



Avaliação da Vacina Circovac® no Controle da Síndrome da Circovirose Suína (SCS) em Condições de Campo no Brasil

Nelson Morés¹

Janice Reis Ciacci Zanella²

Armando Lopes do Amaral³

Elena Souza de Lima⁴

Arlei Coldebella⁵

Luiz Carlos Bordin⁶

Edson Luiz Bordin⁷

Introdução

O circovírus tipo 2 (PCV2) é responsável por diversas manifestações clínicas, dentre as quais destaca-se a SCS. Na área reprodutiva, o PCV2 pode provocar natimortos, mumificados e nascimento de leitões fracos.

Essa enfermidade ocorre de forma endêmica na maioria dos países que produzem suínos de maneira industrial, incluindo o Brasil. Atualmente é a doença de maior impacto econômico à suinocultura mundial. No Brasil, foi diagnosticada no ano 2000 e desde então disseminou-se nas principais regiões produtoras de suínos. Ademais, o PCV2 provoca imunodeficiência nos suínos, tornando-os mais suscetíveis a outras infecções, o que aumenta o uso de antimicrobianos.

Até 2007, no Brasil, os esforços para controle da síndrome eram basicamente em melhorias na nutrição e na implementação de medidas globais de controle, baseado na correção de fatores de risco. Porém, na maioria dos rebanhos, por questões estruturais das granjas, não se consegue corrigir muitos dos fatores de risco envolvidos com a manifestação da doença. Daí a necessidade de se dispor de medidas imunoprotetoras eficazes. A Circovac® foi a primeira vacina contra circovirose liberada no Brasil, no segundo semestre de 2007, indicada especificamente para imunização passiva dos leitões através da vacinação das porcas. Atualmente, outras três vacinas recomendadas para leitões, também, foram liberadas ou estão em processo de liberação.

¹ Médico Veterinário, M.Sc. em Patologia Animal, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, mores@cnpsa.embrapa.br

² Médica Veterinária, Ph.D. em Virologia, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, janice@cnpsa.embrapa.br

³ Biólogo, M.Sc. em Ciências Veterinárias, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, amaral@cnpsa.embrapa.br

⁴ Médica Veterinária, mestrandona em Ciência Animal pela UDESC, Lages, SC, elenasvet@yahoo.com.br

⁵ Médico Veterinário, D.Sc. em Planejamento e Análise de Experimento, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, arlei@cnpsa.embrapa.br

⁶ Médico Veterinário, especialização em Sanidade Animal, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, bordin@cnpsa.embrapa.br

⁷ Médico Veterinário, especialista em Patologia Suína, gerente de serviços técnicos da Merial Saúde Animal Ltda, São Paulo, SP, Edson.Bordin@merial.com

Este estudo foi realizado para avaliar a eficiência da Circovac® no controle da síndrome da circovirose suína (SCS), causada pelo PCV2, em condições de campo.

Teste realizado

Seleção das Granjas

Antes de iniciar o experimento foram analisadas oito granjas com o objetivo de selecionar três que atendessem os critérios de ocorrência da SCS no rebanho e concordância do produtor em realizar o teste. Para ser incluída no estudo, a granja deveria

apresentar suínos com quadro clínico da SCS e taxa de mortalidade acima de 5% na creche e crescimento nos dados históricos dos últimos 6 meses.

A comprovação da doença foi realizada pela presença de leitões com sintomas da SCS, pela constatação de lesões macro e micro de adenopatia e depleção linfoide acentuada e pela identificação de grande quantidade de antígeno do PCV2 por imunoistoquímica (IHQ) nas lesões dos linfonodos (Fig. 1A-D). Após, seguiu-se a confirmação pela técnica de PCR em tecidos linfoideos.

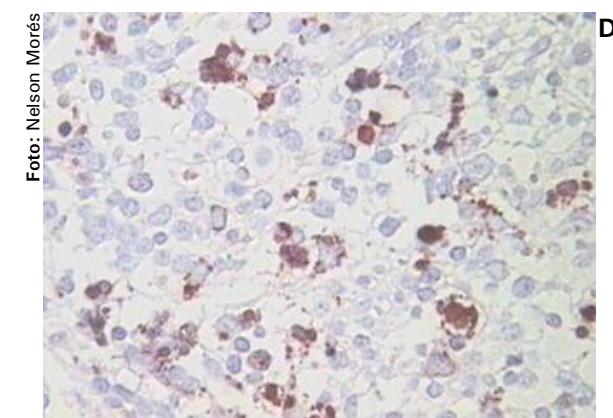
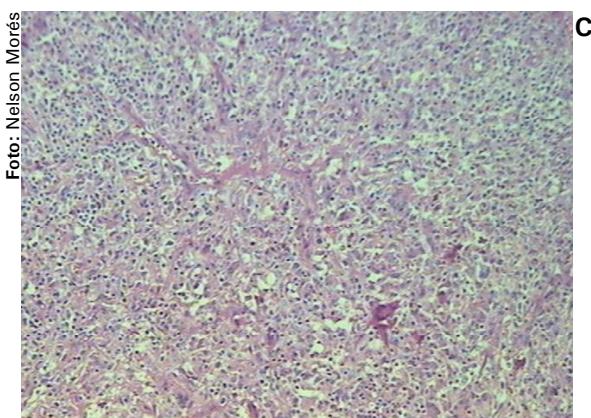
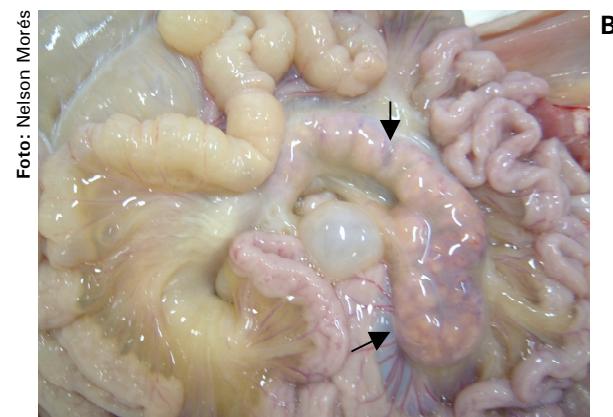
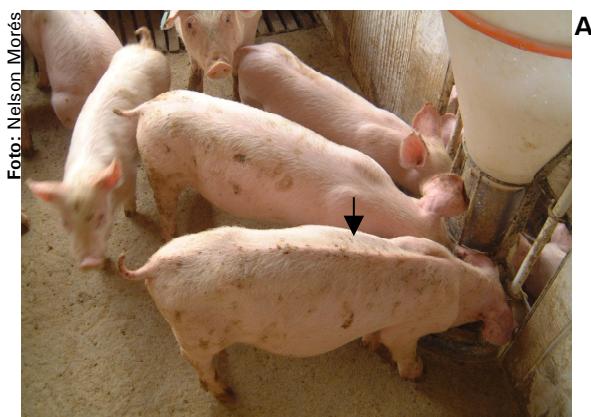


