), sendo os valores mais baixos observados em duas matrizes (0,714 e 0,753) (Fig. 1).

A coleta de sangue das fêmeas aos 57 dias de gestação baseou-se no trabalho realizado por PENSART *et al.* (2004). Os autores inocularam fêmeas negativas para PCV2 e

detectaram o DNA do agente a partir do 21º dia pós a infecção (dpi) até o 63º dpi. Portanto, no presente estudo, a aplicação da PCR quantitativa permitiu identificar as porcas que estavam em viremia. Esses dados são importantes, pois, segundo MADSON *et al.* (2009), a viremia é responsável pela transmissão vertical. No presente trabalho não se observou diferença de viremia entre fêmeas e marrãs, no entanto, os níveis de anticorpos foram, significativamente, maiores em marrãs. Os resultados diferem dos descritos por FRAILE *et al.* (2009), que afirmaram que o risco dos leitões se infectarem com PCV2 durante a gestação em fêmeas com baixo título de IgG é 1,85 vez maior em relação a uma com alto título, sendo ainda maior (2,54 vezes)

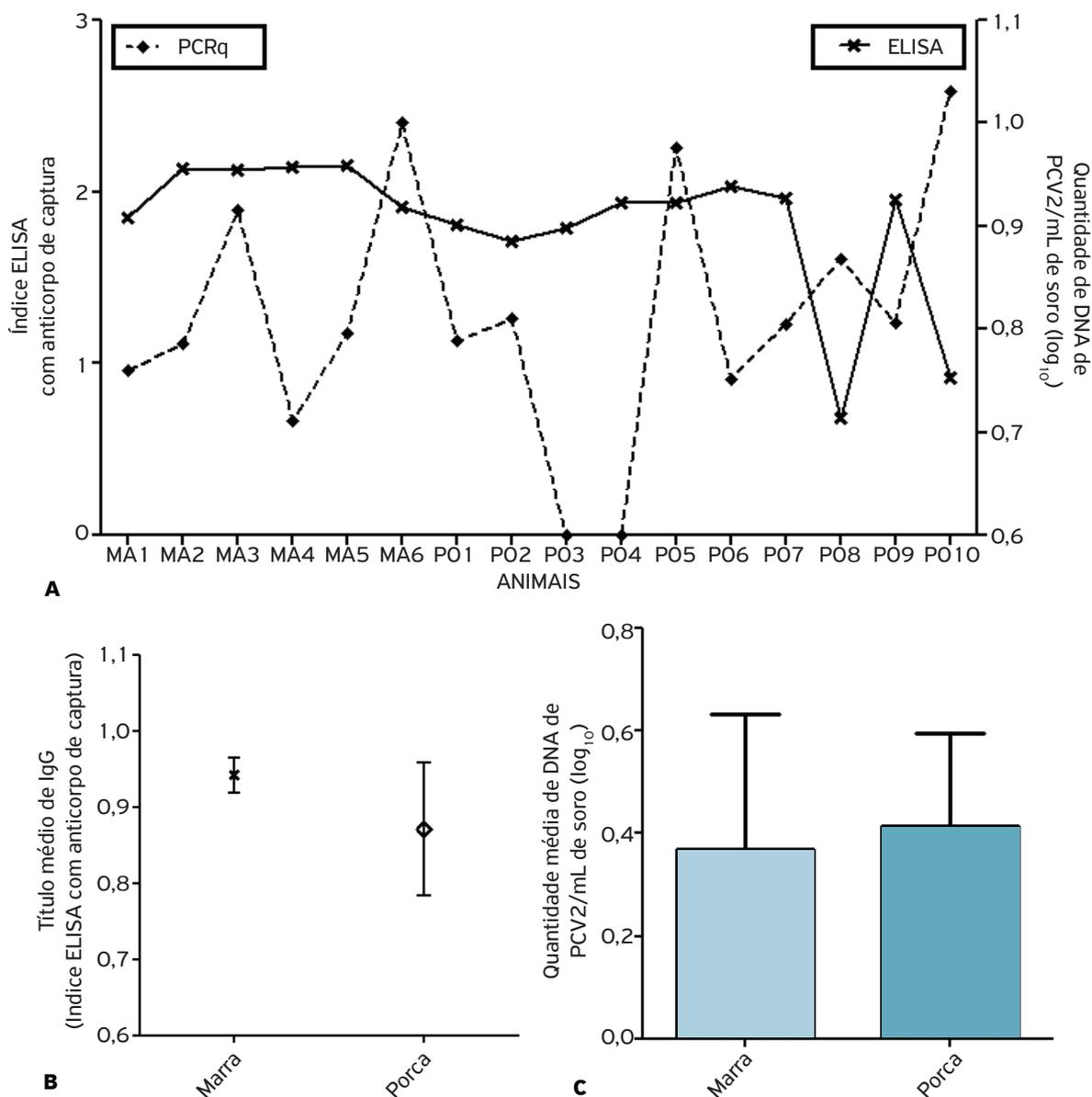


Figura 1. Dados referentes ao *status* imunológico e virêmico das 16 fêmeas (6 marrãs e 10 porcas) selecionadas na granja. (A) Leitura do índice ELISA com anticorpo de captura para IgG anti-PCV2 e quantidade de DNA/mL de soro de PCV2 (\log_{10}) das 16 fêmeas selecionadas na propriedade, (B) Média da leitura do índice ELISA com anticorpo de captura para IgG anti-PCV2 e o desvio padrão, (C) Média da quantidade de DNA de PCV2/mL e desvio padrão.

em marrãs. A diferença pode estar relacionada à variação da amostragem (uma *versus* várias granjas) e ao manejo sanitário direcionado ao controle de PCV2 (vacinação de marrãs *versus* não vacinação). Ressalta-se que na granja onde as amostras foram coletadas era mantido esquema de vacinação em marrãs e, além disso, uma das estratégias utilizadas foi revacinar porcas e marrãs aos 42 dias de gestação. Isso também pode explicar a baixa variação entre os dados (ELISA) das marrãs quando comparadas com as porcas (Fig. 1).

Os leitões das duas porcas, durante a permanência na granja, tiveram manejo separado dentro do barracão, sendo sempre as primeiras a serem manejadas. O objetivo foi diminuir a transmissão horizontal de PCV2. Entre 7 e 10 dias de idade, os 16 leitões, obtidos das 2 fêmeas (PO3 e PO4) (Fig. 1), foram transferidos para a unidade de pesquisa. Os animais entre 7 e 10 dias e aos 49 e 52 dias de idade foram acompanhados para verificar a presença de DNA viral e os níveis de imunoglobulinas (IgG e IgM). O título de IgG anti-PCV2 dos 7 aos 49 dias de idade decaíram e os animais permaneceram negativos para IgM no mesmo período (Fig. 2).

