



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Avaliação de um programa de vacinação de circovirose suína numa exploração
de produção intensiva**

Lúcia Maria da Costa Gomes Rodrigues Fernandes

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira
Martins

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Dr. José Júlio Alfaro Cardoso Carreira da
Cunha

ORIENTADOR

Dr. José Júlio Alfaro Cardoso Carreira da
Cunha

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**Avaliação de um programa de vacinação de circovirose suína numa exploração
de produção intensiva**

Lúcia Maria da Costa Gomes Rodrigues Fernandes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira
Martins

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Dr. José Júlio Alfaro Cardoso Carreira
da Cunha

ORIENTADOR

Dr. José Júlio Alfaro Cardoso Carreira da
Cunha

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

2017
LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Alfaro Cardoso, pelo interesse demonstrado na orientação desta dissertação e pela partilha do seu conhecimento.

Ao meu co-orientador Prof. Doutor Fernando Boinas pela sua pronta disponibilidade e pelas suas valiosas sugestões.

Ao Prof. Doutor Carlos Martins o meu muito obrigada por me ter ajudado num momento em que estava desorientada, tendo sido uma ajuda muito importante na finalização da minha tese. Estou-lhe muito grata!

Ao Aldo Dias pela oportunidade de poder estagiar na sua exploração e pelas condições que proporcionou para que este trabalho fosse possível.

Não posso deixar de agradecer aos funcionários da exploração, ao João e à Cidália, pela ajuda e dedicação que deram ao meu trabalho prático.

Agradeço com saudade ao meu pai Lourenço, por tudo há minha mãe Elvira e aos meus irmãos Fernando e Eduardo.

Por fim, agradeço ao marido Luis, pela paciência, força e pela presença incansável com que me apoiou ao longo do período de elaboração desta tese, e á minha filha Catarina.

Avaliação de um programa de vacinação de Circovirose suína numa exploração de produção intensiva

RESUMO

O circovírus porcino tipo 2 (PCV2), pertence à família *Circoviridae* e está difundido por todo o mundo, sendo considerado um importante agente patogénico emergente associado a diversas doenças nos suínos, coletivamente agrupadas como doenças do circovirus porcino (PCVD). A síndrome multissistémica de emagrecimento pós-desmame (PMWS) é a mais comum e é a responsável pelas maiores perdas económicas causadas por PCVD na indústria de suinicultura.

Vários estudos serológicos demonstram a presença de anticorpos anti-PCV2 de forma global na população suína mundial, atingindo até 100% dos indivíduos analisados, facto compatível com o carácter ubiquitário do vírus. No entanto, a prevalência de animais com sinais clínicos é geralmente baixa, variando entre 4 e 30%. Neste sentido questiona-se se a vacinação contra o PCV2, se torna necessária quando existe uma boa implementação de regras na prevenção e controlo dos fatores que influenciam a progressão da doença nomeadamente: as deficiências de biossegurança, a presença de coinfeções e o estatuto imunitário e infeccioso das reprodutoras.

O presente trabalho foi realizado numa exploração suinícola em que a maioria dos animais analisados eram sero-positivos para PCV2, sem sinais clínicos da infeção, nem de síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRS) e onde não se tinha, até à data, utilizado qualquer vacina contra o PCV2. Neste contexto, realizou-se um estudo comparativo de diferentes parâmetros de produção após a aplicação de vacina inativada contra PCV2.

A resposta produtiva de grupos de animais vacinados e não vacinados foi obtida pelo peso total (PT), peso médio (PM) e ganho médio diário (GMD) dos animais, tendo-se ainda registado a mortalidade nos dois grupos em estudo.

O estudo foi realizado em 336 animais divididos em 10 lotes, dos quais 5 (total de 169 leitões) foram vacinados e 5 não vacinados (total de 167 leitões). Ao desmame foi administrada uma vacina inativada (CIRCOVAC®). Os animais foram pesados por três vezes: no momento da aplicação da vacina (28 dias de idade), à saída da unidade de recria (~70 dias de idade) e à saída da engorda (150-180 dias de idade).

Pela análise dos resultados obtidos constatou-se que os parâmetros produtivos não variaram significativamente entre os animais vacinados e não vacinados.

Através da análise para o apuramento de eventuais diferenças relativas à produtividade entre os grupos de ensaio nesta exploração, e atendendo às suas condições relativas a medidas gerais de manejo e biossegurança, verificou-se ainda que existe uma relação de baixo lucro relativamente ao custo-benefício da vacinação de PCV2 e que, tanto animais vacinados como não vacinados, apresentam um crescimento equivalente.

Palavras-Chaves: Circovirose, PCV2, Ganho médio diário, leitões, vacinação, económico.

ABSTRACT

The porcine circovirus type 2 (PCV2), belongs to the family Circoviridae and is widespread worldwide, being considered an important emerging pathogen associated with several diseases in pigs, also known as porcine circovirus (PCVD) diseases. Post-weaning weight loss syndrome multisystemic (PMWS) is the most common and is responsible for the greatest economic losses caused by PCVD in the pig industry.

Several serological studies demonstrate the presence of anti-PCV2 antibodies globally in the world's swine population, reaching up to 100% of the individuals analyzed, which is compatible with the ubiquitous nature of the virus. However, the prevalence of animals with clinical signs is generally low, ranging from 4 to 30%. In this sense it is questioned if vaccination against PCV2 becomes necessary when there is a good implementation of rules in the prevention and control of the factors that influence the progression of the disease namely: biosafety deficiencies, the presence of coinfections and the immunological and infectious status of the breeding grounds.

The present study was carried out on a pig farm in which the majority of the animals analyzed were seropositive for PCV2, showed no clinical signs of infection with this virus, nor of reproductive and respiratory syndrome (PRRS), and to date, any PCV2, vaccine was used. In

this context a comparative study of different production parameters was carried out after the application of inactivated vaccine against PCV2.

The productive response of groups of vaccinated and unvaccinated animals was obtained by the total weight (PT), mean weight (PM) and mean daily gain (ADG) of the animals. Mortality was also observed in the two groups under study.

The study was conducted in 336 animals divided into 10 lots, of which 5 (total of 169 piglets) were vaccinated and 5 non-vaccinated (total of 167 piglets). At weaning, an inactivated vaccine (CIRCOVAC®) was administered. The animals were weighed three times: at the time of application of the vaccine (28 days of age), at the exit of the rearing unit (~70 days of age) and

at the exit of fattening (150-180 days of age).

By the analysis of the obtained results it was verified that the productive parameters did not vary significantly between vaccinated and non vaccinated animals.

By examining any differences in productivity between the test groups on this holding and taking into account their conditions for general management and biosafety measures, it was found that there is a low-cost-benefit ratio of PCV2 vaccination and that both vaccinated and non vaccinated animals show equivalent growth.

Key words: Circovirus, PCV2, Average daily gain, piglets, vaccination, economic.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas.....	vii
Abreviaturas e siglas.....	viii
1 Breve descrição das atividades desenvolvidas durante o estágio.....	1
2 Introdução.....	1
2.1 Breve resumo sobre o conhecimento e impacto da circovirose em suinicultura	1
2.2 Etiologia.....	3
2.2.1 Taxonomia, morfologia e organização genómica.....	3
2.2.2 Variação genética.....	4
2.2.3 Propriedades biológicas e físico-químicas do PCV2.....	5
2.3 Epidemiologia	6
2.3.1 Distribuição geográfica	6
2.3.2 Suscetibilidade do hospedeiro	7
2.3.3 Vias de transmissão	8
2.3.4 Fatores de risco.....	9
2.3.4.1 Suscetibilidade das raças suínas	9
2.3.4.2 Deficiências de biossegurança.....	10
2.3.4.3 Coinfeções.....	11
2.3.4.4 Estatuto imunitário e infeccioso da porca face ao PCV2	13
2.4 Patogénese	14
2.5 Quadro clínico e lesional.....	15
2.6 Diagnóstico da Circovirose	17
2.6.1 Diagnóstico individual e de exploração.....	17
2.6.2 Métodos de deteção de ácido nucleico, antígeno viral de PCV2 e anticorpos anti-PCV2	18
2.7 Importância económica.....	19
2.8 Prevenção e controlo.....	20
2.8.1 Profilaxia Sanitária.....	20
2.8.2 Profilaxia Médica	22
3 Objetivos.....	25
4 Materiais e Métodos	26
4.1 Exploração, animais e instalações.....	26
4.1.1 Caracterização das instalações	27
4.1.2 Caracterização da exploração relativamente a medidas gerais de manejo, biossegurança e vacinação	29
4.2 Desenho experimental.....	30
4.3 Questionário de avaliação de biossegurança da exploração pelo biochek.....	32
4.4 Análise estatística.....	32
5 Resultados.....	33
5.1 Pesos totais e médios dos lotes vacinados e não vacinados	33
5.2 Comparação do ganho médio diário entre grupos	37
5.3 Questionário biochek	40
5.4 Custos de vacinação	43

6	Discussão e Conclusão	43
	Bibliografia.....	47
	Anexos	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - DETEÇÃO DA FREQUÊNCIA DE PCV2A E PCV2B EM ESPANHA	5
FIGURA 2 - PAÍSES EM QUE A PCVD FOI DIAGNOSTICADA	7
FIGURA 3 - PERCENTAGEM DE AMOSTRAS POSITIVAS A IGM, IGG E PRRS	25
FIGURA 4 - IMAGEM SATÉLITE DA AGROPECUÁRIA DO RAMALHÃO	26
FIGURA 5 - AGROPECUÁRIA DO RAMALHÃO	26
FIGURA 6 - INSTALAÇÕES DE RECRIA	27
FIGURA 7 - DISPOSITIVO REGULADOR DE TEMPERATURA E VENTILAÇÃO NA RECRIA.....	27
FIGURA 8 - BALANÇA PARA PESAGEM DE LEITÕES (VISTA POSTERIOR A E VISTA LATERAL B).....	28
FIGURA 9 - INSTALAÇÕES DA ENGORDA	28
FIGURA 10 - INSTALAÇÕES DA MATERNIDADE (VISTA GERAL DO PAVILHÃO A E VISTA DE CELA B).....	29
FIGURA 11 - SEPARAÇÃO DE ZONAS, LIMPA, SEMI-LIMPA E SUJA, NA EXPLORAÇÃO	30
FIGURA 12 - COMPARAÇÃO DOS PESOS TOTAIS ENTRE LOTES VACINADOS E NÃO VACINADOS.....	36
FIGURA 13 - COMPARAÇÃO DOS PESOS MÉDIOS ENTRE LOTES VACINADOS E NÃO VACINADOS.....	37
FIGURA 14 - GMD DOS LOTES VACINADOS NAS VÁRIAS FASES PRODUTIVAS	38
FIGURA 15 - GMD DOS LOTES NÃO VACINADOS NAS VÁRIAS FASES PRODUTIVAS	39
FIGURA 16 - GMD OBTIDOS NO DESMAME, RECRIA E ENGORDA	40

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS E DOS TRATAMENTOS TÉRMICOS E QUÍMICOS SOBRE A INFECIOSIDADE DO PCV2	5
TABELA 2 - AGENTES DE COINFEÇÃO MENCIONADOS EM CASOS NATURAIS DE PCVD	11
TABELA 3 - RECOMENDAÇÕES DE MADEC	20
TABELA 4 - VACINAS COMERCIAIS CONTRA O PCV2, DISPONÍVEIS NO MERCADO EUROPEU	22
TABELA 5 - CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES VACINADOS	31
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DOS LOTES NÃO VACINADOS.....	31
TABELA 7 - RESULTADOS DOS PESOS TOTAIS E MÉDIOS DOS LOTES VACINADOS.....	33
TABELA 8 - REGISTO DO NÚMERO DE MORTOS DOS LOTES VACINADOS.....	34
TABELA 9 - RESULTADOS DOS PESOS TOTAIS E MÉDIOS DOS LOTES NÃO VACINADOS	34
TABELA 10 - REGISTO DO NÚMERO DE MORTES DOS LOTES NÃO VACINADOS	35
TABELA 11 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS VIVOS E MORTOS NOS GRUPOS DE ESTUDO	35
TABELA 12 - DESVIO PADRÃO DOS PESOS MÉDIOS DOS LOTES VACINADOS E NÃO VACINADOS.....	37
TABELA 13 - GMD DOS LOTES.....	37
TABELA 14 - ANÁLISE DO DESVIO PADRÃO DOS LOTES VACINADOS E DOS LOTES NÃO VACINADOS.....	40
TABELA 15 - RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO BIOCHEK RELATIVAMENTE À BIOSSEGURANÇA EXTERNA.....	41
TABELA 16 - RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO BIOCHEK RELATIVAMENTE À BIOSSEGURANÇA INTERNA.....	42
TABELA 17 - CUSTO DA VACINA ENTRE OS LOTES VACINADOS E NÃO VACINADOS.....	43

ABREVIATURAS E SIGLAS

‰: Percentagem

€: Euro

®: Marca registada

™: *Trade mark*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APCs: Antibióticos promotores do crescimento

ARN: Ácido ribonucleico

CD: Célula dendrítica

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

GMD: Ganho médio diário

g: Grama

IA: Inseminação artificial

IFA: Imunofluorescência indirecta

IFN: Interferão

IHC: Imunohistoquímica

IL: Interleucina

IM: Intramuscular

ISH: Hibridização *in situ*

Kg: Quilograma

Mh: *Mycoplasma hyopneumoniae*

OIE: Organização Internacional de Epizootias

ORF: Grelha de leitura aberta

PCR: reação em cadeia da polimerase

PCV: Circovírus porcino

PCV1: Circovírus porcino tipo 1

PCV2: Circovírus porcino tipo

PCV2SI: Infeção subclínica de PCV2

PCVD: Doenças do circovírus porcino

PM: peso médio

PMWS: Síndrome multissistémica de emagrecimento pós-desmame

PPV: Parvovírus porcino

PRRS: síndrome reprodutiva e respiratória porcina

PRRSV: Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina

PT: Peso total

P: value ou nível de significância

SIV: Vírus da gripe suína

1 BREVE DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

No decorrer do estágio desenvolvido na exploração suinícola em estudo, para elaboração da presente dissertação e em simultâneo com o trabalho de campo, realizaram-se diferentes tarefas, entre as quais:

1. Colheita de sangue no âmbito do plano nacional de erradicação da doença de Aujsky, e em todas as campanhas de profilaxia e vacinação;
2. Diagnósticos de gestação com recurso a ecógrafo portátil;
3. Apoio técnico ao setor de maternidades (vacinação e a administração de ferro a leitões até aos 3 dias, tatuagem);
4. Realização de diferentes passos do protocolo reprodutivo, nomeadamente colheitas de sémen, sua avaliação e preparação final das doses seminais, em instalações apropriadas da exploração;
5. Diagnósticos de cio e inseminação de porcas em cio;
6. Assistência técnica necessária à exploração, nomeadamente, no maneiio regular da exploração, no qual foi possível observar o esquema em que os animais eram integrados nas diferentes fases do ciclo reprodutivo.

2 INTRODUÇÃO

A circovirose é uma doença que afeta o sistema imunológico dos suínos e facilita a propagação de outras doenças infecciosas dos animais atingidos, deixando-os mais vulneráveis a outros agentes que provocam doenças de cariz respiratório e entérico, aumentando, assim, os prejuízos económicos das explorações. Esta doença é causada, essencialmente, por um dos mais pequenos vírus com capacidade de replicação autónoma em células de mamíferos, que estão associadas a doenças imunopressoras, acompanhadas de depleção linfóide ou infeção subclínica e persistente, de seu nome, circovírus porcino tipo 2 (PCV2).

2.1 Breve resumo sobre o conhecimento e impacto da circovirose em suinicultura

Em meados da década de 1970 Tisher, Rasch & Tochtermann (1974) realizaram uma descrição pioneira de um novo vírus, que identificaram como circovírus porcino (PCV), sendo um contaminante não-citopatogénico de uma cultura de células de rim suíno, PK-15. Posteriormente, Tischer, Gelderblom, Vettermann & Koch (1982) descreveram este vírus como sendo de pequenas dimensões, sem envelope, de simetria icosaédrica e com um genoma de ADN (ácido desoxirribonucleico) de cadeia circular simples. Na década de 1990, Allan et al. (1995) demonstraram que o PCV foi inoperante na reprodução da doença nos

suínos. Em 1991, John Harding analisou um grupo de leitões de recria que manifestavam sinais de emagrecimento acentuado, diarreia, icterícia, dispneia e uma mortalidade que rondava os 12-15% (Harding, 1996). Edward Clark (1996), com base em amostras de suínos necropsiados descobriu a presença de lesões microscópicas no sistema linfóide de todos os animais, designadamente com depleção linfocitária e infiltração granulomatosa.

Devido ao envolvimento complexo do sistema orgânico, à idade da apresentação da doença e à afetação de explorações de elevado nível sanitário, Harding e Clark referem pela primeira vez, o conceito de síndrome multissistêmica de emagrecimento pós-desmame (PMWS) (Harding, 2008). Esta síndrome caracterizava-se, essencialmente, por sintomas como: emagrecimento progressivo, hipertrofia dos linfonodos, doença respiratória, enterite, palidez e icterícia, provocando uma marcada imunossupressão nos animais (Harding, 2008). Mais tarde o PCV foi isolado de tecidos de suínos afetados com PMWS e verificou-se que havia diferenças entre o PCV não patogénico e o PCV recém-descoberto e associado a surtos de PMWS (Allan et al.,1998; Meehan et al.,1998). As primeiras análises de toda a sequência genómica revelaram a existência de aproximadamente 68% de homologia entre o isolado avirulento nas células PK-15 e a nova variante patogénica associada à PMWS (Hamel, Lin & Nayar, 1998), pelo que estes agentes foram denominados PCV1 (circovírus porcino tipo 1) e PCV2, respetivamente (Meehan et al.,1998). O PCV1 (não patogénico para suínos) e o PCV2 (patogénico para suínos) são atualmente identificados pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus como duas espécies diferentes dentro do mesmo género *Circovírus*.

No entanto, sabe-se, através de estudos retrospectivos de amostras de soro e tecidos armazenados, que o PCV2 já circulava na população suína muito antes de serem identificados pela primeira vez.

A indústria suinícola tem vindo a registar mudanças consideráveis na última década, nomeadamente no aumento do tamanho das explorações e no aumento da intensificação da produção de suínos (Harris, 2010). As doenças provocadas por agentes infecciosos são uma preocupação emergente nestas explorações, com consequências no impacto da saúde e vida do animal, e com consequências económicas negativas para a exploração. Na Europa até ao final do ano 2000, diversos países viram as suas explorações ameaçadas pelo reaparecimento de algumas doenças tais como: a síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRS), doenças associadas ao PCV2 e influenza suína (SIV), entre outras (Pallares, Ospriessing & Sorden, 2002). Este aumento de doenças deveu-se ao agravamento dos problemas sanitários, que até então, estavam camuflados com a utilização de antibióticos promotores do crescimento (APCs) (Xiau et al., 2015) Estes eram utilizados para melhorar o crescimento e evitar doenças infecciosas. No entanto, o uso abusivo de APCs nas rações acarretou vários problemas, tais como: o aparecimento de bactérias resistentes aos

antibióticos e o aparecimento de resíduos de antibióticos na carne e por estes motivos, tem sido limitado, ou proibido, a sua utilização, a nível mundial (Xiao et al., 2015).

Desta forma, agentes que raramente eram responsáveis por provocar problemas graves de doenças em explorações suínolas, são agora importantes focos de infeção. Um desses agentes é o PCV2.

O PCV2 é o agente causal primário de várias síndromes coletivamente designadas como doenças do circovírus porcino (PCVD), na Europa, ou doenças associadas ao circovírus porcino (PCVAD), nos Estados Unidos da América. Das PCVD a mais importante e mais descrita é a PMWS. Esta é uma doença responsável pelo aumento da mortalidade na recria e na engorda, bem como, pelo aumento do número de animais que são transferidos para o recobro, devido ao atraso no crescimento e à sua progressiva debilitação.