Um dos fatores que podem ter influenciado os altos níveis de anticorpos anti-PCV2 nos leitões foi o manejo sanitário da granja de onde os animais foram obtidos. Segundo GERBER *et al.* (2011), há diferença significativa no título de anticorpos neutralizantes e carga viral no soro de porcas vacinadas e não vacinadas. Além disso, os autores observaram que a carga viral no colostro e leite das fêmeas vacinadas foi significativamente menor, quando comparadas às não vacinadas. MADSON; OPRIESSNIG (2011) relataram que a presença de anticorpos anti-PCV2 homólogos desencadeiam proteção parcial dos leitões durante a gestação e que a vacinação das fêmeas reduz a viremia e aumenta a ingestão de anticorpos anti-PCV2 pelos leitões por meio do colostro nos primeiros dias de vida.

Durante o período, as amostras de soro, suabe nasal e fecal dos 16 leitões, coletados semanalmente, foram testadas por PCR para detecção de PCV2. Todas as amostras foram negativas e testadas para β -actina, com resultado positivo, o que descarta a possibilidade de falso negativo como resultado da não amplificação do PCV2 por fatores de inibição.

Os animais aos sete e dez dias de idade, após degermação, foram alocados em baias previamente desinfetadas. A manutenção de ausência e a prevenção da entrada de PCV2 durante o período foram essenciais para que os animais não se submetessem a desafios. Os resultados negativos da PCR no soro e nas secreções (nasal e fecal) demonstraram ausência de infecção dos leitões durante a gestação e, também, nos primeiros sete e dez dias de vida, apesar da permanência num ambiente não controlado.

A transmissão vertical foi relatada por vários autores (MAGAR *et al.*, 2000; O'CONNOR *et al.*, 2001; FARNHAM *et al.*, 2003), portanto, a ausência de detecção de DNA viral nos primeiros dias exclui a transmissão transplacentária.

Após os 49 dias, 3 animais permaneceram na instalação isolada e foram acompanhados até 114 dias de idade. Durante o período, os níveis de IgG e IgM permaneceram negativos pelo teste de ELISA comercial. A ausência de detecção do DNA viral do soro e suabes (nasal e fecal) confirmaram a ausência de circulação de PCV2. Esses animais foram acompanhados para a verificação da ausência de conversão tardia. Em infecção natural, a detecção de DNA de PCV2 ocorre a partir do 28º dia, persistindo até 209º dia de vida (PATTERSON *et al.*, 2011). No entanto, varia conforme os níveis de anticorpos da imunidade passiva, podendo ser detectada no soro a partir 72º dia de vida.

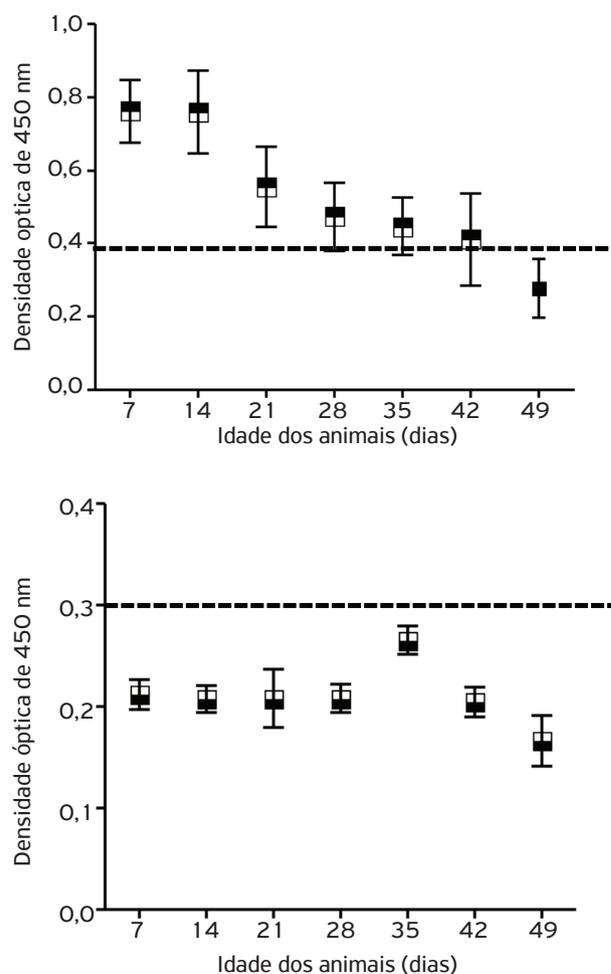


Figura 2. Dados referentes ao *status* imunológico dos 16 leitões dos 7 aos 49 dias de idade baseados na leitura do índice ELISA (INGEZIM Circovirus IgG/IgM, Ingenasa, Espanha). (A) Valores (médio \pm desvio padrão) da densidade óptica (DO) (450 nm) para IgG anti-PCV2, (B) Valores (médio \pm desvio padrão) da DO (450 nm) para IgM anti-PCV2. A linha tracejada corresponde ao valor médio da DO (450 nm) de corte obtida nas leituras realizadas no período.

Segundo OPRIESSNIG *et al.* (2004), leitões que apresentaram baixos títulos de anticorpos anti-PCV2 adquiridos passivamente foram negativos com aproximadamente cinco semanas de vida, enquanto os com imunidade passiva moderada e alta, obtida durante a lactação, apresentaram queda a partir da 8ª e 11ª semana de vida, respectivamente. GERBER *et al.* (2009) descreveram uma correlação entre a queda da imunidade passiva e a soroconversão em leitões. Animais que apresentaram queda nos títulos de anticorpos entre a 4ª e 6ª semana de idade resultaram em uma soroconversão tardia, que ocorreu após a 10ª semana de idade. Portanto, a ausência de viremia e soroconversão desses animais aos 114 dias de idade (> 16 semanas) demonstrou que o manejo realizado impediu a infecção dos animais pelo PCV2.

Em uma revisão realizada por TOMÁS *et al.* (2008), descrevendo os principais resultados obtidos nos ensaios de infecção experimental com PCV2 até 2008, os autores demonstraram que 61% (61/100) dos ensaios utilizaram animais oriundos de granjas SPF. Deste total, 65,6% (40/61) dos animais estavam com PCV2-IgG-negativos no momento da inoculação. A negatividade no momento da infecção é fundamental para o estudo da dinâmica de doença. Portanto,

a obtenção de animais negativos para PCV2 no presente trabalho torna-se importante para o avanço das pesquisas com esse agente. Ressalta-se que tal procedimento tem como objetivo principal atender às necessidades de pesquisa, uma vez que há vacinas que controlam o desencadeamento da doença no campo.