2.2 Etiologia

2.2.1 Taxonomia, morfologia e organização genómica

O PCV1 e o PCV2 pertencem à família *Circoviridae*. Estes são vírus de pequenas dimensões entre 16-21 nm de diâmetro, constituídos por uma cadeia simples de ADN circular, envolvida por uma cápside proteica. A cápside possui simetria icosaédrica e não tem envelope (McNulty et al., 2000). O PCV1 e o PCV2 são os vírus que afetam mamíferos de menores dimensões que foram descobertos até hoje capazes de replicação autónoma (Mankertz, Persson, Mankertz, Blaess & Buhk, 1997). Ambos têm 1759 e 1768 nucleótidos de comprimento, respetivamente e apresentam um genoma com várias inserções e deleções que são responsáveis pelas diferenças de patogenicidade entre o PCV1 e o PCV2. São compostos por 11 fragmentos de leitura aberta (ORFs), tanto para o genoma do PCV1 como para o genoma do PCV2, mas apenas a ORF1 e a ORF2 são expressas em ambos os vírus (Meehan et al., 1998). A ORF1 apresenta 945 nucleótidos de comprimento e codifica as proteínas associadas à replicação viral que são as replicases Rep e Rep'. O ORF2 tem cerca de 701 nucleótidos de comprimento, e codifica a principal proteína estrutural da cápside.

Aparentemente, os genes Rep, Rep' e Cap são os únicos envolvidos no ciclo replicativo do vírus. Pensa-se que uma terceira ORF (ORF3) possa estar envolvida na codificação de uma proteína não essencial à replicação viral, envolvida em mecanismos de apoptose celular (Liu, Chen & Kwang, 2005; Lin, Chien, Wu, Lai & Huang, 2011). Contudo a ORF3 não aparenta ser um determinante vital na patogénese do PCV2 (Finsterbusch & Mankertz, 2009).

Da análise das sequências genómicas do PCV1 e do PCV2, constatou-se que existia uma maior variação de sequência nucleotídica entre os dois vírus ao nível da ORF2, com 68% a 76% de homologia, o que revela diferenças ao nível da cápside proteica e, conseqüentemente, em variações da patogenicidade do agente. Por outro lado, as sequências nucleotídicas de ORF1, isoladas de PCV1 e PCV2, revelaram uma homologia de

aproximadamente 90%, daí a importância do complexo proteico Rep na sobrevivência destes vírus (Cheung, 2006).

2.2.2 Variação genética

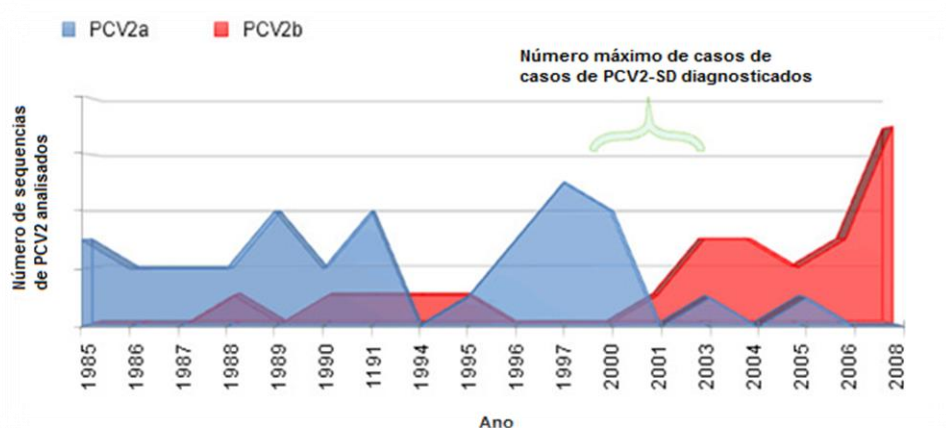
O PCV2 ganha diversidade genética mediante a acumulação de mutações pontuais e através da recombinação. Com efeito, a taxa de evolução do PCV2 é maior do que a esperada para um vírus ADN ($1,2 \times 10^{-3}$ substituições/sítio/ano), parecendo-se com a dos vírus ARN (ácido ribonucleico, responsável pela síntese de proteínas das células) (Firth, Charleston, Siobain, Shapiro & Holmes, 2009).

Dados históricos mostram que o domínio do genótipo do PCV2 é inconstante. Com base na variação genética dos genes da sua cápside, o PCV2 divide-se em dois grupos principais designados como genótipos de PCV2a e PCV2b (Segalés et al., 2008a). Pela avaliação filogenética constatou-se que o PCV2a é mais antigo em termos evolutivos que o PCV2b (Grau-Roma et al., 2008). No entanto, em todo o mundo tem-se descrito as mudanças na prevalência do genótipo PCV2a por PCV2b, que coincidiu com o aparecimento de surtos muito graves da doença (Carman et al., 2006; Cortey et al., 2011; Cheung et al., 2007). Ainda que os dados epidemiológicos não demonstrem que os surtos epidémicos sejam causados por estirpes PCV2b, a sua coincidência no tempo e no espaço assinala que a alteração da prevalência do genótipo faz parte da questão da evolução da doença (Segalés, Kekarainen & Cortey, 2013), uma vez que não é evidente a diferença na patogenicidade dos dois genótipos (Opriessnig et al., 2008).

Portugal não é exceção e tem-se registado igualmente uma mudança de genótipo do PCV2a para PCV2b na população suína (Henriques et al., 2011).

Um exemplo desta situação é demonstrado nos dados obtidos da frequência de PCV2a e PCV2b em Espanha entre os anos de 1985 e 2008 (Figura 1), quando se analisou retrospectivamente 58 amostras, de soro e tecidos, positivas à infeção por PCV2 (Cortey, Olvera, Grau-Roma & Segalés, 2011).

Figura 1 - Detecção da frequência de PCV2a e PCV2b em Espanha (Adaptado de Cortey et al, 2011)



Pela observação da figura 1 no ano 2003 verificou-se uma mudança notória na prevalência dos genótipos de PCV2a para PCV2b. Sabe-se hoje que este acontecimento coincidiu com a evolução de casos esporádicos de PMWS para epidemias globais, entre 2003 e 2008 (Segalés, Allan & Domingo, 2012).

Têm sido identificadas novas variantes genéticas de PCV2 (Opriessnig et al., 2013). Na China demonstrou-se que uma variante de PCV2b parecia ser mais virulenta do que o PCV2a em suínos (Guo et al., 2012). Na realidade, nem sequer se sabe se há outros genótipos, ainda desconhecidos, que possam estar a circular.

2.2.3 Propriedades biológicas e físico-químicas do PCV2

O vírus é muito resistente no meio ambiente, mostrando também uma grande resistência a tratamentos térmicos e químicos (Tabela 1) (López-Soria & Segalés, 2013):

Tabela 1 - Efeito das condições ambientais e dos tratamentos térmicos e químicos sobre a infeciosidade do PCV2 (Adaptado de López-Soria & Segalés, 2013)

Efeito sobre a infeciosidade do PCV2	
pH	<p>Redução da infetividade do PCV2 num tampão ácido (ainda que continue a ser viável a pH <2).</p> <p>Marcada redução da infetividade de PCV2 a pH 11-12.</p>
Tratamentos térmicos	<p>Não se conseguiu a inativação completa do PCV2 após a pasteurização a 60°C durante 24h ou a 75°C durante 30 min, nem com calor seco a 80°C durante 72h ou a 120°C durante 30 min, nem com calor húmido a 75°C durante 15 min.</p> <p>O PCV2 foi inativo com calor húmido a 80 °C durante 15 min.</p> <p>Estes resultados podem variar dependendo do meio e da carga viral, já que</p>

	o PCV2 é mais lábil em meios líquidos e pode apresentar cargas virais mais elevadas em carne de porco.
Tratamentos químicos	O PCV2 é resistente a desinfetantes dissolventes de lípidos à base de álcool, clorhexidina, iodo ou fenol. É conseguida uma redução dos títulos de PCV2 com desinfetantes alcalinos, como a soda cáustica (hidróxido de sódio), agentes oxidantes, como a lixívia (hipoclorito sódico) e compostos de amónio quaternário.

Assim o PCV2 é muito estável durante um longo período de tempo em condições ambientais normais numa exploração, tendo em conta a resistência do PCV2 a tratamentos térmicos, especialmente ao calor seco e a resistência aos desinfetantes (Kim, Lyoo & Joo, 2009). Todos os trabalhos publicados com desinfetantes foram feitos em condições *in vitro*, não tendo em conta que a presença de material orgânico nas instalações, têm uma grande probabilidade de aumentar a resistência do vírus aos desinfetantes (Rosea, Opriessnig, Graslanda & Jestin, 2012).

2.3 Epidemiologia

2.3.1 Distribuição geográfica

A presença do vírus nos cinco continentes (Figura 2) evidencia que o PCV2 é um vírus ubíquo a nível mundial. Desta forma quase 100% das explorações suínícolas estão infetadas com o PCV2 e a maioria dos animais são seropositivos no final do período da engorda (Gillespie, Meng, Pelzer & Buechner, 2009), porém, a infeção causada por este vírus é muitas vezes, subclínica (PCV2SI). Na medida em que, as explorações afetadas pela doença apresentam como índices de morbilidade de 4-30% (ocasionalmente 50-60%) (Segalés & Domingo, 2002), estando associada ao desenvolvimento de sinais clínicos (Gillespie et al., 2007). A mortalidade regista-se entre os 4-20%, existindo grande variabilidade entre explorações (Segalés & Domingo, 2002).

al., 2004). O primeiro caso de PMWS, no javali europeu, registou-se na Alemanha (Vicente et al., 2004).

Um estudo efetuado nas populações de suínos domésticos e suínos selvagens infetados por PCV2, mostrou existir uma grande variabilidade do PCV2 dentro das duas populações (Cságola et al., 2006). Alguns genótipos podem ser encontrados quase exclusivamente em javalis, o que sugere uma independência da infeção por PCV2 em ambas as espécies e uma probabilidade baixa para os suínos domésticos serem infetados (Reiner, Bronnert, Hohloch, Reinacher & Willems, 2011).

2.3.3 Vias de transmissão

A transmissão do vírus pode ocorrer tanto da forma horizontal como da forma vertical, sendo a primeira detetada em todas as vias de excreção do hospedeiro, nomeadamente nas vias nasais, broncotraqueal, orofaríngeo, oculares, saliva, fezes e urina de suínos clinicamente infetados e suínos subclínicamente infetados, sendo que estes últimos disseminam uma quantidade de vírus inferior comparativamente aos animais doentes (Ghebremariam & Gruys, 2005). A transmissão horizontal, ocorre por contacto direto entre animais (no mesmo parque) (Rose, Opriessnig, Grasland & Jestin 2011) e é também possível ocorrer entre animais de parques contíguos e até mesmo afastados entre si alguns metros (Kristensen et al., 2009). Sendo a via oro-nasal a principal via de infeção e de transmissão do PCV2 (Segalés et al., 2007).

Num estudo longitudinal, demonstrou-se que os níveis de PCV2 detetados no sangue e nas zaragatoas nasais e retais eram muito semelhantes num grupo de leitões, que foi acompanhado desde a primeira semana de vida até ao desenvolvimento da doença, indicando a importância de ambos os percursos como vias de excreção do PCV2. No entanto, o mesmo estudo detetou uma quantidade ligeiramente maior dos níveis de PCV2, em zaragatoas nasais, consolidando a ideia de que a via oro-nasal é a via mais comum de infeção (Grau-Roma et al., 2009).

Uma via menos habitual de transmissão do PCV2, é por contacto indireto, pela ingestão de tecidos infetados (músculo esquelético, medula óssea e tecidos linfóides) (Opriessnig, Patterson, Meng & Halbur, 2009) e representa menor potencial de infeção quando comparado com a exposição direta (Patterson & Opriessnig, 2010).

Embora não se conheçam bem os mecanismos nem a frequência com que ocorre a transmissão vertical, existe alguma informação publicada. Esta transmissão é entendida como a passagem do vírus de uma geração para a outra por infeção do embrião ou feto no útero (Brunborg et al., 2007; West et al., 1999), como demonstrado pelo isolamento de PCV2 em fetos abortados, com lesões nos tecidos fetais, sobretudo no miocárdio (Lopez-Soria et al., 2008). A transmissão transplacentária poderá ocorrer durante a virémia na reprodutora (Ha,

Lee, Ahn, Kim & Chae, 2008), porém vários ensaios demonstraram resultados divergentes e inconclusivos, considerando a transmissão transplacentária relativamente rara e localizando a maioria das infecções por PCV2 no pós-parto (Sanchez, Nauwynck, McNeilly, Allan & Pensaert, 2003; Opriessnig, Meng & Halbur, 2007).

Alguns estudos têm especulado sobre o papel da inseminação artificial (IA) na transmissão do PCV2 às porcas, embora esta via nunca tenha sido comprovada (Giuseppe et al., 2012). Uma vez que o vírus é disseminado no sêmen de varrascos natural e experimentalmente infetados, mesmo nos que exibem anticorpos no soro (Madson et al., 2008; Madson et al., 2009). A quantidade de vírus presente nas doses de inseminação utilizadas é baixa, pelo que, a transmissão do vírus pela IA às porcas pode não ser suficiente para desencadear patologias, como uma infecção intrauterina que provocasse a morte embrionária ou fetal ou o desenvolvimento posterior de PCV2 nos fetos (Madson et al., 2009).

2.3.4 Fatores de risco

Os suínos são infetados por PCV2 em algum momento do seu ciclo de vida. No entanto, não está totalmente demonstrada a razão de alguns suínos desenvolverem sintomatologia clínica e outros não. Uma das condições prende-se com a presença de PCV2 ser um fator necessário mas não suficiente, para o desenvolvimento de PCVD, sendo necessários outros fatores adicionais ou circunstâncias particulares, que desencadeiem o desenvolvimento da doença, sob determinadas condições. A explicação para que haja o desenvolvimento da doença clínica pode estar relacionada com a presença de co-fatores que despoletem a replicação viral ao ponto de estimular o sistema imunitário no desenvolvimento de doença clínica acompanhada de lesões características (Darwich & Mateu, 2012).

2.3.4.1 Suscetibilidade das raças suínas

Tem sido referido a influência genética das raças suínas na suscetibilidade a PMWS, particularmente no que se refere à linha do varrasco utilizado que tem vindo a ser objeto de estudo. O facto de algumas ninhadas de determinadas porcas terem uma maior incidência de PMWS em comparação com outras ninhadas de outras porcas que não apresentavam PMWS, na mesma exploração, despertou o interesse de investigadores, veterinários e de produtores (Madec et al., 2000).

Têm sido feitos alguns estudos de investigação para determinar se a componente genética influencia a ocorrência de casos de PMWS. Neste sentido López-Soria et al. (2011) compararam o efeito de 3 diferentes linhas genéticas: A (100% Pietrain), B (50% Large white x 50% Pietrain) e C (25% Large White x 75% Duroc). Nos resultados obtidos da mortalidade no pós-desmame, observou-se uma menor mortalidade nos leitões puros e nos cruzados de Pietrain comparativamente a leitões resultantes do cruzamento Large White x Duroc. Por outro lado, estudos experimentais têm relatado que a raça Landrace tem uma maior

predisposição para a progressão de infecção subclínica para doença clínica, comparativamente com as raças Duroc, Large White e Pietrain (Langohr et al., 2010). Num estudo experimental realizado por Opriessnig e colaboradores (2009), tendo como objetivo avaliar as raças Landrace e Pietrain quanto à gravidade das lesões linfóides microscópicas associadas ao PCV2, constataram que a gravidade das lesões na raça Landrace foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que em suínos da raça Pietrain.

Apesar de existirem alguns estudos sobre esta temática, ainda permanece desconhecido se existem genes relacionados com as raças, que possam conferir resistência ou suscetibilidade em influenciar a progressão da infecção por PCV2 para PCVD (Rose, Opriessnig, Grasland & Jestin, 2012).

2.3.4.2 Deficiências de biossegurança

O termo biossegurança pode ser entendido como o conjunto de medidas de manejo que visam reduzir o risco de entrada ou disseminação de agentes patogénicos numa exploração, levando a um controlo de zoonoses, a uma melhoria da produtividade e a um consequente aumento da rentabilidade das explorações, fornecendo animais sãos e sem riscos para a saúde pública (Dargatz, Garry & Traub-Dargatz, 2002). Os suínos são especialmente suscetíveis a doenças, de modo que as medidas higiénicas aplicadas têm que ser muito rigorosas. As medidas de biossegurança resultam em unidades mais seguras e consistem essencialmente em dois pontos: isolar tanto quanto possível a exploração do exterior e controlar ou eliminar o que existe de patogénico no seu interior. Assim, entre os principais fatores, que têm sido relacionados com o risco de desenvolver PCVD, podemos considerar os seguintes (Rose, Opriessnig, Grasland & Jestin, 2012):

- a)** Localização: este é um dos fatores mais importantes em termos de biossegurança, já que uma localização com menos de 4km a outras explorações pecuárias permitirá que ocorram doenças de origem aerógena, já que há diversos agentes patogénicos capazes de percorrer essas distâncias em condições adequadas (vento, humidade e temperatura). A proximidade a estradas, matadouros, entrepostos e casas de desmancha. A presença de outras espécies animais pode veicular a presença e contínua disseminação de determinados agentes patogénicos (Barceló & Marco, 1998).
- b)** Efetivo de reposição: a receção de efetivo reprodutor acarreta duas preocupações, já que os novos animais podem transportar doenças inexistentes no local de receção, mas também porque esses mesmos animais têm que se adaptar ao microbiotismo presente nessa mesma exploração. Assim, o não cumprimento de um período de quarentena, pode representar um risco para a exploração, introduzindo novas doenças na mesma. O período de quarentena permite a manifestação de doenças que se encontravam em incubação, detetar a presenças de doenças crónicas e, caso seja

possível, instituir um tratamento que evite a disseminação do agente aquando da introdução do animal (APHIS, 2008; FAO, 2010).

- c) Fluxo de animais: o desrespeito pelas operações de limpeza, desinfecção e vazio sanitário dos edifícios, leva à disseminação de agentes patogénicos; a não existência de um fluxo unidirecional, dos animais na exploração, das maternidades para a recria e, por fim, para a engorda e a mistura de animais de lotes distintos, no mesmo espaço ou baia.
- d) Visitas: os visitantes que tenham estado recentemente em contacto com animais de outras origens e de outros locais onde é possível ocorrerem contaminação. A entrada na exploração regular de visitantes e a não utilização de roupa e calçado adequado e exclusivo do local (FAO, 2010).
- e) Controlo de pragas: roedores, outros animais domésticos e até alguns selvagens funcionam como reservatório para agentes patogénicos do suíno, pelo que, a inexistência de uma vedação resistente em todo o perímetro da exploração pecuária pode contribuir para a disseminação do agente (APHIS, 2008).

No entanto, o papel das condições ambientais não pode ser negligenciado, pois, os suínos durante a sua vida estão expostos a muito *stress* ambiental tanto nas mudanças climáticas, como na alimentação. Através de estudos experimentais tem sido demonstrado que alguns destes fatores podem deprimir o sistema imunitário e conseqüentemente aumentar a suscetibilidade ao PCV2 (Patterson et al., 2015).

2.3.4.3 Coinfeções

Vários estudos têm evidenciado a importância das coinfeções em suínos, demonstrando que a coinfeção de suínos com o vírus PRRS, parvovírus suíno (PPV) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (MH) podem exacerbar a infeção pelo PCV2 e desenvolverem uma PCVD, enquanto outros agentes patogénicos podem ser encontrados por acaso ou como resultado da imunossupressão causada pelo PCV2 (Tabela 2) (Segalés, Kekarainen & Cortey, 2013). Porém ainda não se sabe se são as coinfeções que desencadeiam a PCVD, ou se é a imunossupressão causada pelo PCV2 que facilita o desenvolvimento dessas infeções (López-Soria, Grau-Roma & Segalés, 2008).

Tabela 2 - Agentes de coinfeção mencionados em casos naturais de PCVD (Adaptado de Grau-Roma et al., 2011 e Opriessnig & Halbur, 2012)

<i>Microrganismo</i>	<i>Agente</i>
Vírus	<i>Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV)</i> <i>Parvovírus porcino (PPV)</i> <i>Vírus da diarreia epidémica porcina (PEDV)</i> <i>Vírus da doença de Aujeszky (ADV)</i>

	<i>Vírus da hepatite E (HEV)</i> <i>Teschovírus porcino (PTV)</i> <i>Vírus da gripe suína (SIV)</i>
Mycoplasmas	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Mycoplasma hyorhinis</i> <i>Mycoplasma suis</i>
Bactérias	<i>Streptococcus suis</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Salmonella cholerasuis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus parasuis</i> <i>Bordetella bronchiseptica</i> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> <i>Actinobacillus suis</i> <i>Arcanobacterium pyogenes</i> <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
Oportunistas	<i>Pneumocystis carinii</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Criptosporidium parvum</i> <i>Chlamydia spp.</i> <i>Zygomycetes spp.</i>

O vírus PRRS representará um fator de risco mais elevado como despoletador de PCVD, por induzirem quadros clínicos semelhantes com PMWS, e por uma elevada percentagem de explorações suínolas manifestarem simultaneamente infeção com PCV2 e PRRS (Segalés et al., 2002; Sorden et al., 1998). O vírus PRRS, mostrou ter implicações no aumento da severidade de PMWS em condições experimentais e de campo (Harms et al., 2001; Rovira et al., 2002; Dorr, Baker, Almond, Wayne & Gebreyes, 2007). Ambos os vírus (PCV2 e PRRS) infetam as células de linhagem monocítica (Duan, Nauwynck & Pensaert, 1997; Chang et al., 2006) e aquando da sua junção tornam mais propícia a ocorrência da replicação viral (Allan et al., 2000).