CONCLUSÃO

O resultado do presente trabalho demonstrou que a estratégia de manejo utilizada permitiu obter suínos negativos para PCV2 oriundos de granjas positivas para o agente.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – nº 2007/57115-3) pelo apoio financeiro e à granja, por ter permitido a realização do manejo.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, T.J.L. The establishment of new herds by medicated early weaning. *Proceedings of the International Pig Veterinary Society*, v.7, p.64, 1982.
- CAMERON, R.D.A. *A review of the industrialization of pig production worldwide with particular reference to the Asian region - Focus is on clarifying the animal and human health risks and reviewing the Area Wide Integration concept of specialized crop and livestock activities Animal Health and Area-wide Integration*. Brisbane, Austrália, 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/aq/info/resources/en/publications/agapubs/awi_concept_pig_product.pdf>. Acesso em: 04 mar. 2012.
- CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). *Archives of Virology*, v. 152, n.8, p.1435-1445, 2007.
- CRUZ, T.F. *Padronização e aplicação da técnica de ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay") indireto com anticorpo de captura para a detecção de anticorpos contra o circovírus suíno tipo 2*. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2010.
- FARNHAM, M.W.; CHOI, Y.K.; GOYAL, S.M.; JOO, H.S. Isolation and characterization of porcine circovirus type-2 from sera of stillborn fetuses. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.67, n.2, p.108-113, 2003.
- FRAILE, L.; CALSAMIGLIA, M.; MATEU, E.; ESPINAL, A.; CUXART, A.; SEMINATI, C.; MARTÍN, M.; DOMINGO, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.73, n.4, p.308-312, 2009.
- GERBER, P.F.; GALINARI, G.C.; SILVA, M.X.; CAMPOS, F.S.; REIS, A.C.; LOBATO, Z.I. Distribution of antibodies against porcine circovirus type-2 (PCV2) in single site and multi-site farrow-to-finish farms in Brazil. *Research in Veterinary Science*, v.87, n.3, p.488-491, 2009.
- GERBER, P.F.; GARROCHO, F.M.; LANA, A.M.; LOBATO, Z.I. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Veterinary Journal*, v.188, n.2, p.240-242, 2011.
- GRAU-ROMA, L.; FRAILE, L.; SEGALÉS, J. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Veterinary Journal*, v.187, n.1, p.23-32, 2011.
- HARRIS, D.L.; ALEXANDER, T.J.L. Methods of disease control. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. *Diseases of swine*. 8th.ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 1077-1110.

- HUI, R.K.; ZENG, F.; CHAN, C.M.; YUEN, K.Y.; PEIRIS, J.S.; LEUNG, F.C. Reverse transcriptase PCR diagnostic assay for the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.5, p.1994-1999, 2004.
- LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, v.89, n.2-3, p.97-114, 2002.
- MADSON, D.M.; OPRIESSNIG, T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Animal Health Research Reviews*, v.12, n.1, p.47-65, 2011.
- MADSON, D.M.; PATTERSON, A.R.; RAMAMOORTHY, S.; PAL, N.; MENG, X.J.; OPRIESSNIG, T. Effect of natural or vaccine-induced porcine circovirus type 2 (PCV2) immunity on fetal infection after artificial insemination with PCV2 spiked semen. *Theriogenology*, v.72, n.6, p.747-754, 2009.
- MAGAR, R.; MÜLLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.64, n.3, p.184-186, 2000.
- MAJEROWICZ, J. *Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do Laboratório de Experimentação Animal (Laean) de Bio-Manguinhos*. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos em parceria com Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION. *Nutrient Requirement of Swine*. Washington D.C., 1998. 189p.
- O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUND, M.; CLARK, E.G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Canadian Veterinary Journal*, v.42, n.7, p.551-553, 2001.
- OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation*, v.19, n.6, p.591-615, 2007.
- OPRIESSNIG, T.; YU, S.; THACKER, E.; HALBUR, P.G. Derivation of porcine circovirus type 2-negative pigs from positive breeding herds. *Journal of Swine Health and Production*, v.12, p.186-191, 2004.
- PATTERSON, A.R.; MADSON, D.M.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T. Shedding and infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) after natural exposure. *Veterinary Microbiology*, v.149, n.1-2, p.225-229, 2011.
- PENSAERT, M.B.; SANCHEZ, R.E.Jr.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.M.; NAUWYNCK, H.J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Veterinary Microbiology*, v.98, n.2, p.175-183, 2004.
- TOMÁS, A.; FERNANDES, L.T.; VALERO, O.; SEGALÉS, J. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Veterinary Microbiology*, v.132, n.3-4, p.260-273, 2008.