O vírus PRRS é responsável pelo aumento da carga viral no soro e de antígeno viral nos tecidos de suínos alvos de coinfeção, o que resultará em lesões associadas ao PCV2 mais severas e uma maior probabilidade de desenvolvimento de manifestações clínicas da doença (Opriessnig et al., 2008).

Além disso constatou-se que o PRRS fez aumentar a expressão da IL-10, que por sua vez vai suprimir os linfócitos T (Chareerntantanakul et al., 2006).

A coinfeção com PCV2 e PPV tem sido demonstrada experimentalmente, verificando-se um aumento da gravidade dos sinais clínicos e lesões associadas a PMWS do que só com a infeção com o PCV2 (Zheng et al, 2013).

O PPV é muito semelhante ao PCV2, sobretudo na patogenicidade e tropismo celular. O primeiro vírus apresenta um forte tropismo para tecidos mitóticos ativos como gânglios linfáticos ou músculo cardíaco (Opriessnig & Halbur, 2012). O primeiro estudo experimental que demonstra a presença de coinfeção de PPV e PCV2 foi conduzido em 1999 (Ellis et al., 1999). Os investigadores demonstraram que suínos inoculados experimentalmente, com PPV e PCV2 aumentaram a gravidade dos sinais clínicos e das lesões de PMWS do que com PCV2 sozinho. Com base neste facto, aferiu-se que a replicação do primeiro vírus ocorreu antes da replicação do segundo, apoiando a hipótese de que a disfunção imunológica induzida por PPV promove e reforça a replicação do PCV2 (Allan et al., 1999).

Estudos documentam que o MH é um agente que quando associado ao PCV2, pode potenciar lesões graves no pulmão e nos tecidos linfóides, sendo detetados níveis elevados de PCV2 nestes tecidos, e conseqüentemente, aumento de incidência de PMWS (Opriessnig & Halbur, 2012). Numa investigação de campo envolvendo 147 explorações, um dos fatores identificados associados ao aumento da gravidade de PCVD foi a seropositividade do MH (Alarcon et al., 2011).

2.3.4.4 Estatuto imunitário e infeccioso da porca face ao PCV2

O facto da infeção por PCV2 raramente ser observada nas quatro primeiras semanas de vida dos leitões em explorações infetadas, sugere que os anticorpos maternos estão presentes em praticamente todos os leitões que ingeriram colostro, conferindo proteção contra o desenvolvimento da doença. A quantidade de colostro ingerido, é fundamental para a transferência de imunoglobulinas da porca ao leitão que é agamaglobinémico ao nascimento (Coalson & Lecce, 1973). Os leitões não desenvolvem virémia até que o título de anticorpos maternos diminua, o que acontece em condições naturais até ao máximo de sete semanas de vida (Rodriguez-Arriola et al., 2002). Estes anticorpos apenas limitam a circulação e excreção viral até esta idade, não sendo eficazes na prevenção da infeção do PCV2 (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007), pelo que, diferentes estratégias de vacinação contra o PCV2 têm sido adotadas. A vacina pode ser administrada às fêmeas reprodutoras, à descendência ou a ambos simultaneamente. A administração de vacinas nas reprodutoras aumenta o título de anticorpos no animal e que serão transmitidos à descendência. O título de anticorpos ideal na fêmea reprodutora só é obtido com duas ou mais vacinações, por isso, inicialmente, realiza-se a vacinação simultânea das fêmeas reprodutoras e da descendência (Grau-Roma, Fraile & Segalés 2010).

2.4 Patogénese

O mecanismo pelo qual o PCV2 infeta as células ainda não é totalmente conhecido. Pensa-se que é pela existência de um recetor celular comum, uma vez que o antigénio viral é encontrado numa grande variedade de células, nomeadamente de origem epitelial, endotelial e mielóide (Darwich, Segalés & Mateu, 2004). A replicação do PCV2 depende do ADN polimerases presente no núcleo celular da célula hospedeira. Este é expresso durante a fase S do ciclo celular, e para além das polimerases, requer a participação de várias proteínas das células hospedeiras para que consiga completar o seu ciclo infeccioso. Quando a célula se torna infetada, o ADN do PCV2 é por si só, incapaz de penetrar no envelope nuclear. O vírus não entra no núcleo até ao final da mitose (Tischer, Peters, Rasch & Pociuli, 1987). Deste modo, a replicação viral é mais eficaz em células com marcada atividade mitótica (Allan & Ellis, 2000), permitindo a entrada do genoma viral no núcleo, e posteriormente ocorrer replicação, transcrição e encapsidação (McCullough, Ruggli & Summerfield, 2009). De acordo com estudos experimentais durante a vida fetal, foi detetado o antigénio viral, no coração, pulmões, fígado, rins, cérebro, baço e linfonodos (Opriessnig et al., 2006; Langohr et al., 2010). No entanto, a replicação do vírus foi maior e mais consistente no coração pois, os cardiomiócitos fetais apresentam taxas mitóticas elevadas (Sanchez, Nauwynck, McNeilly, Allan & Pensaert, 2001). Com o final da gestação, há um decréscimo dos cardiomiócitos infetados, por perderem a capacidade de replicar o PCV2, o que pode estar relacionado com a redução da atividade mitótica (Bishop, 1972). Existe uma mudança de tropismo das células-alvo após o nascimento, sendo o antigénio encontrado, maioritariamente, nos macrófagos dos leitões (West et al., 1999; Sanchez et al., 2001).

Apesar do PCV2 poder ser detetado numa grande variedade de células que se encontram em diferentes órgãos, isso não significa que haja ocorrência de replicação viral (Hamberg, Ringler & Krakowka, 2007; Pérez-Martín et al., 2007). Um estudo sobre infeção e replicação do PCV2 foi realizado usando células endoteliais suínas, células epiteliais intestinais, fibrócitos e células dendríticas (CD). Pôde constatar-se, que de todas estas células, as CD foram as únicas que não apresentaram replicação viral. Este facto pode indicar que o PCV2 pode usar as CD, como um mecanismo de disseminação do vírus no hospedeiro (Steiner et al., 2008). Pelo que, as CD podem desempenhar uma importante função na regulação do sistema imunitário, tal como outras células apresentadoras de antigénios, contra as infeções virais (McCullough, Ruggli & Summerfield, 2009).

Extensas lesões linfóides (depleção linfocitária, inflamação granulomatosa através da infiltração de macrófagos dos tecidos linfóides) em suínos que desenvolvem PMWS, estão

presentes de forma sistemática. Estas lesões apresentam uma forte conexão com a diminuição do número de linfócitos B e T (leucopénia) circulantes (Segalés et al., 2001; Shibahara et al., 2000) e um padrão alterado de respostas de citocinas, quer no sangue, quer nos órgãos linfóides (Darwich et al., 2003a). Estes acontecimentos podem estar na origem da imunossupressão, apresentada pelos animais atingidos pela doença (Segalés et al., 2001; Shibahara et al., 2000). Contudo, ainda não se sabe se a diminuição da produção de linfócitos, se deve à redução da produção na medula óssea, à redução da proliferação nos tecidos linfóides secundários ou ao aumento da perda de linfócitos na medula óssea ou tecidos linfóides devido a apoptose induzida pelo PCV2 (Opriessnig, Meng & Halbur, 2007).

Estudos relacionados com os padrões de expressão de citocinas nos tecidos linfóides ou nas células mononucleares do sangue periférico em suínos afetados por PMWS, evidenciaram alterações significativas. Estas alterações estão relacionadas com níveis elevados de expressão interleucina (IL) -10 no timo dos animais afetados, acompanhada de depleção e atrofia tímicas (Darwich et al, 2003b).

Darwich et al (2008) mostraram que suínos infetados com PCV2SI apresentavam um aumento transitório dos níveis de IL-10 na fase de virémica da infeção, enquanto suínos infetados por PCV2, em resposta à infeção, produziram níveis elevados nas células mononucleares do sangue de IL-10 interferindo com as respostas antigénicas de memória através da inibição de interferão (IFN) - γ , IFN- α e IL-12. Este acontecimento poderá desempenhar um papel importante na patogénese e na manutenção de infeção pelo PCV2 e no estado de imunossupressão do animal.

Com o intuito de descreverem a distribuição tecidular e celular do antígeno e genomas virais em animais clinicamente afetados por PMWS, após infeção natural, Rosell et al. (1999) aferiram que a patogénese compreenderá:

- 1) A entrada do PCV2 por via oronasal;
- 2) A replicação do vírus ocorrerá primeiro nos órgãos linfóides locais, como as amígdalas e os linfonodos da cabeça;
- 3) Ocorrerá disseminação sistémica para outros tecidos linfóides e órgãos parenquimatosos, como o pulmão, o fígado ou o rim.

2.5 Quadro clínico e lesional

A síndrome mais relevante causada pelo PCV2 é a PMWS (Rosell, Segalés & Domingo, 2000), embora outras condições patológicas possam ser associadas ao agente patogénico nomeadamente, doenças do complexo respiratório porcino, enterite, síndrome de nefropatia e dermatite porcina, falhas reprodutivas e pneumonia necrosante proliferativa (Opriessnig, Meng & Halbur, 2007; Segalés, Allan & Domingo, 2005).

A PMWS é clinicamente caracterizada por emagrecimento com progressiva perda de peso, dispneia, aumento dos gânglios linfáticos, diarreia, palidez e icterícia (Harding & Clark, 1997; Krakowka et al., 2004; Rosell et al., 1999). Outros sinais clínicos, incluindo a tosse, a pirexia, a ulceração gástrica, a meningite e a morte súbita têm sido relatados, com menor expressão (Harms, 1999; Wellenberg et al., 2000).

À necrópsia, as lesões mais marcantes são pulmões não colapsados de aspeto mosqueado e hipertrofia dos linfonodos (principalmente os superficiais inguinais, submandibulares, mesentéricos e mediastínicos). No entanto, também podem ser observados linfonodos normais ou atroficos em fases mais avançadas da doença. No fígado, pode observar-se uma atrofia (casos em que os animais apresentam icterícia) com descoloração amarelo-alaranjado do mesmo, e a presença de múltiplos focos de descoloração de diâmetro variável nos rins.

A nível microscópico podem ser encontrados nos tecidos linfóides, com um grau variável, de depleção linfocitária com perda de folículos. Este fenómeno, é normalmente combinado com a infiltração histiocítica multifocal e difuso, ligeiro, ou muito intensa, e possível presença de células gigantes multinucleadas (Rosell et al., 1999). Outras lesões microscópicas têm sido descritas em muitos tecidos, nomeadamente no pulmão, sendo a pneumonia subaguda intersticial, a lesão mais característica (Rosell et al., 1999). Nalguns casos estão presentes histiocitos ou células gigantes multinucleadas nas paredes espessadas interalveolares e/ou no interior dos alvéolos. Nos casos crónicos, pode estar presente uma bronquiolite obliterante fibrosa (Clark et al., 1997; Segalés et al., 2000). Lesões hepáticas foram descritas como infiltração linfocítica, nas áreas perilobulares, normalmente ligeiras e com distribuição focal ou multifocal (Clark et al., 1997). No entanto, é possível detetar lesões muito graves, que mostram fibrose perilobular generalizada com desorganização dos lóbulos hepáticos e com perda maciça de hepatócitos. Estas lesões são associadas a icterícia e a lesões macroscópicas relatadas no fígado (Rosell, Segalés & Domingo, 2000). Quatro estadios de lesões hepáticas, em suínos afetados por PMWS, foram estabelecidos com base na distribuição e intensidade destas lesões, num estudo realizado por Rosell e seus colaboradores (2000):

- Estadio I - Ligeira infiltração linfocítica multifocal nas áreas perilobulares;
- Estadio II - Acentuada infiltração mononuclear inflamatória das zonas perilobulares, desorganização dos lóbulos hepáticos e presença frequente de células apoptóticas;
- Estadio III - Infiltração mononuclear inflamatória nas áreas perilobulares, com células de kupffer proeminentes;
- Estadio IV - Generalizada fibrose perilobular, desorganização dos lóbulos hepáticos com infiltração de células mononucleares difusas e perda massiva de hepatócitos.

2.6 Diagnóstico da Circovirose

2.6.1 Diagnóstico individual e de exploração

O diagnóstico, da PMWS, é realizado a partir dos sinais clínicos, lesões histopatológicas, sendo elas moderadas ou graves, nos tecidos linfóides e por meio de análises laboratoriais: serologia (deteção de anticorpos), deteção viral do ADN ou antigénios e isolamento viral (Sorden, 2000). O diagnóstico realizado com base nos sinais clínicos não é muito fiável, pela diversidade de doenças que o PCV2 pode causar e pela interação que ocorre com outras infeções (Grau-Roma et al., 2010).

A realização de perfis serológicos, para deteção de anticorpos, é de elevada importância e oferece uma grande quantidade de informação sobre a exploração e a evolução da doença na mesma (Arias, Sierra & Sánchez-Vizcaíno, 2003). A elisa é a técnica mais utilizada, já que permite a análise de uma amostragem maior e o conhecimento da ocorrência e dinâmica da doença na exploração (Andrada, Fernández, del Pozo & Sánchez-Vizcaíno, 2003). No entanto, vários métodos têm sido desenvolvidos para detetar a infeção pelo PCV2 nos tecidos e a sua relação com a presença de lesões, sendo a hibridação *in situ* (ISH) e a imunohistoquímica (IHC) eleitas as melhores técnicas, por alguns autores, por existir forte associação entre a quantidade de antigénio e/ou ácido nucleico virais e a gravidade das lesões histopatológicas (Rosell et al., 1999; Quintana et al., 2001). É possível existirem em suínos recentemente infetados ou em fase de convalescença, lesões ligeiras nos tecidos linfóides, assim como baixas quantidades de antigénio ou ácidos nucleicos virais (Quintana et al., 2001), sem sinais clínicos evidentes, em suínos subclínicamente infetados (Segalés, 2012).

Uma vez que, em explorações com bons índices produtivos, podem encontrar-se casos de suínos com PMWS (Lopez-Soria et al., 2008), o Consórcio Europeu para a Investigação das PCVD (*European Union Consortium on PCVD Research*) (2005) estabeleceu a definição de um diagnóstico de exploração afetada por PCVD, que deve basear-se em dois elementos:

- a) Um aumento significativo da mortalidade no pós-desmame associada a sinais clínicos compatíveis com PCVD, comparativamente ao histórico normal da exploração. O aumento da mortalidade é considerado significativo quando a mortalidade atual (durante um período de 1 a 2 meses) é igual ou superior à mortalidade média histórica (durante um período mínimo de 3 meses) mais 1,66 vezes o desvio-padrão; em alternativa, o aumento da mortalidade pode ser determinado estatisticamente, utilizando o teste de qui-quadrado. Se não se encontrarem disponíveis registos de mortalidade da exploração, o aumento da mortalidade deve ultrapassar o nível nacional ou regional em 50%;
- b) O diagnóstico individual deve ser realizado em pelo menos um de cinco suínos necropsiados.

Além disso, é também importante realizar outros testes de diagnóstico, para exclusão de outras causas potenciais de mortalidade acentuada.

2.6.2 Métodos de detecção de ácido nucleico, antígeno viral de PCV2 e anticorpos anti-PCV2

A ISH e a IHC são os testes considerados “*golden standard*” para detectar ácido nucleico e antígenos virais, respectivamente, em tecidos e correlacionar a sua detecção com a presença de lesões, em suínos afetados por PMWS (McNeilly et al., 1999; Rosell et al., 1999). Na ISH utiliza-se uma sonda de ADN marcada que corresponde a uma parte específica do genoma do PCV2, enquanto na IHC utiliza-se um anticorpo monoclonal ou policlonal para detectar antígeno de PCV2 em seções de tecidos fixados com formol e embebidas em parafina (Opriessnig et al., 2007).

O uso das técnicas ISH e IHC, tem grande utilidade na medida em que o PCV2 é um vírus fastidioso que é difícil de cultivar *in vitro* e não é citopático em cultura de células (Tischer, Peters & Pociuli, 1995). Em geral, a técnica IHC é mais rápida e econômica do que a ISH (McNeilly et al., 1999). Um dos métodos que tem surgido para o diagnóstico da circovirose é, nomeadamente a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste num método de amplificação de ADN e que permite detectar ácido nucleico viral a partir de vários tipos de amostras (tecidos, soro, excreções e secreções) e, de uma forma simples demonstrar a existência do agente causal na amostra examinada. No entanto a PCR qualitativa não permite diferenciar infeções clínicas e subclínicas, pelo que não deve ser utilizada no diagnóstico de PMWS, enquanto a PCR quantitativo (qPCR) já permite quantificar o vírus presente numa amostra, e isso pode ser útil no diagnóstico de PMWS ante-mortem do efetivo, tornando-se vantajoso na avaliação da evolução clínica da exploração (Segalés, 2012). Vários estudos têm proposto valores para os limiares de detecção de PMWS em animais vivos, utilizando técnicas de qPCR em combinação ou não com técnicas de diagnóstico serológico: $10^{4,7}$ (Harding et al., 2008), $10^{6,21}$ (Grau-Roma et al., 2009), $10^{6,91}$ (Fort, Olvera, Sibila, Segalés & Mateu, 2007), 10^7 (Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004; Segalés et al., 2005) e $10^{7,43}$ (Grau-Roma et al., 2009) cópias virais / mL. Estas variações detetadas resultam, sobretudo, de cada laboratório e das técnicas utilizadas. No entanto, estipulou-se que, um limiar igual ou superior a 10^7 cópias virais/ml de soro se correlaciona positivamente com lesões e doença associadas ao PCV2 (Harding et al., 2009; Hjulsager et al., 2009). Apesar de serem detetadas cargas virais em suínos afetados por PMWS significativamente maiores, em comparação com suínos infetados com PCV2 sem sintomatologia clínica da doença, os testes de qPCR (utilizados separadamente ou em combinação com serologia), são úteis no apuramento do diagnóstico de PMWS, contudo, não devem ser vistos como alternativa à histopatologia e à detecção de PCV2 nos tecidos (Grau-Roma et al., 2009).

Os testes disponíveis para a deteção de anticorpos específicos anti-PCV2, são os testes de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoperoxidase em monocamada (IPMA) e imunofluorescência indirecta (IFA). Contudo, os últimos dois testes não são atualmente utilizados na prática clínica devido à sua lentidão e limitada disponibilidade (Callén, 2012). O teste ELISA é uma técnica sensível que permite a deteção e medição de pequenas quantidades de anticorpos séricos numa amostra líquida (Gan & Patel, 2013). Nos últimos anos tem-se assistido à comercialização de testes de diagnósticos de ELISAs para imunoglobulinas IgM e IgG, cujos valores podem ser úteis em estabelecer uma relação entre os níveis IgM e IgG, sendo indicativo do momento em que se iniciou a infeção ou a circulação viral (Segalés et al., 2005; Opriessnig et al., 2007):

- Valor de IgM maiores ou iguais a IgG está relacionada com início de infeção ativa (primeiros 21 dias pós-infeção);
- Valores de IgM menores do que IgG, é indicativo de infeção ativa (entre 20 a 50 dias pós-infeção);
- Valores de IgG elevados acompanhados de valores negativos de IgM, é indicativo de fase tardia da infeção ou fase de convalescença (cerca de 2 meses após a infeção).

2.7 Importância económica

O PCV2 tem surgido como uma das infeções virais mais devastadoras causando grande impacto económico nas explorações suinícolas, devido a perdas diretas e despesas com medidas de controlo (Franzo et al., 2015), pelo que, é importante investigar e identificar as estratégias de controlo mais rentáveis em explorações afetadas por PMWS e PCV2SI, já que a gravidade e os seus custos associados podem variar entre explorações (Alarcon et al., 2011).

As perdas financeiras anuais encontram-se estimadas em cerca de 900 milhões de euros na União Europeia em explorações afetadas pela PMWS (López-Soria et al., 2011).

Na Inglaterra registaram-se grandes perdas económicas em explorações suinícolas afetadas por PMWS e PCV2SI. No ano 2008, antes da introdução da vacina contra o PCV2, foram estimadas perdas de 56 milhões de libras e durante o período de 2001 e 2007 estimaram-se perdas de 550 milhões de libras (Alarcon, Rushton & Wieland, 2013).

Apesar da elevada eficiência das vacinas contra o PCV2, o seu custo é um importante fator limitativo para a maioria das explorações. Vários estudos mostram que a vacinação contra o PCV2 não permite a erradicação do vírus da exploração, e para alcançar os melhores resultados possíveis são necessárias medidas adicionais de controlo (Kixmoller et al., 2008; Lyoo et al., 2011).

Um estudo realizado por Alarcon, Rushton, Nathues & Wieland (2013) analisou a relação do custo-benefício e eficácia de 5 medidas de controlo distintas (vacinação dos leitões contra o PCV2, melhoria das medidas de biossegurança, dietas adequadas à idade, redução da

densidade populacional e despovoamento total e repovoamento dos parques) em explorações do Reino Unido, em que foram estimados os ganhos e perdas económicas associadas às diferentes estratégias. Aferiram que a vacinação dos leitões em associação com medidas de biossegurança foram economicamente rentáveis em explorações altamente afetadas por PMWS e poderiam economizar em média 57,648 libras por 100 porcas em 5 anos.

2.8 Prevenção e controlo

Para a prevenção e controlo de PMWS é fundamental a existência de planos profiláticos que devem ser implementados a diferentes níveis, nomeadamente no manejo, biossegurança e vacinação, que permitirá aos produtores gerirem grande parte dos problemas originados pelo PCV2.

Os planos profiláticos têm como objetivos a prevenção da entrada de novas doenças, evitando a contaminação dos animais presentes, o controlo da ocorrência de doenças e a diminuição dos danos de determinadas doenças presentes na exploração (Pereira, 1992).

2.8.1 Profilaxia Sanitária

Antes da disponibilidade das vacinas contra o PCV2, o controlo da PMWS estava focado em garantir boas medidas de higiene, bem como reduzir as coinfeções, pelo que as medidas sanitárias assumem um papel importante e atualmente é baseada nos princípios recomendados por um autor francês (Madec et al., 2000), que podem ser resumidas em quatro regras de ouro e incluem limitar o contacto entre animais (sobretudo entre indivíduos provenientes de diferentes ninhadas), a redução do *stress*, boas condições de higiene e uma boa nutrição (Madec et al., 2000). Neste sentido, foi desenvolvido o plano dos “20 princípios de Madec” (Tabela 3), que têm sido eficazes na diminuição do impacto da doença em explorações afetadas tanto pelo PCV2 como de outras infeções (Segalés., 2008). Este plano consiste na aplicação de uma lista de medidas de gestão e manejo a todas as fases da produção suína, que pretendem a obtenção de uma produção mais segura e rentável (Madec et al., 2000).

Tabela 3 - Recomendações de Madec (Adaptado de Gadd, 2006)

Fases de produção	Procedimento
Maternidade	1. Esvaziamento da fossa de escoamento, com limpeza e desinfecção da mesma entre lotes.
	2. Limpar as porcas e vaciná-las antes de estas entrarem na maternidade.
	3. Realização de adoções cruzadas só nas primeiras 24h de vida.

Recria	4. Utilizar parques com menos de 13 animais e com separações sólidas.
	5. Esvaziamento e desinfecção das fossas, e proceder ao tudo dentro tudo fora.
	6. Densidade animal deve ser adequada (3 leitões/m ²).
	7. Garantir 7 cm de espaço no comedouro para cada leitão.
	8. Garantir uma boa qualidade de ar.
	9. Garantir uma temperatura adequada.
	10. Não misturar lotes.
Engorda	11. Utilizar parques com um número reduzido de animais e repartições sólidas.
	12. Esvaziar a fossa e proceder à sua limpeza e efetuar o tudo dentro tudo fora.
	13. Não misturar animais de diferentes parques.
	14. Não misturar animais de diferentes pavilhões.
	15. Densidade animal adequada (0,75m ²)
	16. Garantir boa qualidade do ar.
Outras Medidas	17. Assegurar um programa vacinal adequado.
	18. Assegurar um fluxo de animais adequado entre os pavilhões.
	19. Higiene restrita (injeções, castrações, etc.)
	20. Separação o mais ráipo possível dos animais doentes dos saudáveis, pondo-os numa enfermaria.

É recomendado que, para um melhor controlo da doença, sejam adotados o máximo número de medidas (Mores et al., 2012).

Relativamente à limpeza e desinfecção das instalações e veículos de transporte, desempenham medidas fulcrais, de modo a minimizar o risco de sobrevivência e permanência do agente viral no meio ambiente ocupado pelos animais. Estudos realizados *in vitro*, na tentativa de investigar quais os desinfetantes com maior capacidade de eliminar o PCV2, concluíram que agentes oxidantes (Virkon® S), hidróxido de sódio, amónio quaternário (Roccal® D e Plus, Fulsan®), hipoclorito de sódio (Clorox® Bleach) e fenóis (1-Stroke Environ® e Tek-Trol®) reduziram significativamente os títulos virais de PCV2 (Royer, Nawagitgul, Halbur & Paul, 2001). No entanto, a limpeza é fundamental para a eficácia dos desinfetantes, pois contribui para uma diminuição da carga microbiana e da quantidade de matéria orgânica (Pereira, 1992).

Na publicação *Good Practices for Biossecurity in the Pig Sector*, a FAO (2010) defende que os pontos base para a uma correta implementação das medidas de biossegurança passam por segregação, limpeza e desinfecção.

Por segregação, entende-se a separação dos animais e dos materiais, uma vez que, um dos principais mecanismos de transmissão de doença entre os suínos é por contacto direto, este ponto tem uma importância vital na obtenção de um elevado estatuto sanitário (FAO, 2010).

O passo seguinte na manutenção da eficácia da segregação é a limpeza. Os agentes patogénicos são eliminados através de excreções e/ou secreções que conseguem aderir a diversos materiais e preservar a viabilidade desse agente.

Por fim, refere-se a desinfecção. De acordo com a OIE – Organização Mundial da Saúde Animal (2009), a desinfecção é a “*aplicação, após limpeza metódica, de procedimentos com o intuito de destruir os agentes infecciosos ou parasitários, incluindo zoonoses; isto aplica-se aos perímetros, veículos e diferentes objetos que tenham sido diretas ou indiretamente contaminados*”.

Atendendo ao alvo de ação, as medidas de biossegurança podem ser divididas em bio-exclusão (medidas que visam a prevenção da entrada da doença na exploração) e bio-contenção (medidas que incluem esforços no sentido de prevenir a disseminação da doença dentro da exploração) - FAO, 2010.

2.8.2 Profilaxia Médica

As primeiras vacinas comerciais contra o PCV2 tornaram-se disponíveis em 2006 na América do Norte, para suínos em crescimento, e na Europa, em 2008 foram autorizadas as primeiras vacinas, para leitões. Estas vacinas não foram imediatamente bem-sucedidas na redução da grave mortalidade associada a PCVD, mas logo se tornou evidente, a partir de observações de campo, que a vacinação resultou em melhorias de produtividade em animais afetados por PCVD.

Atualmente, existem designações diferentes das cinco vacinas existentes no mercado nacional e internacional contra o PCV2, de acordo com o continente a que se refere (Tabela 4).

Tabela 4 - Vacinas comerciais contra o PCV2, disponíveis no mercado Europeu (Adaptado de Chae, 2012)

Vacina	Antigénio	Adjuvante	Animal	Dosagem	Administração
Circovac®	PCV2a inativado	Óleo de parafina	Porca	2 X 2 ml	5 e ás 2 semanas de idade antes do parto.

			Leitões	1 X 0,5 ml	≥3 Semanas de idade.
Circoflex®	Cápside	Polímero aquoso		1 X 1 ml	≥2 Semanas de idade.
Circumvent®		D1-a-tocoferol + parafina líquida		2 X 2 ml	≥3 Semanas + 3 semanas de intervalo.
Porcillis PCV®					≥ 3 Semanas de idade.
Fostera PCV®	Quiméra inativada PCV1/PCV2a	Sulfolipo- ciclodextrina esqualano			≥ 3 Semanas de idade.

A primeira vacina a ser comercializada foi a Circovac® (Merial), produzida por inativação do vírus PCV2 e inclui na sua composição o adjuvante oleoso. Esta vacina foi inicialmente utilizada em porcas e marrãs (dose 2 ml), sendo mais tarde aprovada para leitões numa dosagem reduzida (dose 0,5 ml) com idade superior a 3 semanas (Fraile et al., 2012). A imunidade inicia-se 2 semanas após a vacinação dos leitões, mantendo-se, pelo menos, durante 14 semanas (European Medicines Agency [EMA], 2011a). A Circovac® foi utilizada em França e na Alemanha sob licença temporária em 2004, atualmente encontra-se disponível na Europa e no Canadá desde 2006 (Segalés et al., 2007).

A CircoFLEX™, Circumvent® PCV2, Porcilis® PCV2 e Fostera® PCV2, são vacinas de subunidades baseadas na proteína da cápside, do PCV2, codificada pela ORF2, expressa num sistema de baculovírus. O ORF2 foi escolhido porque contém o principal epitopo de neutralização logo, tem potencial para induzir uma resposta imunitária protetora conferida pela vacinação (Nawagitgul et al., 2002; Blanchard et al., 2003). Com a vacinação de CircoFLEX®, a proteção dos leitões inicia-se 2 semanas após a sua administração, mantendo-se, pelo menos, até 17 semanas (EMA, 2011b). Já a vacinação com Porcilis® PCV, poderá manter a imunidade dos leitões até às 22 semanas (EMA, 2010). Em 2011 foi introduzido no mercado norte-americano a vacina Fostera™ PCV, que resulta da reformulação de um produto anteriormente denominado Suvaxyn® PCV2 One Dose™, atualmente suspenso na Europa. A vacina consiste num vírus quimérico inativo, contendo o imunogénio gene da cápside do PCV2 inserido no genoma do PCV1 não patogénico. Consoante indicação do fabricante, após a administração da vacina, inicia-se uma intensa resposta imunitária em 2 semanas, que se mantém durante 16 semanas (Pfizer Animal Health Inc., 2011).

Todas as vacinas comerciais são baseadas no genótipo PCV2a. No entanto, estas vacinas são capazes de controlar a infeção por PCV2b, em suínos infetados, através da imunidade cruzada contra este genótipo (Fort et al., 2008).

As vacinas contra o PCV2 podem ser administradas aos leitões com idade superior a três semanas, por existir uma probabilidade mais baixa de interferência com os anticorpos maternos, que vão bloquear a resposta imunitária no recém-nascido, impedindo assim a vacinação dos animais muito jovens (Opriessnig et al., 2010). Por outro lado, a vacinação demasiado tardia pode constituir um risco de falha vacinal pois, assim que os níveis de imunidade materna diminuem, os leitões podem ser infetados pelo PCV2. Deste modo, idealmente, a vacina contra o PCV2 deve ser administrada quando os anticorpos de origem materna são mínimos e antes dos leitões serem infetados através de condições naturais. Uma vez que, os níveis de anticorpos de origem materna e a dinâmica de infeção pelo PCV2 variam entre explorações, o momento ótimo de vacinação depende da exploração em questão, pelo que a melhor estratégia será a que se adapta à situação epidemiológica do efetivo em análise (Fort, 2009).

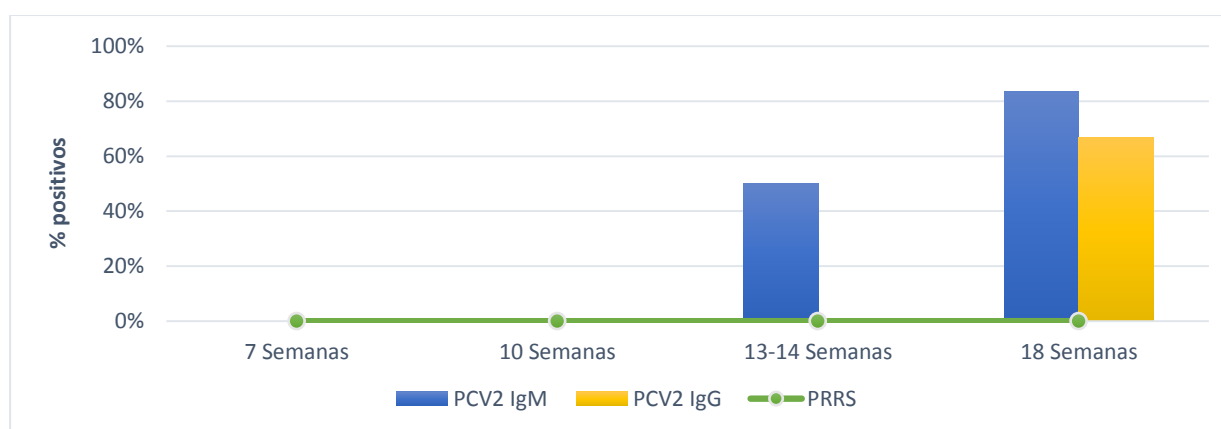
Um dos pontos de biossegurança que deverá merecer atenção prende-se, com os cuidados dos procedimentos da administração de vacinas. O uso de vacinas não é inócuo e pode originar reações adversas, pelo que, o manuseamento, armazenamento e aplicação de vacinas deve ser o correto, seguindo as especificações do fabricante em relação às condições de armazenamento (temperatura, luminosidade, humidade relativa, prazo de validade), à posologia, via de administração e dose. Relativamente ao equipamento utilizado nas vacinações, deve ser limpo e esterilizado regularmente e devem ser utilizadas agulhas descartáveis (Sañudo, Jimeno & Cerviño, 2008).

É de ressaltar que a adição de adjuvantes, às vacinas inativadas pode originar reações adversas no local de injeção ou toxicidade sistémica, podendo também induzir reações de hipersensibilidade (Parker, Deville, Dupuis, Bertrand, & Aucouturier, 2009). De acordo com alguns estudos experimentais, estes acontecimentos podem levar à progressão de infeção do PCV2 e lesões características de PMWS (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007). As reações adversas estão descritas para adjuvantes oleosos solúveis em água e adjuvante de hidróxido de alumínio, principalmente em animais imunodeprimidos (Hoogland, Opriessnig & Halbur, 2006). A decisão da utilização de vacinas deverá ser ponderada nos casos de PMWS, em que a vacinação é necessária e a mudança para uma vacina com adjuvante menos agressivo deverá ser considerada.

3 OBJETIVOS

Em estudo prévio realizado, no início do mês Março de 2013, para rastreio da infeção por PCV2 na exploração em estudo, foram recolhidas um total de 24 amostras de sangue de suínos, às 7, 10, entre as 13-14 e às 18 semanas de idade. As amostras foram analisadas pelo método ELISA, para a deteção e quantificação das imunoglobulinas IgM e IgG anti-PCV2. Foi realizada uma comparação destes valores no sentido de monitorizar e determinar o momento de infeção por PCV2. As amostras recolhidas às 7 e 10 semanas não revelaram anticorpos anti-PCV2. Às 13-14 semanas de idade observou-se que 50% das amostras analisadas apresentavam IgM e ausência de IgG, e às 18 semanas de idade verificaram-se 67% de amostras positivas para IgG e 83% de amostras positivas para IgM. De acordo com os resultados obtidos, considerou-se o início da circulação de PCV2 a partir das 10-11 semanas de idade dos suínos, em virtude de se considerar que a IgM é detetada cerca três semanas depois ocorrência da infeção (Segalés et al., 2005; Opriessnig et al., 2007). Simultaneamente foi feito o rastreio de infeção por PRRSV nas amostras estudadas, pela pesquisa de anticorpos, tendo revelado ausência de circulação deste vírus (Figura 3).

Figura 3 - Percentagem de amostras positivas a IgM, IgG e PRRS (Resultados da Merial Portuguesa-Saúde animal, LMD)



Os dados acima descritos permitem considerar que a exploração em estudo era negativa a PRRS e positiva a PCV2, embora os suínos não apresentassem sinais clínicos e nunca tivessem sido vacinados contra o PCV2 ou PRRS.

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar se a aplicação de vacina contra PCV2 teria efeito sobre diferentes parâmetros produtivos nos animais da exploração em situações em que são implementadas boas práticas de manejo e sanidade.

Com esta finalidade foram desenvolvidos os seguintes estudos:

1. Comparação de parâmetros produtivos de ganho médio diário (GMD), peso médio (PM) e peso total (PT) e ainda pelo registo da mortalidade, em animais vacinados e não vacinados das unidades de recria e engorda.

2. Avaliação das medidas gerais de manejo e de biossegurança da exploração em estudo utilizando um formulário disponível “online” (Biochek).
3. Avaliação sumária de custos de vacinação e seu impacto na rentabilidade da exploração.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Exploração, animais e instalações

O presente estudo realizou-se na Agropecuária do Ramalhão S.A no concelho de Alcácer do Sal, distrito de Setúbal, com uma área total de 3.629 m² (Figura 4). Apresenta uma atividade produtiva dedicada à exploração suínica e bovina. Esta Agropecuária iniciou a atividade suínica em 2000, com características de regime intensivo em ciclo fechado. Dedicar-se à produção de leitões para recria e acabamento na própria exploração (Figura 5). À data da realização do estágio, decorrido entre Março e Outubro de 2013, a exploração tinha um total de 2292 porcos incluindo 220 reprodutoras e 7 varrascos. A genética da exploração baseia-se em reprodutoras F1, que resultam do cruzamento de fêmeas *Large-white (LW)* com machos *Landrace (LR)*, e varrascos híbridos (RAM2) resultantes do cruzamento de fêmeas *Duroc* com machos *Pietrain*, com origem nesta exploração. Existe uma sala de recolha de sémen e um laboratório de inseminação artificial, onde se realiza a análise de sémen e a preparação e conservação das doses seminais. As reprodutoras são rejeitadas quando os índices de prolificidade e fertilidade começam a diminuir. Os varrascos são rejeitados quando começam a evidenciar défices de fertilidade, falta de líbido ou dificuldade de monta.

Figura 4 - Imagem satélite da Agropecuária do Ramalhão



Figura 5 - Agropecuária do Ramalhão



4.1.1 Caracterização das instalações

O ensaio decorreu nas unidades de recria e engorda. Foram selecionados grupos de leitões provenientes do desmame para o setor de recria. Estes grupos mantiveram-se inalteráveis até à saída para abate. As instalações, onde as leitões permaneceram durante a recria são pavilhões com uma área de 71 m² cada. Cada pavilhão tem dois parques iguais e independentes com um corredor central. Cada parque tem a capacidade para alojar cerca de 35 leitões e é separado entre si por uma grade metálica, permitindo o contacto nasal e oral entre animais de parques adjacentes. O pavimento é constituído por estrados de PVC (Figura 6). Cada parque dispõe de dois comedouros e bebedouros automáticos, sendo a alimentação distribuída automaticamente duas vezes por dia. O aquecimento é efetuado por termoventiladores elétricos e o controlo ambiental (temperatura e ventilação) é realizado por um dispositivo eletrónico devidamente programado (Figura 7).

Figura 6 - Instalações de recria



Figura 7 - Dispositivo regulador de temperatura e ventilação na recria



Aquando da passagem dos leitões da recria para a engorda, existe uma balança para a sua pesagem (Figura 8). Logo após o desmame, é fornecida aos leitões, uma vez por dia, farinha húmida num comedouro de prato durante 15 dias e simultâneamente granulado, para que a adaptação ao novo sistema de alimentação seja mais fácil. Os leitões permanecem nestas instalações até às 9/10 semanas de idade. Após este período os leitões são transferidos para a unidade de engorda. Cada pavilhão apresenta uma área de 84 m² e é composto por dois parques iguais e independentes, separados por um corredor central, tendo cada parque capacidade para alojar cerca de 35 porcos (Figura 9). O pavimento é constituído por grelhas de cimento para escoamento das fezes e urina. A ventilação é assegurada por um sistema estático com janelas de abertura regulável e não existe sistema de aquecimento. Cada parque possui dois comedouros e bebedouros automáticos. Durante esta fase os porcos são alimentados duas vezes por dia com alimento composto para porcos indicados para esta fase

produtiva. A unidade de engorda está também equipada com uma balança para a pesagem dos animais.

Figura 8 - Balança para pesagem de leitões (vista posterior A e vista lateral B)



Figura 9 - Instalações da engorda



O setor da maternidade é composto por 5 pavilhões, sendo que cada um tem 99,4 m² com capacidade para alojar 16 porcas e respetivas ninhadas em maternidades individuais com 4 m² (Figura 10). As maternidades individuais estão ainda equipadas com dois bebedouros, um para cada porca, ao lado do comedouro e outro para os leitões, que permitem a livre ingestão de água sendo as tetinas de fácil acesso e acionadas com o focinho.

Figura 10 - Instalações da maternidade (Vista geral do pavilhão A e vista de cela B)



A alimentação dos leitões é feita pela ingestão de colostro logo nas primeiras 24-36h após o parto, e o consumo de leite em intervalos regulares durante o dia e a noite até ao desmame. Na segunda semana, é distribuída a ração pré-starter (com composição semelhante ao leite da porca – com elevados teores de proteína de boa qualidade, de gordura vegetal e de energia, mas baixo teor em fibra) e permitindo a livre ingestão de água pelos leitões, para não condicionar o consumo de alimento.

4.1.2 Caracterização da exploração relativamente a medidas gerais de manejo, biossegurança e vacinação

A exploração em estudo apresenta um bom isolamento exterior, é duplamente vedada, com delimitação em três zonas: a zona limpa (corresponde ao interior da exploração), a zona suja (corresponde ao exterior) e uma zona semi-limpa (área intermédia, onde estão localizados os silos - Figura 11). Nas instalações, o uso de botas e fato-macaco é obrigatório tanto para trabalhadores como para visitantes, dispõe de uma lavandaria própria e de balneários masculino e feminino para que as pessoas tomem banho à entrada e saída da exploração. Existe também um pedilúvio à entrada e à saída dos balneários. Quanto às questões de higienização, limpeza e desinfecção, é feita em todas as fases produtivas sem que a produção seja interrompida (havendo um fluxo unidirecional dos suínos pelas diferentes fases produtivas). O cais de desembarque encontra-se afastado dos pavilhões. Existe um programa de controlo de roedores, de insetos e de aves. Os animais que morrem na exploração são incinerados. Esta exploração está sanitariamente bem controlada.

Figura 11 - Separação de zonas, limpa, semi-limpa e suja, na exploração



No plano profilático vacinal, as vacinas administradas a todo o efetivo reprodutor são contra a doença de *Aujeszky* (exceto leitões até ao desmame); *Parvovirose* e *Mal Rubro* (porcas durante a lactação e varrascos de 5 em 5 meses); *Escherichia coli* e *Rinite Atrófica* (às marrãs – 6ª e 2ª semanas antes do parto e porcas 2ª semana antes do parto). O anti-helmíntico *Ivermectina*® é utilizado como desparasitante em todo o efetivo reprodutor e em varrascos (duas vezes por ano). Os leitões são vacinados contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (ao 3º dia de vida) e de *Aujeszky* (ao desmame). Para além das vacinações é administrado aos leitões por rotina, ferro (dos 0 aos 3 dias após o parto).

Nesta exploração a lavagem das instalações é feita com água quente, detergente, escovas e utilizando um aparelho aspersor de água a pressão elevada. De seguida, é realizada a desinfeção (com agentes oxidantes e fenóis). São aplicados os procedimentos de limpeza, desinfeção e vazio sanitário a todas as instalações após a saída dos animais, diminuindo a possibilidade de transmissão de doenças entre animais em diferentes fases produtivas. Cada um dos parques dispõe de fossas sob o solo onde são recolhidos e armazenados os dejetos. Cada uma destas fossas é escoada para uma fossa comum afastada dos pavilhões.

Nos setores de recria e engorda o controlo ambiental é feito automaticamente através de exaustores colocados nas paredes do fundo e 2 sondas que controlam as taxas de humidade e amoníaco.

4.2 Desenho experimental

O estudo comparativo de parâmetros de produtividade (GMD, PM, PT) e de mortalidade entre leitões vacinados e não vacinados realizou-se em 336 animais, divididos em 10 lotes, dos quais 5 lotes (total de 169 animais) foram vacinados e 5 lotes não foram vacinados (total de 167 animais).

Todos os lotes foram sujeitos às mesmas condições de alojamento e todos receberam o mesmo alimento e foram sujeitos às mesmas práticas de manejo.

Cada lote foi pesado no final de três fases diferentes:

1. Desmame (28 dias);
2. Recria (~70 dias);
3. Engorda (150-180 dias).

O processo global de avaliação dos dois grupos (vacinados e não vacinados) ficou concluído em cerca de sete meses. O número de animais variou nos diferentes lotes, consoante a disponibilidade de leitões ao desmame (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Caracterização dos lotes vacinados

Lote	Animais	Data início da análise	Data final da análise
1	35	27-03-2013	14-08-2013
3	35	10-04-2013	26-08-2013
5	35	24-04-2013	09-09-2013
7	33	08-05-2013	23-09-2013
9	31	22-05-2013	07-10-2013

Tabela 6 - Caracterização dos lotes não vacinados

Lote	Animais	Data início da análise	Data final da análise
2	35	03-04-2013	19-08-2013
4	35	17-04-2013	02-09-2013
6	35	02-05-2013	17-09-2013
8	27	15-05-2013	01-10-2013
10	35	29-05-2013	14-10-2013

Apenas foram usadas leitoas neste estudo. Os leitões machos são vendidos para restauração. A seleção da amostra de leitoas foi feita aleatoriamente de acordo com o tamanho e conformação corporal. No grupo de teste, às leitoas, foi-lhes administrada a vacina inativada (CIRCOVAC®), aos 28 dias de idade, na tábua do pescoço por via intramuscular, numa única dose de 0,5 ml. A vacina tem início da imunidade às 2 semanas e a duração da imunidade ocorre, pelo menos, até 14 semanas após a vacinação. Considerando este facto o protocolo de vacinação de leitões permite proteger os animais até ao final do período de engorda.

Todos os lotes de leitoas foram observados algumas horas após a vacinação, para deteção de eventuais reações adversas vacinais, nomeadamente reações locais no ponto de injeção

(tumefações duras), hipersensibilidade, depressão ou diminuição da ingestão de alimento e água. Nesta avaliação, não foi registada qualquer reação adversa vacinal.

Tanto na recria como na engorda, em ambos os grupos estudados, verificou-se a ocorrência de diarreia, emagrecimento e atraso de crescimento. Os animais com estes quadros foram transferidos para a enfermaria e tratados com antibiótico Baytril® 5%, de administração intramuscular. De acordo com o protocolo, alguns animais mais debilitados foram retirados dos respetivos lotes e acabaram por morrer, nunca recuperando o peso normal.

4.3 Questionário de avaliação de biossegurança da exploração pelo biochek

Para melhor compreensão do nível de biossegurança existente na exploração, foi realizado um questionário designado como “*Biochek*”. Este consiste num conjunto de questões de resposta rápida sobre biossegurança externa e interna. O questionário foi desenvolvido pela Unidade de Epidemiologia da Faculdade de Veterinária de Ghent, após vários anos de investigação científica em biossegurança em explorações suínicas e aviários, sendo atualizado periodicamente. É uma ferramenta de pontuação ponderada (atribuindo-se cotações às perguntas, consoante o seu grau de importância). Depois de preenchido o questionário obtém-se uma pontuação e um relatório do desempenho da exploração.

Este questionário tem o intuito de despertar os produtores para a importância da biossegurança nas explorações, de modo a poderem melhorar os pontos críticos, onde existem maiores deficiências e, assim diminuir os riscos de entrada ou disseminação de agentes patogénicos, levando a um controlo de infeções e a uma melhoria da produtividade, fornecendo animais sãos e sem riscos para a saúde pública.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram inseridos e analisados estatisticamente no Software Microsoft Office Excel 2007© e exportados para o programa SPSS13.0®. O parâmetro produtivo GMD foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$GMD = \frac{\text{peso final do animal} - \text{peso inicial}}{\text{n}^{\circ} \text{ de dias entre as duas pesagens}}$$

Os dados foram tratados estatisticamente pelo método não paramétrico (teste Mann-Whitney para amostras independentes), pois os parâmetros do ensaio não cumpriam os pressupostos de normalidade dos testes paramétricos. Utilizou-se um nível de significância de 0,05.

A análise dos dados, médias e desvios padrão, foi realizado com base em métodos de estatística descritiva utilizando o programa Microsoft® Office Excel 2007.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Relativamente ao desvio padrão:

- É sempre não negativo e será tanto maior, quanta mais variabilidade houver entre os dados.
- Se $s = 0$, então não existe variabilidade, isto é, os dados são todos iguais.

O teste de Qui-Quadrado foi aplicado para a análise da mortalidade entre animais vivos e mortos. A significância foi estabelecida para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Pesos totais e médios dos lotes vacinados e não vacinados

Os resultados obtidos no trabalho são apresentados nas tabelas 7 (lotes vacinados) e 9 (lotes não vacinados). Também o registo do número de mortes encontram-se nas tabelas abaixo (tabelas 8 e 10).

Tabela 7 - Resultados dos pesos totais e médios dos lotes vacinados

Lote	Desmame			Recria			Engorda		
	Dias	Peso Total (kg)	Peso médio (Kg)	Dias	Peso Total (Kg)	Peso Médio (Kg)	Dias	Peso Total (kg)	Peso Médio (Kg)
1	28	257	7	48	1055	30	93	3147	90
3	28	269	8	48	962	27	91	3097	88
5	28	254	7	49	621	18	90	2893	83
7	28	211	6	48	800	26	91	2707	90
9	28	230	7	48	804	26	91	2786	93
Valores médios									
-	-	244	7	-	848	25	-	2926	89

Pelos resultados apresentados na tabela 7, verificamos o seguinte:

- Ao desmame, a média dos pesos médios (PM) foi de 7 kg.
- Na recria, média dos PM foi de 25 kg.
- Na engorda, média dos PM foi de 89 kg.

- No desmame o máximo valor obtido no PM pertence ao lote 3 e o PM mínimo pertence ao lote 7.
- Na recria, o lote 1 apresenta o máximo valor obtido de PM, porém o lote 5 é o que revela o mínimo valor de PM.
- Na engorda, o valor máximo de PM pertence ao lote 9 e o mínimo valor obtido de PM pertence ao lote 5.

Tabela 8 - Registo do número de mortos dos lotes vacinados

Lote	Desmame	Recria	Engorda	Sinais clínicos	Outras causas	Total
1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
7	0	2	1	2 (recria)	1	3
9	0	0	1	0	1	1

- Registaram-se 4 mortes no total dos lotes vacinados (Tabela 8). Os lotes 7 e 9 foram os únicos afetados. Na recria apresentaram um quadro clínico de diarreia, emagrecimento e atraso de crescimento. Na engorda a causa da morte ficou a dever-se a escoriações resultado de lutas.

Os resultados dos PT e PM dos lotes não vacinados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados dos pesos totais e médios dos lotes não vacinados

Lote	Desmame			Recria			Engorda		
	Dias	Peso Total (Kg)	Peso Médio (Kg)	Dias Recria	Peso Total (Kg)	Peso Médio (Kg)	Dias	Peso Total (kg)	Peso Médio (Kg)
2	28	242	7	48	894	26	91	2979	85
4	28	283	8	48	957	27	91	3162	90
6	28	277	8	47	805	24	92	3127	95
8	28	194	7	48	583	25	92	1912	91
10	28	259	7	48	898	26	91	3112	92
Valores médios									
-	-	251	7	-	827	26		2858	91

Pela observação da tabela 9 constata-se o seguinte:

- Ao desmame a média dos PM foi de 7 kg.
- Na recria a média dos PM foi de 26 kg.
- Na engorda a média dos PM foi de 91 kg.
- No desmame, o lotes 4 e 6 foram os que registaram o valor máximo de PM, e os lotes 2, 8 e 10 obtiveram o valor mínimo de PM.
- Na recria o lote 4 obteve o valor máximo PM, enquanto, o lote 6 foi o que registou o valor mínimo de PM.
- Na engorda, o lote 6 apresentou o valor máximo de PM, no entanto, o valor mínimo de PM pertence ao lote 2.

Tabela 10 - Registo do número de mortes dos lotes não vacinados

Lote	Desmame	Recria	Engorda	Sinais clínicos	Outras causas	Total
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	2	0	0	2	2
8	0	4	2	5 (4 recria + 1 engorda)	1	6
10	0	0	1	0	1	1

- Pela análise da tabela 10 verifica-se que os lotes não vacinados registaram 9 mortos. Tendo sido afetados os lotes 6, 8 e 10.
- O lote 6 registou 2 mortos na recria, que tiveram como causa escoriações devido a luta.
- O lote 8 foi o que apresentou maior número de mortes, nomeadamente 4 mortos na recria e 2 na engorda. Na recria os animais evidenciaram um quadro clínico de diarreia, emagrecimento e atraso de crescimento. Na engorda, 1 dos mortos tinha sinais clínicos de diarreia, emagrecimento e atraso de crescimento, sendo que o outro foi morto por esmagamento.
- O lote 10 registou 1 morto na engorda, tendo como causa escoriações devido a luta.

A análise e a relação do número de vivos e mortos encontra-se na tabela 11.

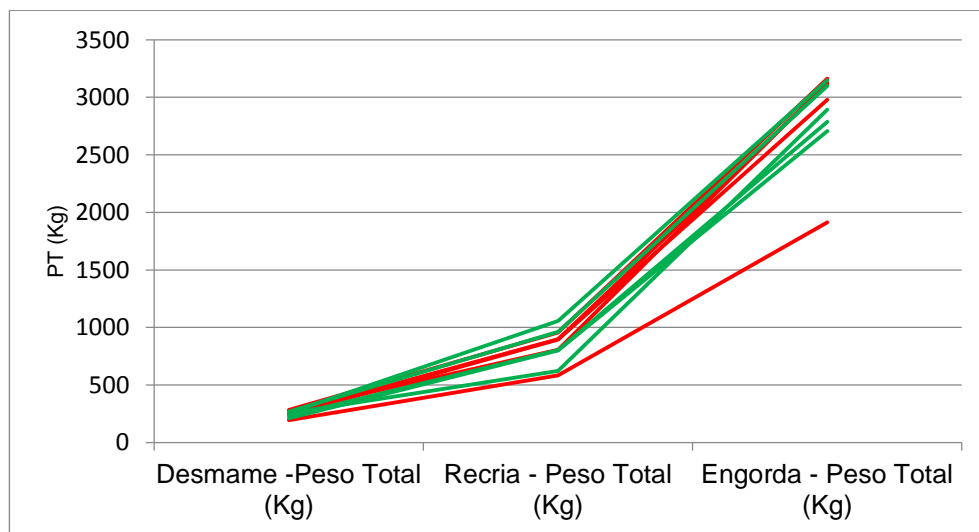
Tabela 11 - Avaliação do número de animais vivos e mortos nos grupos de estudo

Grupos	Vivos	Mortos	Valor de p
Não vacinados	162	5	
Vacinados	167	2	<0,05

A mortalidade foi mais elevada no grupo dos não vacinados (5 mortos em 167) do que no grupo dos vacinados (2 mortos em 169). Contudo, a análise estatística efetuada não revelou a existência de diferenças significativas entre animais vivos e mortos (teste Qui-quadrado; $P=0.2453$) (Anexo 1).

Comparando os lotes vacinados e não vacinados (Figura 12), constatou-se que os pesos totais seguem uma distribuição normal, ou seja, verificou-se que, nas diferentes fases de produção, apresentam pesos totais semelhantes.

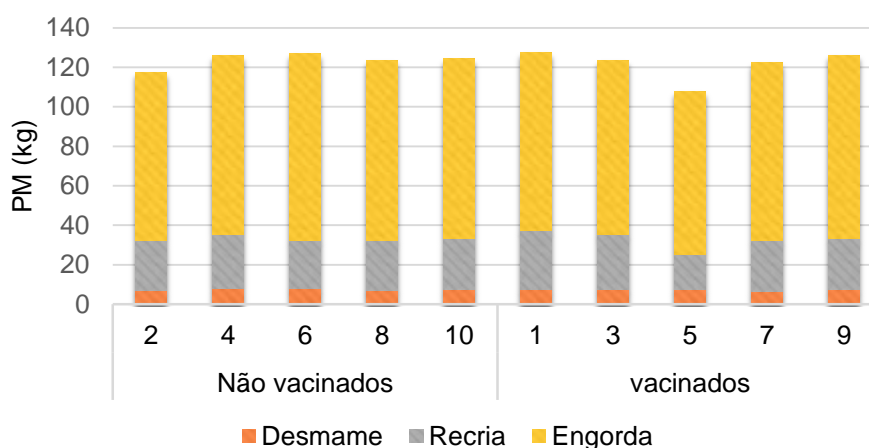
Figura 12 - Comparação dos pesos totais entre lotes vacinados e não vacinados



O lote 8 (não vacinados), desvia-se da média da amostra, isto porque foi o que teve maior número de mortes e por, desde o início, apresentar um peso total mais baixo em relação a todos os outros lotes.

Na figura 13 compararam-se os PM nas diferentes fases produtivas.

Figura 13 - Comparação dos pesos médios entre lotes vacinados e não vacinados



Os valores dos PM, tanto dos lotes não vacinados como dos lotes vacinados, aproximam-se uns dos outros. Não se observa grande variação de valores nas diferentes fases produtivas.

A tabela 12, mostra o desvio padrão, dos lotes não vacinados e vacinados, nas fases de recria e engorda, relativamente aos pesos médios registados.

Tabela 12 - Desvio padrão dos pesos médios dos lotes vacinados e não vacinados

Lotes	Recria	Engorda
Não vacinados	1,07	3,48
Vacinados	4,63	3,80

Verifica-se que, os lotes de animais, tanto na recria como na engorda, são homogêneos, não havendo uma dispersão dos valores dos PM em relação à média (Tabela 12). No entanto, na recria observou-se uma mínima variação dos PM, com os lotes vacinados a sofrerem maiores oscilações, em relação à média, do que os lotes não vacinados, porém, sem qualquer significância.

5.2 Comparação do ganho médio diário entre grupos

O GMD por animal (g/dia) é um parâmetro indicador do potencial de ganho de peso do crescimento médio diário do animal.

Tabela 13 - GMD dos lotes

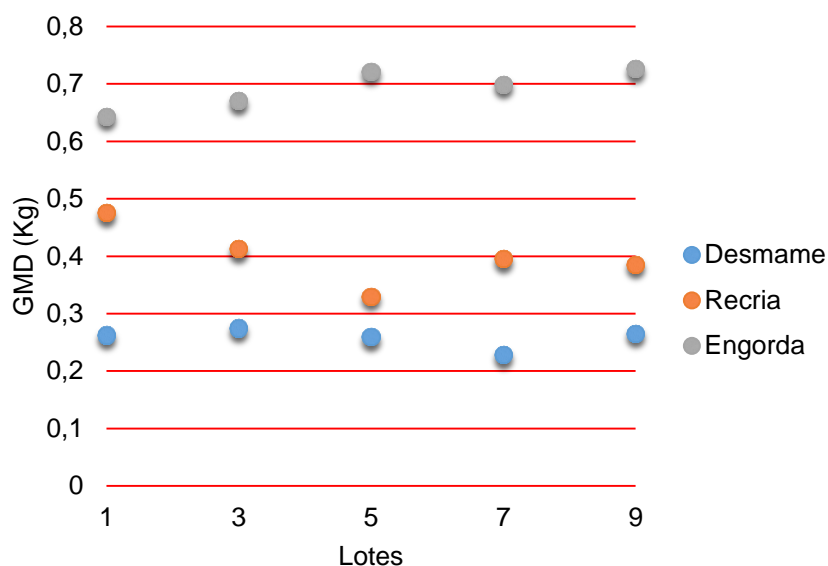
Vacinados			Não vacinados		
Lote	Recria	Engorda	Lote	Recria	Engorda
1	0,48	0,64	2	0,39	0,65

3	0,41	0,67	4	0,4	0,69
5	0,33	0,72	6	0,34	0,76
7	0,4	0,7	8	0,35	0,69
9	0,39	0,73	10	0,38	0,72

Tanto nos lotes vacinados como nos lotes não vacinados, os animais apresentam um GMD superior a 650g na engorda, exceto o lote 1 que apresenta menos 100g (Tabela 13). Recorrendo ao teste não paramétrico (teste Mann-Whitney), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas dos GMD entre os lotes vacinados e os lotes não vacinados, tanto para a recria como para a engorda, para um nível de significância $\alpha=0,05$ (Anexo 2).

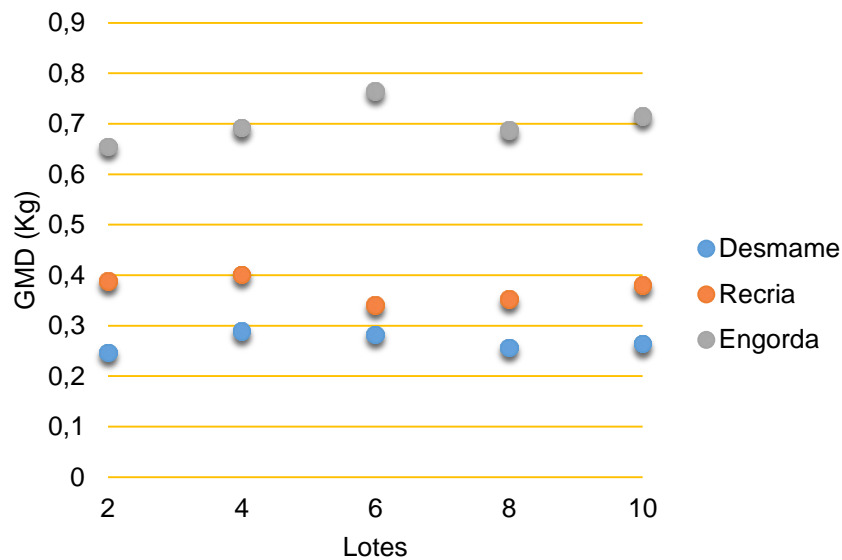
As figuras 14 e 15 exibem o GMD dos animais, dos lotes vacinados e não vacinados, respetivamente.

Figura 14 - GMD dos lotes vacinados nas várias fases produtivas



É curioso observar, que o lote 1 destaca-se de todos os outros lotes na fase da recria com um GMD superior, no entanto, foi o que obteve menor GMD na engorda, e apesar do lote 5 apresentar um GMD na recria inferior a todos os outros lotes, foi o que apresentou melhor GMD na engorda. Ainda assim, existe uma semelhança dos valores dos GMD dos diferentes lotes.

Figura 15 - GMD dos lotes não vacinados nas várias fases produtivas

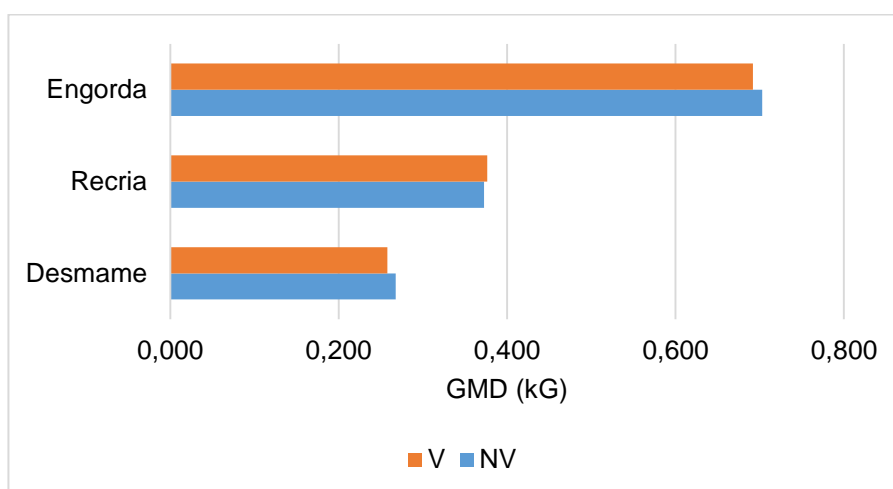


Apesar do lote 6 ter sido o que registou na recria um GMD inferior a todos os outros lotes, foi o que obteve melhor GMD na engorda. Contudo todos os lotes mantêm uma uniformidade constante ao longo das várias fases produtivas.

É curioso observar, que o lote 1 destaca-se de todos os outros lotes na fase da recria com um GMD superior, no entanto, foi o que obteve menor GMD na engorda, e apesar do lote 5 apresentar um GMD na recria inferior a todos os outros lotes, foi o que apresentou melhor GMD na engorda. Ainda assim, existe uma semelhança dos valores dos GMD dos diferentes lotes.

A figura 16 mostra os resultados dos GMD de todos os lotes vacinados e não vacinados, nas diferentes fases produtivas.

Figura 16 - GMD obtidos no desmame, recria e engorda



Pode-se constatar que, o GMD na recria foi superior nos animais vacinados comparativamente aos animais não vacinados. Quanto à engorda, observa-se o contrário, os animais não vacinados obtiveram GMD superior aos animais vacinados. No entanto, a diferença de valores registada, tanto na recria como na engorda, é pequena, sendo a diferença, na recria, de 5g e, na engorda de 11g.

A tabela 14 mostra o desvio padrão dos GMD dos lotes vacinados e não vacinados, tanto na recria como na engorda.

Tabela 14 - Análise do desvio padrão dos lotes vacinados e dos lotes não vacinados

Lotes	Recria	Engorda
Vacinados	0,03	0,02
Não vacinados	0,10	0,02

Os valores obtidos nos lotes vacinados e nos lotes não vacinados demonstraram que existe um grau de variabilidade baixo em que todos os valores se aproximam das médias dos GMD. Neste sentido, os valores obtidos não acompanham uma dispersão dos pesos médios dos GMD, o que apoia os resultados da análise feita pelo teste Mann-Whitney.

5.3 Questionário biochek

O questionário de avaliação de biossegurança da exploração, dividiu-se em vários temas, em que, cada tema apresenta um conjunto de questões, relativas tanto à biossegurança interna como à externa (Anexo 3).

Os resultados obtidos na biossegurança externa, revelaram uma pontuação total de 91% (a pontuação média de referência é de 71%) (Tabela 15) e na biossegurança interna uma pontuação total de 87% (a pontuação média de referência é de 65%) (Tabela 16).

A exploração apresenta uma boa pontuação nas medidas de biossegurança, refletindo o seu isolamento do exterior e no controlo de eliminação de agentes patogénicos no seu interior.

Tabela 15 - Resultados do questionário biochek relativamente à biossegurança externa

Número do tema	Descrição do tema	Pontuação	Média de referência
1	Compra de animais e sêmen	100%	90%
2	Transporte de animais, remoção de estrume e animais mortos	65%	71%
3	Alimentação, água e equipamentos	100%	50%
4	Trabalhadores e visitantes	100%	68%
5	Controlo de parasitas e pássaros	90%	71%
6	Contolo ambiental	100%	55%
Nota Final		91%	71%

De seguida dos vários temas abordados, na tabela 15, é feita uma descrição sumária dos mesmos:

Tema 1: A substituição do efetivo é feita a partir de animais da própria exploração e sempre que necessário proceder-se-á à importação de sêmen fresco ou congelado, nacional ou estrangeiro, mas sempre de comprovado estatuto sanitário.

Tema 2: Todas as fossas da exploração escoam para uma fossa comum afastada dos pavilhões. O cais de desembarque encontra-se na zona semi-limpa, afastado dos pavilhões. As pessoas que embarcam os animais não têm contacto com os trabalhadores da exploração. Os veículos de transporte de animais, não pertencem à própria exploração, no entanto, são feitos os procedimentos necessários, de modo a minimizar os riscos biológicos, tais como, as rodas dos veículos são desinfetadas utilizando rodilúvios e aspersores que permitem desinfetar a maior área possível da viatura.

O transporte de animais mortos até ao local de incineração foi o único ponto identificado com uma pontuação abaixo da média.

Tema 3: A água fornecida aos animais é de boa qualidade higiénica, preenchendo as mesmas exigências que a que se destina ao consumo humano. As análises de água são feitas periodicamente por rotina. É feito o controlo do alimento, aquando da sua compra, sendo verificado o estado de higiene, de frescura e o facto de conter ou não substâncias nocivas para a saúde dos animais. Não se utilizam antibióticos na alimentação dos animais.

Tema 4: O vestuário utilizado pelos trabalhadores e por pessoas externas pertence à própria exploração. A exploração dispõe de uma lavandaria própria e de balneários masculino e feminino para que as pessoas tomem banho à entrada e saída da exploração. Existe também

um pedilúvio à entrada e à saída dos balneários. Só visitas de carácter excepcional acedem à exploração.

Tema 5: Existe um programa de controlo de roedores e insetos. Os pavilhões estão também protegidos contra aves. É feita desparasitação periódica dos animais.

Tema 6: É feito o controlo ambiental (temperatura e ventilação), de acordo com as diferentes fases produtivas, havendo um controlo das taxas de humidade, amoníaco e temperatura.

Em relação à biossegurança interna da exploração, não foi apontado nenhum ponto crítico, pelo que, todas as pontuações obtidas, nos diferentes temas, registaram-se acima da média (Tabela 16).

Tabela 16 - Resultados do questionário biochek relativamente à biossegurança interna

Número do tema	Descrição do tema	Pontuação	Média de referência
1	Contolo de agentes patogénicos	100%	70%
2	Gestação e maternidade	71%	61%
3	Recria	86%	72%
4	Engorda	93%	67%
5	Medidas entre pavilhões e utilização de equipamentos	61%	51%
6	Limpeza e desinfeção	100%	52%
Nota Final		87%	65%

De seguida, é feita uma breve descrição dos vários temas que constam na tabela 16:

Tema 1: A exploração não compra animais. Realiza testes serológicos periodicamente.

Tema 2: Antes da entrada na maternidade, as pocas são devidamente lavadas, incluindo as glândulas mamárias, a região genital e as unhas. A realização de adoções cruzadas só se faz nas primeiras 24h de vida. A maternidade está devidamente limpa, seca e desinfetada (incluindo as respetivas fossas) e é feito o vazio sanitário, para receber as pocas da gestação.

Tema 3: Não há mistura de lotes diferentes de animais. Os parques permitem uma boa drenagem dos dejetos e é assegurada uma boa ventilação. A densidade animal é a adequada (3 leitões/ m²).

Tema 4: Não se misturam animais de diferentes lotes. A densidade animal é a adequada (0,75 m²). Existe uma boa qualidade de ar.

Tema 5: As galochas e as mãos são lavadas sempre que nos dirigimos a diferentes pavilhões. Todo o equipamento utilizado (p.e. nas vacinações – as seringas) é lavado e desinfetado.

Tema 6: São feitos os procedimentos de limpeza, desinfeção e vazio sanitário nos diferentes pavilhões.

5.4 Custos de vacinação

A aplicação da vacina CIRCOVAC® deve ser considerada após a realização de uma análise adequada, calculando qual o custo-benefício da vacina.

Tabela 17 - Custo da vacina entre os lotes vacinados e não vacinados

Grupo	Número de Porcos	Preço carcaça (€/kg)	Valor do lote em carcaça (€)	Valor com despesa da vacina (€)	Valor Final do lote (€)	Valor por porco (€)
Não vacinados	158	0,975	13,935	-	13,934	88.19
Vacinados	165	0,975	14,264	14,124	14,124	85.60

No período do ensaio, os suínos abatidos eram pagos a um preço estimado de 1,30 € / Kg carcaça, definido em função do mercado da bolsa. O valor do preço da carcaça apresentado na tabela 17, corresponde $1,30 \text{ € / Kg} \times 0,75\%$ (rendimento da carcaça).

O custo de uma embalagem da vacina CIRCOVAC®, é de 70 €, (equivalente a 100 animais), pelo que, foram utilizadas duas embalagens da vacina.

Verifica-se que o valor do lote em carcaça (peso total do grupo \times preço da carcaça) é superior nos lotes vacinados pois, o grupo dos animais vacinados obtiveram um PT superior ao grupo dos animais não vacinados. No entanto, o valor por porco (valor final do lote / nºporcos) foi superior nos animais não vacinados, obtendo um lucro total de 2,59 € em relação aos animais vacinados.

6 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo da PMWS, causada por PCV2 reveste-se de grande interesse pela sua dispersão e pelo seu impacto na produtividade das explorações suinícolas, sendo responsável por enormes prejuízos económicos.

É uma doença que afeta o sistema imunológico dos suínos e de difícil reprodução experimental, o que sugere a necessidade de fatores adicionais ou infeções associadas para o desencadeamento do quadro clínico.

O PCV2 é o agente causal necessário, mas não suficiente, para a expressão clínica de PMWS existindo co-fatores que, em conjunto com o PCV2, fazem despoletar a doença, nomeadamente o vírus PRRS e deficiências de biossegurança. A utilização de vacinas para o controlo da PMWS é questionável e, segundo alguns autores, é dispensável se os fatores de risco forem controlados nas explorações.

O presente estudo foi realizado numa exploração negativa a PRRSV e em que se identificou a circulação de PCV2, na ausência de vacinação contra estes dois agentes. Neste contexto o trabalho teve como objetivo principal avaliar se a aplicação de vacina contra PCV2 tem efeito sobre diferentes parâmetros produtivos nos animais da exploração em que são implementados requisitos de boas práticas de manejo e sanidade.

O estudo comparativo de parâmetros de produtividade (GMD, PM, PT) e de mortalidade entre leitoas vacinadas aos 28 dias de vida com a vacina inativada Circovac® e animais não vacinados da mesma faixa etária realizou-se num número expressivo de leitoas (336 animais).

A análise dos resultados obtidos, recorrendo ao teste não paramétrico Mann-Whitney, mostraram que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos GMD, sendo que ambos os grupos de animais apresentaram um GMD superior a 300g no final da recria, enquanto na engorda registaram um GMD acima dos 720g, dois lotes pertencentes ao grupo dos vacinados e em dois lotes do grupo dos não vacinados. Estes valores estão dentro dos parâmetros ótimos estabelecidos para produção industrial (Comunicação pessoal, Manuel F. Joaquim, 2016). O GMD mais baixo apresentado (640g), pertence a um lote vacinado, os restantes lotes obtiverem um GMD superior a 650g.

Registou-se um bom desempenho produtivo tanto nos grupos de leitoas vacinados como nos não vacinados sendo que na recria a diferença da média dos GMD entre os lotes vacinados e os não vacinados foi apenas de 5g, enquanto na engorda foi somente de 11g.

A produtividade em ambos os grupos de animais foi semelhante relativamente ao PM, apresentando resultados equiparados e, a análise do desvio padrão demonstra que, não há dispersão dos valores, em relação à média, nos diferentes lotes de animais vacinados e não vacinados. Trata-se de lotes homogêneos e com pouca variabilidade de valores dos PM.

Em relação aos PT, os registos indicam que os valores obtidos são muito semelhantes entre o grupo de animais vacinados e o grupo de animais não vacinados, apesar destes terem tido maior número de mortos.

A taxa de mortalidade registada (2%), na totalidade dos animais em estudo foi observada em animais com emagrecimento, atraso de crescimento e diarreia (resultados não apresentados). Sendo que, a maior percentagem de mortos situou-se na recria, com o grupo dos não vacinados a registarem um aumento de mortalidade duas vezes superior ao grupo dos vacinados. No entanto, de acordo com a análise estatística utilizando o teste de Qui-quadrado, as diferenças

registadas, entre animais mortos e vivos, não foram significativas ($P < 0,05$) (Anexo 1).

Tendo os grupos de estudo apresentado uma mortalidade de 2% e, pela análise retrospectiva dos dados no pós-desmame, da exploração em estudo, não houve um aumento da mortalidade, pelo que, pode ser considerada baixa, uma vez que, os registos dos índices de

mortalidade, em explorações afetadas pela doença, indicam que a mortalidade varia entre os 4-20% (Segalés & Domingo, 2002).

Relativamente à caracterização da exploração quanto a medidas gerais de manejo e biossegurança relativa a programas de vacinação, limpeza, desinfeção, verificou-se que eram tomadas todas as medidas recomendadas sem que ocorresse a interrupção do ciclo produtivo. Verificou-se ainda o controlo rigoroso e proteção dos suínos em relação a outros animais como roedores e insetos. Também a sua localização é a ideal, não existindo outras explorações pecuárias, salas de desmancha nem matadouros, num raio de 4km. Todo o efetivo tem origem na própria exploração, e é realizado um protocolo de inseminação artificial, utilizando sémen devidamente avaliado e preparado, em doses seminais, em instalações apropriadas da exploração. De facto, os resultados obtidos da análise do questionário “*Biochek*” revelaram que a exploração suinícola apresenta boas medidas de biossegurança, tendo obtido uma pontuação de 22% acima da média, na biossegurança interna, e de, 20% acima da média na biossegurança externa. Foi apontado um único ponto crítico, pelo questionário, relativamente à biossegurança externa, que diz respeito ao acondicionamento e transporte de animais mortos na exploração, pelo que, os animais deverão ser transportados até ao local onde irão ser submetidos a transformação ou incineração, em transporte estanque, devendo-se evitar a perda de líquidos orgânicos pelas aberturas naturais (Regulamento (CE) nº 1774/2002, de 3 de Outubro)

Quanto ao controlo ou eliminação de agentes patogénicos existentes no interior da exploração suinícola, o questionário revelou que são cumpridos os requisitos de vacinação e rastreios estipulados por lei, particularmente da doença de Aujeszky. São aplicados protocolos de limpeza e desinfeção adequados, sendo que, para a desinfeção, a exploração utiliza agentes oxidantes e fenóis que, segundo um estudo efetuado por Royer et al., 2001, reduziram significativamente os títulos virais de PCV2, a limitação do contacto entre animais (sobretudo entre indivíduos provenientes de diferentes ninhadas), a manutenção de ventilação (de acordo com a fase etária e peso vivo do animal (Anexo 4-Quadro A.1), temperatura ambiente (aceitável por faixa etária: Anexo 4-Quadro A.2) e densidade animal apropriadas (Anexo 4-Quadro A.3), uma boa nutrição e a realização de tratamentos antiparasitários e vacinação adequados. Este ensaio vem assim confirmar que, aplicando o maior número de recomendações, sugeridos por Madec et al., 2000, a todas as fases da produção suína, permitem a obtenção de uma produção mais segura e rentável. Um outro factor a ter em conta, é a exploração não tendo que comprar animais, impossibilita, desta forma, a introdução e transmissão de doenças entre animais em diferentes fases produtivas (APHIS, 2008; FAO, 2010). Contudo, a exploração compra sémen (em doses necessárias para inseminar aproximadamente 10 porcas) esporadicamente (de 3 em 3 anos) para quebrar a consanguinidade.

No presente ensaio, depois de efetuada uma análise ao custo global da vacina contra o PCV2 (CIRCOVAC®) e, partindo do pressuposto que ambos os grupos de animais ingeriram a mesma quantidade de alimento e foram sujeitos às mesmas condições de manejo, constatase que o preço (€) por porco (valor final do lote/Nº de porcos) foi mais elevado no grupo dos não vacinados (88.19 €), do que no grupo dos vacinados (85.60 €). Deste modo, e nas circunstâncias da exploração em estudo, a vacinação não traz vantagens económicas. Estes resultados, revelam que é importante investigar e identificar as estratégias de controlo mais rentáveis em explorações afetadas por PMWS e PCV2SI, já que a gravidade e os seus custos associados podem variar entre explorações (Alarcon et al., 2011).

Embora diferentes autores defendam que todos os animais de explorações suinícolas sem exceção, devam ser vacinados contra o PCV2, os resultados obtidos no presente trabalho relativamente aos parâmetros produtivos, índices de mortalidade e custos dispendidos com vacinação, nas condições rigorosas de biossegurança existentes, apontam para o facto de a aplicação da vacina não apresentar aparentemente mais-valia na exploração estudada.

Contudo, a avaliação das vantagens e desvantagens do uso de vacinas deve ser abordado caso a caso. Tratando-se de uma exploração em que o principal objetivo é a venda de animais vivos para o matadouro (para venda da carne), torna-se essencial satisfazer as necessidades do mercado de modo a conseguir vender o produto ao melhor preço e com os custos de produção mínimos tendo sempre presente a aplicação de medidas rigorosas de biossegurança e um trabalho de equipa eficiente entre o médico veterinário e os proprietários e funcionários da exploração.

Bibliografía

- Alarcon P., Velasova M., Mastin A., Nevel A., Stärk K & Wieland B. (2011). Farm level risk factors associated with severity of post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 182-191.
- Alarcon P., Rushton J & Wieland B. (2013). Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*, 110, 88– 102.
- Alarcon P., Rushton J., Nathues H & Wieland B. (2013). Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. Acedido em out.20, 2015, disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3652493/#!po=1.56250>.
- Allan G.M., McNeilly F., Cassidy J.P., Reilly G.A.C., Adair B., Ellis W.A & McNulty M.S. (1995). Pathogenesis of porcine circovirus: experimental infections of colostrums deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology*, 44, 49-64.
- Allan G.M., McNeilly F., Kennedy S., Daft B., Clarke E.G., Ellis J. A., Haines D. M., Meehan B. M & Adair B. M. (1998). Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal Veterinary Diagnostic Invest* 10, 3-10.
- Allan G.M., Kennedy S., McNeilly F., Foster J.C., Ellis J.A., Krakowka S.J., Meehan B.M & Adair. B.M. (1999). Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121, 1–11.
- Allan G.M & Ellis J.A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3–14.
- Allan GM, McNeilly F, Ellis J, Krakowka S, Meehan B, McNair I, Walker I & Kennedy S. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol* 145:2421–2429.
- Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). (2008). Biosecurity on U.S. Swine Sites. *Infosheets for Veterinary Services Centers for Epidemiology and Animal Health*.
- Andrada M., Fernández A., del Pozo M & Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2003). Neumonía Enzoótica. In: Curso Digital de Enfermedades Infecciosas Porcinas. Ed: Sánchez-Vizcaíno, J.M. CDrom. <http://www.sanidadanimal.info/curso>
- Arias, M., Sierra M.A & Sánchez-Vizcaíno J.M. (2003). Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino. In: Curso Digital de Enfermedades Infecciosas Porcinas. Ed: Sánchez-Vizcaíno, J.M. CDrom.
<http://www.sanidadanimal.info/curso/>
- Ariel P., Pablo P., Ana B., María A.Q., Danilo B., María I.C., Javier C., Mariana M., Agustina R., Marina D., Hector R.S & Carlos J. (2011). Genetic Characterization of Porcine Circovirus Type 2 from Pigs with Porcine Circovirus Associated Diseases in Argentina.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658546/>
- Barceló J. & Marco E. (1998). On farm biossecurity. In: Proceedings of the 15th International Pig *Veterinary Society*.

- Bishop S.P. (1972). Effect of aortic stenosis on myocardial cell growth, hyperplasia and ultrastructure in neonatal dogs. In: Dhalle, N.S. (Ed.), *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*. University Park Press, Baltimore, pp. 355–637.
- Blanchard P., Mahe´ D., Cariolet R., Truong C., Le Dimna M., Arnauld C., Rose N., Eveno E., Albina E., Madec F & Jestin A. (2003). An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Microbiology*, 94, 183–194.
- Brunborg I.M., Jonassen C.M., Moldal T., Bratberg B., Lium B., Koenen F & Schonheit J. (2007). Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 368-375.
- Carman S., McEwen B., DeLay J., van Dreumel T., Lulis P., Cai H & Fairles J. (2006). Porcine circovirus-2 associated disease in swine in Ontario (2004 to 2005). *Canada Veterinary Journal*, 47, 761–762.
- Ciacchi-zanella JR & Mores N. (2003). Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus type 2. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnica*, 55:522–527.
- Chae C. (2012). Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Veterinary Journal*, 194, 151–157.
- Chang H.W., Jeng C.R., Lin T.L., Liu J.J., Chiou M.T., Tsai C.Y., Chia M.Y., Jan T.R & Pang V.F. (2006). Immunopathological effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) on swine alveolar macrophages by in vitro inoculation. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 110, 207–219.
- Charerntantanakul W., Platt R., Johnson W., Roof M., Vaughn E & Roth J.A. (2006). Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 109, 99-115.
- Cheung A.K. (2006). Rolling-circle replication of an animal circovirus genome in a theta-replicating bacterial plasmid in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 80, 8686–8694.
- Cheung A.K., Lager K.M., Kohutyuk O.I., Vincent A.L., Henry S.C., Baker R.B., Rowland R.R & Dunham A.G. (2007). Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Archives. Virology*, 152 (5), 1035–1044.
- Choi C., Chae C & Clark E.G. (2000). Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 151–153.
- Clark E.G. (1996). Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. West Can. Assoc. Swine Practical*, 19–20.
- Clark E.G. (1997). Post-weaning multisystemic wasting syndrome. In: *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Swine Practical*, 28, p. 3.
- Coalson J.A & Leece. (1973). Influence of nursing intervals on changes in serum protein (immunoglobulin) in neonatal pigs. *Journal of animal science*, 36, 381-385.

- Cortey M., Olvera A., Grau-Roma L & Segales J. (2011). Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. *Veterinary Microbiology*, 149 (3–4), 522–523.
- Cságola A., Kecskem S., Kardos G., Kiss I & Tuboly T. (2006). Genetic characterization of type 2 porcine circoviruses detected in Hungarian wild boars. *Archives of Virology*, 151, 495-507.
- Darwich L., Balasch M., Plana-Duran J., Segales J., Domingo M & Mateu E. (2003a). Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *Journal of General Virology*, 84, 3453–3457.
- Darwich L., Pié S., Rovira A., Segalés J., Domingo M., Oswald I.P. & Mateu E. (2003b). Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Journal of General Virology*, 84, 2117- 2125.
- Darwich L., Segalés J. & Mateu E. (2004). Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Archives of Virology*, 149, 857-874.
- Darwich L., Segalés J., Resendes A., Balasch M., Plana-Durán J. & Mateu E. (2008). Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Research in Veterinary Science*, 84, 194-198.
- Darwich L. & Mateu E. 2012. Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). Review. *Virus Research*, 164, 61-67.
- Dargatz D. A., Garry F. B. & Traub-Dargatz J. L. (2002). An introduction to biossecurity of cattle operations. *Veterinary Clinic Food Animals Practical*, 18, 1-5.
- Decreto-Lei n.º 135/2003 de 28 de Junho. Diário da República – I Série-A. 3719-3724.
- Dorr P.M, Baker R.B, Almond G.W, Wayne S.R & Gebreyes W.A. (2007). Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *Journal of Veterinary Medicine Associated*, 230 (2), 244–250.
- Duan X, Nauwynck HJ & Pensaert MB. (1997). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary Microbiology*. 56, 9-19.
- Dupont K., Nielsen E.O., Bækbo P. & Larsen L.E. (2008). Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Veterinary Microbiology*, 128, 56-64.
- Ellis J., Krakowka S., Lairmore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S & McNeilly, F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 3–14.
- European Union Consortium on PCVD Research (2005). *PMWS case definition (Herd level)*. Acedido em Jan.9, 2016, disponível em: http://www.porcilspcv.com/documents/Final_pmws_case_definition_EU_October_2005.pdf.

European Medicines Agency (2010). *Porcilis PCV: EPAR - Product Information*. Acedido em Abr. 29, 2016, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000135/WC500061523.pdf.

European Medicines Agency (2011a). *Circovac: EPAR - Product Information*. Acedido em Abr. 29, 2016, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000114/WC500061517.pdf.

European Medicines Agency (2011b). *Ingelvac CircoFLEX: EPAR - Product Information*. Acedido em Abr. 29, 2016, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/veterinary/000126/WC500062388.pdf.

Finsterbusch T. & Mankertz A. (2009). Porcine circoviruses - small but powerful. *Virus Research*, 143, 177-183.

Firth C., Charleston M., Siobain D., Shapiro B & Holmes E. (2009). Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *Journal of virology*.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organisation for Animal Health/World Bank. (2010). *Good practices for biosecurity in the pig sector – Issues and options in developing and transition countries*. *FAO Animal Production and Health Paper*, 169, 11-41.

Fort M., Olvera A., Sibila M., Segalés J. & Mateu E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Veterinary Microbiology*, 125 (3-4), 244-255.

Fort M., Sibila M., Allepuz A., Mateu E., Roerink F. & Segalés J. (2008). Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine*, 26, 1063-1071.

Fort M. (2009). Characterization of immune responses to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection and vaccination in pigs. Ph.D. Thesis. Bellaterra: Centre de Recerca en Sanitat Animal, Universitat Autònoma de Barcelona.

Fraile L., Grau-Roma L., Sarasola P., Sinovas N., Nofrarías M., López-Jimenez R., López-Soria S., Sibila M. & Segalés J. (2012). Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*, 30, 1986-1992.

Franzo G., Cortey M., Olvera A., Novosel D., Marnie A.M.G., Biagini F., Segalés J & Drigo M. (2015). Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2): still a real challenge. Acedido nov 23, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4551364/#!po=2.27273>.

Gadd J. (2006). PMWS. In *Producción porcina*, John Gadd descubre Lo que los libros de texto no cuentan. Saragoça, Espanha: *SERVET*, 217-224.

Gan S. D., & Patel K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 12.

Gillespie J., Opriessnig T., Meng X.J., Pelzer K & Buechner-Maxwell V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1151-1163.

Giuseppe S., Federico M, Serena P, Barbara B, Domenico F, Carlo B, Laura F, Maria L.B, Giovanna G, Michele D, Paolo B, Davide L, Giorgio L, Thais V, Francois J, Gordon A, Cinzia B & Fabio O. (2012). Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54 -51.

Ghebremariam MK & Gruys E. (2005). PMWS in pigs with particular emphasis on the causative agent, the mode of the transmission, the diagnostic tools and the control measures. *A review. Veterinary Quarterly*, 27, 105–116.

Grau-Roma L., Crisci E., Sibila M., Lopez-Soria S., Nofrarias M., Cortey M., Fraile L., Olvera A & Segales J. (2008). A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. *Veterinary Microbiology*, 128 (1–2), 23–35.

Grau-Roma L., Hjulsgaard C., Sibila M., Kristensen C.S., López-Soria S., Enøe C., Casal J., Botner A., Nofrarias M., Bille-Hansen V., Fraile L., Baekbo P., Segalés J. & Larsen L.E. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Veterinary Microbiology*, 135 (3-4), 272-282.

Grau-Roma, L.; Fraile, L & Segalés, J. (2010). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. In: *The Veterinary Journal*.

Grau-Roma L., Fraile L. & Segalés J. (2011). Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *The Veterinary Journal*, 187, 23-32.

Guo L., Fu y., Wang y., Lu y., Weiy., Tang Q., Fan P., Liu J., Zhang L., Zhang F., Huang L, Liu D, Li S., Wu H & Liu C. (2012). A Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Mutant with 234 Amino Acids in Capsid Protein Showed More Virulence In Vivo, Compared with Classical PCV2a/b Strain. Acedido em julho 29, 2016, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041463>

Ha Y., Lee Y.H., Ahn K.K., Kim B. & Chae C. (2008). Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by prenatal porcine circovirus 2 infection and postnatal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *Veterinary Pathology*, 45, 842-848.

Harding J.C. (1996). Postweaning multisystemic wasting syndrome: preliminary epidemiology and clinical findings. *Proceedings West Canada Associated Swine Practival*, 21.

Harding J.C. & Clark E.G. (1997). Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Journal Swine Health Product*, 5, 201–203.

Harding J.C., Baker C.D., Tumber A., McIntosh K.A., Parker S.E., Middleton D.M., Hill J.E., Ellis J.A & Krakowka S. (2008). Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20 (3), 274–282.

Harding J. (2008). PCVD - Historical perspective and successful control [versão electrónica].

In *Proceedings of the Boehringer Ingelheim Satellite Symposium IPVS, 24 June, Durban, South Africa*, pp. 6-9. Acedido em Nov. 24, 2016 em:
<http://www.bivkorea.com/proceedings/Harding.pdf>.

Harding J.C., Baker C., Rhodes C., McIntosh K.A & Bonneau M. (2009). Ring tests to evaluate the performance of Porcine circovirus-2 (PCV-2) polymerase chain reaction (PCR) assays used in North American diagnostic laboratories. *Canada Journal Veterinary Research*, 73 (1), 7–14.

Hjulsager C.K., Grau-Roma L., Sibila M., Enoe C., Larsen L & Segalés J. (2009). Interlaboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples. *Veterinary Microbiology*, 133 (1–2), 172–178.

Hamel A.L., Lin L.L & Nayar G.P., (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal Virology*, 72, 5262–5267.

Hamberg A., Ringler S & Krakowka S. (2007). A novel method for the detection of porcine circovirus type 2 replicative double stranded viral DNA and nonreplicative single stranded viral DNA in tissue sections. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 135–141.

Harms P.A. (1999). Post-weaning multisystemic wasting syndrome—case studies. In: *Proceedings of the Seventh Annual Iowa Swine Disease Conference on Swine Practitioners*, 43–47.

Harms P. A, Sorden S. D, Halbur G. P, Bolin S. R, Lager K. M, Morozov I & Paul P. S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and PRRSV. *Veterinary Pathology*, 38, 528-539.

Harris H.D.L. (2010). Pig health and production - past, present, future. *Proceedings of the 21st IPVS Congress*, 1-6.

Henriques A.M., Duarte M., Fagulha T., Ramos F., Barros S.C., Luís T. & Fevereiro M. (2011). Molecular study of porcine circovirus type 2 circulating in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 2162-2172.

Hoogland M.J., Opriessnig T. & Halbur P.G. (2006). Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Journal of Swine Health and Production*, 14(3), 133-139.

Kim, H.B., Lyoo, K.S & Joo, H.S. (2009). Efficacy of different disinfectants in vitro against porcine circovirus type 2. *Veterinary Record*, 164 (19), 599–600.

Kixmoller M., Ritzmann M., Eddicks M., Saalmuller A., Elbers K & Fachinger V. (2008). Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. *Vaccine*, 26, 3443–3451.

Krakowka S., Ellis J., McNeilly F., Meehan B., Oglesbee M., Alldinger S & Allan G. (2004). Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multisystemic wasting disease. *Veterinary Pathology*, 41 (5), 471–481.

Kristensen C.S., Bækbo P., Bille-Hansen V., Bøtner A., Vigre H., Enøe C & Larsen L.E. (2009). Induction of porcine postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs from PMWS unaffected herds following mingling with pigs from PMWS affected herds. *Veterinary Microbiology*, 138 (3-4), 244-250.

- Langohr I.M., Stevenson G.W., Nelson E.A., Lenz S.D., HogenEsch H., Wei H. & Pogranichniy R.M. (2010). Vascular lesions in pigs experimentally infected with porcine circovirus type 2 serogroup B. *Veterinary Pathology*, 47, 140-147.
- Liu J., Chen I & Kwang J. (2005). Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*. 79 (13), 8262–8274.
- Lin W., Chien M., Wu P., Lai C. & Huang C. (2011). The porcine circovirus type 2 nonstructural protein ORF3 induces apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells. *Journal of virology*, 5, 148-153.
- Lopez-Soria S., Nofrarias M., Calsamiglia M., Espinal A., Valero O., Ramirez-Mendoza H., Minguez A., Serrano J.M., Marin O., Callén A & Segalés J. (2011). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background. *Veterinary Microbiology*, 149 (3–4), 352–357.
- López-Soria & Segales J. (2013). Propriedades do vírus PCV2 e suas implicações. Acedido em Abril 12, 2016, disponível em: <https://www.3tres3.com.pt/print/7127>.
- López-Soria S., Grau-Roma L & Segales J. (2008). Epidemiologia de la circovirosis porcina. *Suis*, 49, 14-23.
- López-Soria S., Nofrarías M., Calsamiglia M., Espinal A., Valero O., Ramírez-Mendoza H., Mínguez A., Serrano J.M., Marín O., Callén A & Segalés J. (2011). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field conditions is modulated by the pig genetic background. *Veterinary Microbiology*, 149 (2) 352–357.
- Lyou K., Joo H., Caldwell B., Kim H., Davies P.R & Torrison J. (2011). Comparative efficacy of three commercial PCV2 vaccines in conventionally reared pigs. *Veterinary Journal*, 189(1):58–62.
- Madec F., Eveno E., Morvan H., Hamon L., Blanchard P., Cariolet R., Amenna N., Morvan H., Truong C., Mahé D., Albina E. & Jestin A. (2000). Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Production Science*, 63, 223-233.
- Madson D.M., Ramamoorthy S., Kuster C., Pal N., Meng X., Halbur P.G & Opriessnig T. (2008). Characterization of shedding patterns of porcine circovirus types 2a and 2b in experimentally inoculated mature boars. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 725-734.
- Madson D.M., Ramamoorthy S., Kuster C., Pal N., Meng X., Halbur P.G & Opriessnig T. (2009). Infectivity of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally infected boars. *Veterinary Research*, 40 (1):10.
- Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G & Buhk H.J. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *Journal Virology*, 71, 2562-2566.
- McCullough K.C, Ruggli N. & Summerfield A. (2009). Dendritic cells - at the front-line of pathogen attack. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 7-15.

- McNeilly F., Kennedy S., Moffett D., Meehan B.M., Foster J.C., Clarke E.G., Ellis J.A., Haines D.M., Adair B.M & Allan G.M. (1999). 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). *Journal Virology Methods*, 80, 123–128.
- McNulty M., Dale J., Lukert P., Mandertz A., Randles & Todd D. (2000). Circoviridae. *Virus Taxonomy Academic Press, San Diego*, 299–303.
- Meehan B.M., McNeilly F., Todd D., Kennedy S., Jewhurst V.A., Ellis J.A., Hassard L.E., Clark, E.G., Haines D.M & Allan G.M. (1998). Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*, 79 (9), 2171–2179.
- Morandi F., Verin R., Sarli G., Canetti N., Scacco M., Panarese S & Poli A. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) antigen localisation and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in free-ranging wild boar (*Sus scrofa ssp scrofa*) in Italy. *Europe Journal Wildl Research*, 56, 717 – 724.
- Morés N., Barcellos D & Zanella J.(2012).Circovirose suína.D. Doenças dos suínos.Goiânia. (pp. 273-287). Cãnone: 2ª edition.
- MWSP-8. (1982). *Swine Housing and Equipment Handbook*. 4ª Edição. Midwest Plan Service – Extension Agricultural Engineer.
- Myer R & Bucklin R. (2009). Influence of Hot-Humid Environment on Growth Performance and Reproduction of Swine. In: *Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*.
- Nawagitgul P., Harms P.A., Morozov I., Thacker B.J., Sorden S.D., Lekcharoensuk C & Paul P.S. (2002). Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clinic Diagnostic Laboratory Immunology*, 9, 33–40.
- OIE (2009). *Swine Influenza*. Animal Disease Factsheet. The Center for Food Security and Public Health (CFSPH). 1-19. Acedido em 3, outubro,/2015, disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/swine_influenza.pdf ().
- Olvera A., Sibila M., Calsamiglia M., Segalés J. & Domingo M. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods*, 117, 75-80.
- Opriessnig T., Janke B.H. & Halbur P.G. (2006). Cardiovascular lesions in pigs naturally or experimentally infected with porcine circovirus type 2. *Journal of Comparative Pathology*, 134, 105-110.
- Opriessnig T., Meng X.J. & Halbur P.G. (2007). Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 591-615.
- Opriessnig T., Madson D.M., Prickett J.R., Kuhar D., Lunney J.K., Elsener J. & Halbur P.G. (2008). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Veterinary Microbiology*, 131, 103-114.

Opriessnig T., Ramamoorthy S., Madson D.M., Patterson A.R., Pal N., Carman S., Meng X.J & Halbur P.G. (2008). Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *Journal of General Virology*, 89, 2482-2491.

Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Rothschild M., Kuhar D., Lunney J.K., Juhan N.M., Meng X.J & Halbur P.G. (2009). Difference in severity of porcine circovirus type 2 (PCV2)-induced pathological lesions between Landrace and Pietrain pigs. *Journal of Animal Science*, 87, 1582-1590.

Opriessnig T., Patterson A. R., Meng X-J & Halbur P. G. (2009). Porcine circovirus type 2 in muscle and bone marrow is infectious and transmissible to naive pigs by oral consumption. *Veterinary Microbiology*, 133, pp 54-64.

Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X.J & Halbur P.G. (2010). Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Veterinary Microbiology*, 142, 177–183.

Opriessnig T. & Halbur P.G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Research*, 164, 20-32.

Opriessnig T., O'Neill K., Gerber F., Castro M., Giménez-Lirola G., Beach M., Zhou L., Meng J., Wang C & Halbur G. (2013). A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*, 3, 487-494.

Parker R., Deville S., Dupuis L., Bertrand F. & Aucouturier, J. (2009). Adjuvant formulation for veterinary vaccines: Montanide™ gel safety profile. *Procedia in Vaccinology*. 1, 140–147.

Pallares F.J., Ospriessing P.G & Sorden S.D. (2002). Porcine Circovirus type 2 (PCV2) coinfections in US field cases of Post weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS). *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 515-519.

Patterson R., Nevel A., Adriana V. D., Henny M., Theo D., Christopher B., Bettina M & Dirk W. (2015). Exposure to environmental stressors result in increased viral load and further reduction of production parameters in pigs experimentally infected with PCV2b. Acedido em 3 out, 2015, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4441105/?report=reader#!po=2.00000>.

Patterson R & Opriessing T. (2010). Epidemiology and horizontal transmission of circovirus type 2 (PCV2). *Animal Health Research Reviews*, 11, 217-234.

Pereira A. S. (1992). Higiene e Sanidade Animal: Fundamentos da produção pecuária. Publicações Europa – América.

Pérez-Martín E., Rovira A., Calsamiglia M., Mankertz A., Rodríguez F & Segalés J (2007). A new method to identify cell types that support porcine circovirus type 2 replication in formalin-fixed, paraffin-embedded swine tissues. *Journal Virology Methods*, 146, 86–95.

Pfizer Animal Health Inc. (2011). *Fostera™ PCV*. Acedido em Abr. 29, 2015, disponível em: https://animalhealth.pfizer.com/sites/pahweb/US/EN/Products/pdf/FosteraPCV_ProductInformation_FINAL.pdf.

Quintana J., Segalés J., Rosell C., Calsamiglia M., Rodríguez-Arriola G.M., Chianini F., Folch J.M., Maldonado J., Canal M., Plana-Durán J & Domingo M. (2001). Clinical and pathological

observations of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Record*, 149, 357–361.

Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W & Constable P.D. (2007). Disease associated with viruses and Chlamydia – I. In *Veterinary Medicine a text book of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (pp. 1185-1193). Espanha: 10th edition.

Reiner G., Bronnert B., Hohloch C., Reinacher M & Willems H. (2011). Distribution of ORF2 and ORF3 genotypes of porcine circovirus type 2 (PCV-2) in wild boars and domestic pigs in Germany. *Veterinary Microbiology*, 148, 372–376.

Regulamento (CE) nº 1774/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 3 de Outubro de 2002 que estabelece regras sanitárias relativas aos subprodutos animais não destinados ao consumo humano. Luxemburgo.

Rodríguez-Arrijoja G.M., Segalés J., Calsamiglia M., Resendes A.R., Balasch M., Plana-Durán J., Casal J. & Domingo M. (2002). Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in a herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *American Journal of Veterinary Research*, 63(3), 354-357.

Rose N., Opriessnig T., Grasland B. & Jestin A. (2011). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PVC2), *Virus Research*, 164, 78-89.

Rose N., Opriessnig T., Grasland B. & Jestin A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*, 164(1-2), 78-89.

Rosell C., Segalés J., Plana-Durán J., Balasch M., Rodríguez-Arrijoja G.M., Kennedy S., Allan G.M., McNeilly F., Latimer K.S. & Domingo M. (1999). Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 120, 59-78.

Rosell C., Segales J & Domingo M. (2000). Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology*, 37 (6), 687- 692.

Rovira A., Balasch M., Segalés J., Garcia L., Plana-Duran J., Rosell C., Ellerbrok H., Mankertz A & Domingo M. (2002). Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76 (7), 3232–3239.

Royer R.L., Nawagitgul P., Halbur P.G & Paul P.S. (2001). Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health and Production*, 9 (6), 281-284.

Sanchez R.E., Nauwynck H.J., McNeilly F., Allan G.M. & Pensaert M.B. (2001). Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Veterinary Microbiology*, 83, 169-176.

Sañudo C., Jimeno V. & Cerviño M. (2008). *Producción de ganado vacuno de carne y tipos comerciales en España*. Shering-Plough.

Segalés J., Sitjar M., Domingo M., Dee S., Del Pozo M., Noval R., Sacristan C., De las Heras A., Ferro A & Latimer K.S. (1997). First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Veterinary Record*, 141, 600 – 601.

Segales J., Pastor J., Cuenca R & Domingo M. (2000). Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs. *Veterinary Record*, 146, 675–676.

Segalés J., Alonso F., Rosell C., Pastor J., Chianini F., Campos E., López-Fuertes L., Quintana J., Rodríguez-Arriola G., Calsamiglia M., Pujols J., Domínguez J & Domingo M. (2001). Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Immunology Immunopathology*, 81, 37-44.

Segalés J. & Domingo M. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs: a review. *Veterinary Quarterly*, 24(3), 109-124.

Segalés J, Calsamiglia M, Rose II C, Soler M, Maldonado J, Martín M & Domingo M. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection status in pigs naturally affected with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Spain. *Veterinary Microbiology*, 85, 23-30.

Segalés J., Allan G.M & Domingo M. (2005). Porcine circovirus diseases. *Animal Health Research Reviews*, 6 (2), 119–142.

Segalés J., Calsamiglia M., Olvera A., Sibila M., Badiella L. & Domingo M. (2005). Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Microbiology*, 111, 223-229.

Segalés J. (2007). Porcine circovirus disease (PCVD) - have we won the war in Europe? *Advances in Pork Production*, 18, 49-56.

Segalés, J., Larsen L., Wallgren P., Rose N., Grau-Roma L., Sibila M., Fraile L., Casal J & Bækbo P. (2007). What do we know on epidemiology, control and prevention of porcine circovirus diseases? In Proceedings of the 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases (pp. 35-38). Krakow, Poland.

Segalés, J. (2008). *Prevención y control de la circovirus porcina*. Acedido em 24 Maio 2015, disponível em: http://www.3tres3.com/circovirus_porcina/prevencion-y-control-de-la-circovirus-porcina_2052/.

Segalés J., Olvera A., Grau-Roma L., Charreyre C., Nauwynck H., Larsen L., Dupont, K., McCullough K., Ellis J., Krakowka S., Mankertz A., Fredholm M., Fossum C., Timmusk S., Stockhofe-Zurwieden N., Beattie V., Armstrong D., Crassland B., Bækbo P & Allan G. (2008). PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Veterinary Record*, 162, 867–868.

Segalés J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, 164, 10-19.

Segalés, J., Allan, G. M., & Domingo, M. (2012). Diseases of Swine. (pp. 405–417). Ames, Iowa: Éditions Wiley-Blackwell.

Segalés J., Kekarainen T & Cortey M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Veterinary Microbiology*, 165 (5) 13–20.

Shibahara T., Sato K., Ishikawa Y & Kadota K. (2000). Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome. *Journal Veterinary Medicine Science*, 62, 125-113.

- Sorden SD, Harms PA, Sirinarumitr T, Morozov I, Halbur PG, Yoon KJ & Paul PS. (1998). Porcine circovirus and PRRSV co-infection in pigs with chronic bronchointerstitial pneumonia and lymphoid depletion: an emerging syndrome in midwestern swine. Proceedings, Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Minneapolis, Minnesota. p. 75.
- Sorden S.D. (2000). Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health and Production*, 8 (3), 133-136.
- Steiner E., Balmelli C., Herrmann B., Summerfield A & Mccullough K. (2008). Porcine Circovirus type 2 displays ploripotency in cell targeting. *Virology*, 378, 308-322.
- Stone M. (2004). Response to first diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Surveillance*, 31, 7.
- Tischer I., Rasch R & Tochtermann G. (1974). Characterization of papovavirus and picornavirus like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriologie Orig. A*, 226, 153–167.
- Tischer I., Gelderblom H., Vettermann W & Koch M.A. (1982). A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295, 64–66.
- Tischer I., Peters D. & Pociuli S. (1995). Occurrence and role of an early antigen and evidence for transforming ability of porcine circovirus. *Archives of Virology*, 140, 1799–1816.
- Tisher I., Peters D., Rasch R & Pociuli S. (1997). Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Archives of Virology*, 96, 39 57.
- Vicente J., Segalés J., Hofle U., Balasch M., Plana-Duran J., Domingo M & Gortazar C. (2004). Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Research*, 35, 243–253.
- Wellenberg G.J., Pesch S., Berndsen F.W., Steverink P.J.G.M., Hunneman W., Vorst T.J.K., van der Peperkamp N.H.M.T., Ohlinger V.F., Schippers R., van Oirschot J.T & de Jong M.F. (2000). Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in The Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 22, 167–172.
- West K., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Hainer D.B., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly F.M., Konoby C., Martin K & Ellis J.A. (1999). Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 530–532.
- Xiao H., Shao F., Wu M., Ren W., Xiong X., Tan B & Yin Y. (2015). The application of antimicrobial peptides as growth and health promoters for swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 19 (1).
- Zheng L., Wangb Y., Li M.F., Chen H.Y., Guob X., Genga J.W., Wang Z., Weia Z.Y & Cuib B. (2013). Simultaneous detection of porcine parvovirus and porcine circovirus type 2 by duplex real-time PCR and amplicon melting curve analysis using SYBR Green. *Journal of Virological Methods*, 187 (15), 15– 19.

Anexos

- **Anexo 1** - Avaliação do número de animais vivos e mortos nos grupos de estudo

```
colnames(.Table) <- c('1', '2')
```

```
> .Table # Counts
```

```
  1 2  
1 162 5  
2 167 2
```

```
> rowPercents(.Table) # Row Percentages
```

```
  1  2 Total Count  
1 97.0 3.0  100  167  
2 98.8 1.2  100  169
```

```
> .Test <- chisq.test(.Table, correct=FALSE)
```

```
> .Test
```

Pearson's Chi-squared test

data: .Table

X-squared = 1.3498, df = 1, p-value = 0.2453

- **Anexo 2** - GMD dos lotes

	N	Median
não vacinados	5	0.69
vacinados	5	0.70

Point estimate for $\eta_1 - \eta_2$ is 0.01193

96.3 Percent CI for $\eta_1 - \eta_2$ is (-0.04390,0.07289)

W = 28.0

Test of $\eta_1 = \eta_2$ vs $\eta_1 \neq \eta_2$ is significant at 1.0000

- **Anexo 3** - Questionário do Biochek (realizado no dia 1 julho de 2016)

- Herd characteristics

This data is important to us as researchers because we try to match biosecurity features to herd characteristics like size of the farm, management, age of the buildings. You are not obliged to answers these questions. Answering these questions is not necessary for the calculation of your biosecurity score.

Are there, beside pigs, any other farm animals (for professional use) present at your farm?

- Yes
- No

If so, which?

Cows

1. External biosecurity: Purchase of breeding pigs

Are breeding pigs (sows /gilts /boars) being purchased?

- Yes
- No

External biosecurity: Purchase of piglets

Are piglets being purchased

- Yes
- No

External biosecurity: Artificial Insemination

Is semen purchased?

- Yes
- No

External biosecurity: Transport of animals

Are fattening pigs transported from the farm to the slaughterhouse?

- Yes
- No

Is the transport vehicle taking the fattening pigs to the slaughterhouse empty on arrival at the

farm?

Choose one of the following answers

- Yes, always empty
- Sometimes empty
- No, never empty
- Unknown

Is the transport vehicle for fattening pigs always cleaned and disinfected on arrival at the farm?

Choose one of the following answers

- Yes, always cleaned and disinfected
- Sometimes cleaned and disinfected
- No, never cleaned and disinfected

Are sows transported from the farm to other farms or to the slaughterhouse?

- Yes
- No

Are piglets transported from the farm to other farms?

- Yes
- No

Does the driver have entrance to the stables when loading the animals?

- Yes
- No

Are the animals loaded from a separate loading area or directly from the stable / central corridor?

Choose one of the following answers

- Seperate loading area
- Central corridor or stable

Is it possible for animals to return to the stables (walk back or placed back in) after being in the transport vehicle?

- Yes
- No

External biosecurity: Feed and water supply

Can the feeding company fill up the silos without entering the clean road?

- Yes
- No

Does the transporter of the feed have entrance to the stables?

- Yes
- No

Is a feeding company used where the feed meet special hygienic requirements (i.e. Salmonella free, heat treatment)?

- Yes
- No

Is the quality of the drinking water checked every year at the well by means of a bacteriological analysis?

- Yes
- No

Is the quality of the drinking water checked every year at the main outlets or if necessary at the storage tank by means of a bacteriological analysis?

- Yes
- No

External biosecurity: Removal of manure and dead animals

Is manure been removed through the dirty road?

- Yes

- No

Are farm-specific hoses for removal of manure from the manure pit available (hoses for the removal of manure that stay at the farm all the time)?

- Yes
- No

Is there a separate carcass storage?

- Yes
- No

Is the carcass storage located in the dirty area of the farm?

- Yes
- No

Can carcasses be collected by the rendering company from the public road?

- Yes
- No

Is the carcass storage closed so vermin, dogs or cats don't have access to the carcasses?

- Yes
- No

Is the carcass storage regularly cleaned and disinfected?

- Yes
- No

Is the carcass storage cooled?

- Yes

- No

Are gloves being worn when manipulating carcasses or are hands being washed and disinfected after manipulating carcasses?

Choose one of the following answers

- Always
- Sometimes
- Never

External biosecurity: Entrance of visitors and personnel

Are visitors obliged to check in before having entrance to the stables?

- Yes
- No

Is there a pig-contact free period of >12h expected for all visitors before they are allowed to enter the stables?

- Yes
- No

Is there a hygiene lock available and is it always used when visitors have access to the stables?

- Yes
- No

Is each stable only accessible for visitors from the hygiene lock?

- Yes
- No

Is there a strict separation between the clean and the dirty area of the hygiene lock?

- Yes

- No

Do visitors have to wear farm-specific clothing (disposable overalls / cleaned overalls)?

- Yes
- No

Do hands have to be washed and disinfected before entering the stables?

- Yes
- No

Do the farmer and the staff always carry out these hygienic measures themselves?

- Yes
- No

External biosecurity: Material supply

Is a specific pass-through for materials to enter the buildings of the farm (i.e. UV-cabinet for foreign materials that need to be brought into the stables)?

- Yes
- No

Are specific measures taking for material supply (i.e. cleaning and disinfection, quarantine period at special location)?

- Yes
- No

External biosecurity: Rodent and bird control

Does the farm harbor rodents (rats, mice, etc.)?

- Yes

- No

Is the outside of the farm (around the walls) paved and clean (removal of weeds, waste, ...) and therefore preventive against vermin?

- Yes
- No

Is there a rodent control program?

- Yes
- No

Do companion animals have access to the stables?

- Yes
- No

Can birds enter the stables?

Also fill in 'No' when birds can enter (due to open housing), but when strict measures are taken to avoid contamination of feed by bird droppings.

- Yes
- No

Are grids placed before the air intakes?

- Yes
- No

External biosecurity: Location of the farm

Is the farm located in an area with a high density of pigs or a low density of pigs?

Choose one of the following answers

- Low density
- High density

Are other pig farms located within a radius of 500 meters of your farm?

- Yes
- No

Is manure from other farms spread on neighboring farmlands situated directly next to your stables (<500 meters)?

- Yes
- No

Are there often (minimum once a day) transport vehicles carrying animals from other farms passing by your farm on the road next to the farm (e.g. due to location of a slaughterhouse in the neighborhood, ...)?

- Yes
- No

Have wild boars been spotted in the neighborhood (within range of 10km) of your farm?

- Yes
- No

1. Internal biosecurity: Disease management

Do you make use of and always follow a prelisted vaccination scheme and a protocol for strategic treatments (additives, antibiotics)?

- Yes
- No

Is a regular evaluation made of the disease status of the farm (i.e. serology, trends in slaughterhouse findings, etc)?

- Yes
- No

Are stay-behinds (due to unclear cause) and/or diseased animals isolated from the healthy

ones (in physically separate hospital pens or by euthanasia)?

Choose one of the following answers

- Always
- Sometimes
- Never

Are diseased animals consistently handled after the healthy animals?

- Yes
- No

Internal biosecurity: Farrowing and suckling period

Are there sows present at the herd?

- Yes
- No

Are sows washed before being moved to the farrowing unit?

Choose one of the following answers

- Always
- Sometimes
- Never

Are suckling piglets transferred between sows (cross-fostering)?

- Yes
- No

How many times are the piglets manipulated between birth and weaning (vaccination, castration, clipping of the teeth, ...)?

Only numbers may be entered in this field.

3

Are materials/tools (e.g. castration blade, tail-docker, ear-tagger, iron injection needles) for treatment regularly cleaned and/or disinfected between litters (i.e. at least between every batch treatment)?

- Yes
- No

Do you work with two blades and a small box containing a disinfectant when castrating the piglets?

- Yes
- No

Internal biosecurity: Nursery unit

Is there a nursery unit present at the herd?

- Yes
- No

Is strict all-in/all-out management practiced in each pen of the nursery unit?

- Yes
- No

Are older piglets sometimes mixed with piglets of a younger age?

- Yes
- No

The maximal pig density of a pen in the nursery

Choose one of the following answers

4

Is the nursery physically separated (= no direct contact or access from sows via door to nursery, preferably separate stable) from the sow unit?

- Yes
- No

Is a separate hygiene lock available for the nursery unit?

- Yes
- No

Internal biosecurity: Fattening unit

Are there fattening pigs present at the herd?

- Yes
- No

Is a strict all-in / all-out management practiced in all compartments of the fattening unit?

Yes

Is a strict all-in / all-out management practiced in each pen per compartment of the fattening unit?

Yes

Are the different age groups strictly separated in different (= physical separated) compartments?

Yes

Are older fattening pigs sometimes mixed with pigs of a younger age?

No

Internal biosecurity: Measures between compartments

Clothing and footwear is changed between compartments

Always

Sometimes

Never *

Hands are washed and/or disinfected between different compartments / units

Choose one of the following answers

Always

Sometimes

Never*

Disinfection baths and/or boot washers are located between different compartments, or boot are changed between compartments.

Yes

Internal biosecurity: Working lines

Is all work performed from younger pigs to older ones?

Yes

Is the equipment that is needed for a specific animal category placed according to working lines?

Yes

- Internal biosecurity: Use of equipment

Is a protocol present for cleaning and disinfection of equipment (e.g. brooms, spades) after use and is this protocol adhered to?

Yes

Is used equipment clearly marked or recognizable for the unit or age group it is intended (e.g. by colors)?

No

Are boards that are used for driving pigs easy to clean and are they regularly (i.e. after every use or at least after every production round with the cleaning and disinfection after AI/AO) cleaned?

Yes

Is equipment present on the farm that are used on different farms?

No

Are dedicated injection syringes available and used for each age group?

Yes

Are dedicated injection needles available and used for each age group?

Yes

After how many animals is the needle changed?

Only numbers may be entered in this field.

35

Internal biosecurity: Cleaning and disinfection

Always *

Sometimes

Never

Is the efficacy of cleaning and disinfection checked by taking a hygienogram?

Choose one of the following answers

Always *

Sometimes

Never

Are stables/compartments cleaned and disinfected after each production round?

Yes

Is there a sanitary transition period (time empty) after each production round?

Yes

Are corridors cleaned and disinfected after pigs are moved?

Choose one of the following answers

Yes *

Sometimes

No

Are footbaths / installation for cleaning booths used at the entrance of every stable?

Choose one of the following answers

Always *

sometimes

never

Is the fluid of footbaths immediately changed when visually contaminated?

Yes

Are disinfection baths present at the entrance of the farm?

Yes

U. Kind of data

Quadro A.1 - Taxas de ventilação mínima e máxima necessárias por fase etária e peso vivo.

Taxa de ventilação/Fase produtiva	Mínima (m ³ /h/animal)	Máxima (m ³ /h/animal)
Maternidade	33,6	840
Recria (5,5-34 Kg)	3,36-5,04	42-58,8
Engorda (34-113,5Kg)	11,76-16,8	126-201,6
Gestação	20,28	252
Varrasco	23,58	504

(1)Adapatdo de MWPS-8 (1983)

Quadro A.2 – Temperatura ótima e limites aceitáveis por faixa etária.

Faixa etária	Temperatura ótima (°C)	Limites aceitáveis
Ninhada	35	32-38
Recria (5-20 Kg)	27	24-30
Engorda (20-55Kg)	21	16-27
Engorda (55-110Kg)	18	10-24
Gestação	18	10-27
Maternidade	18	13-27
Varrascos	18	10-27

(2)(Adaptado de Myer& Bucklin, 2009)

Quadro A.3 – Área necessária por animal, em função do peso (DL 135/2003).

Peso vivo (Kg)	Área (m ²)
Até 10	0,15
De 10 a 20	0,20
De 20 a 30	0,30
De 30 a 50	0,40
De 50 a 85	0,55
De 85 a 110	0,65
Mais de 110	1,00