Fig.1. A: Sinais clínicos de definhamento no início de crescimento (seta); B: Hipertrofia e edema dos linfonodos mesentéricos (setas); C: Depleção linfoide e infiltração de histiócitos no linfonodo mesentérico; F: Imunoistoquímica do linfonodo mesentérico positiva (cor marrom) para o PCV2.

Das oito granjas avaliadas, três (A, B e C) atenderam os requisitos do teste e foram selecionadas para realização do estudo, sendo uma de porte empresarial de alta tecnologia (Granja A – 3.400 matrizes), uma de porte médio (Granja B – 450 matrizes) e outra de porte familiar com baixo uso de tecnologia (Granja C – 200 matrizes). No total foram utilizadas 171 porcas com suas leitegadas,

sendo 99 da granja A, 36 da granja B e 36 da granja C. O estudo procurou ao máximo não interferir no manejo, nutrição, intervenções medicamentosas e demais procedimentos empregados nas granjas.

Identificações dos animais

As porcas incluídas no experimento foram identificadas (brinco ou mossa) por ocasião da primeira dose de vacina e os leitões (brincos) ao desmame. Os brincos utilizados nos leitões eram de cores diferentes, diferenciando entre grupo vacinado e controle. Dois leitões de tamanho médio por leitegada foram selecionados ao acaso para avaliação do perfil sorológico e receberam brincos de cores diferentes de seus tratamentos. Portanto, ao todo, quatro cores de brinco foram utilizadas.

Tratamentos

Foram testados dois tratamentos nas três granjas:

- **T1: Controle** – porcas vacinadas com salina estéril no lugar da vacina.
- **T2: Vacinada** – porcas vacinadas com Circovac®, conforme esquema abaixo.

Vacinação

As porcas do T2 receberam a vacina Circovac® por via intramuscular duas vezes, com 3 semanas de intervalo, sendo que a segunda dose foi feita pelo menos duas semanas antes da data prevista do parto. As porcas Controle receberam somente solução salina fisiológica no mesmo esquema e dose de aplicação da vacina.

Foram realizadas avaliações da reação à vacina 24 e 72 horas após as aplicações (nas 1^a e 2^a doses), tais como apatia, anorexia, vômito, febre (acima 39,5), presença de nódulo palpável com edema, calor e vermelhidão e formação de nódulo (granuloma) no local da injeção.

Pesagem

Os leitões foram pesados ao desmame, na saída da creche e final da fase de crescimento.

Título de anticorpos sangüíneos para PCV2

O sangue das porcas foi colhido na primeira e segunda aplicação da vacina ou placebo e no desmame. Nos leitões foram feitas três coletas de sangue de dois leitões por leitegada, sendo a 1^º no desmame, 2^º na saída de creche e a 3^º no final da fase de crescimento. O título de anticorpos sangüíneos para o PCV2 foi medido por imunocitoquímica (adaptado de Gava et al., 2005).

DNA e carga viral (PCV2) nas fezes das porcas

Amostras de fezes das porcas (aproximadamente 20g) foram colhidas (com o auxílio de um saco plástico estéril para cada fêmea) entre 1 a 5 dias após o parto. Em seguida foram colocadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas imediatamente em -20°C para posterior avaliação virológica. A extração do DNA viral nas fezes das porcas foi realizado conforme protocolo da SIMBIOS (Porto Alegre, RS) e sua detecção através da técnica de nested-PCR descrita por Kim et al. (2001).

A quantificação da carga viral (PCV2) nas fezes foi realizada pela técnica de PCR em tempo real, conforme Olvera et al. (2004). O limite de detecção da técnica (LOD) foi calculado pelo teste Probit e definido como:

- **4.500 vírus/mL** – com 95% das repetições com resultados positivos; e
- **vírus/mL** – com 50% das repetições com resultados positivos.

Acompanhamento das porcas por ocasião do parto

Uma ficha de acompanhamento do parto foi preenchida com os dados da porca e resultado do parto (nascidos vivos, natimortos e mumificados).

Exame clínico nos leitões

Os leitões foram examinados clinicamente no desmame, saída de creche e final do crescimento, sempre por dois veterinários da Embrapa. Eram avaliados aspectos clínicos baseados nos sinais de enterites (diarréia), problemas respiratórios (tosse e dispnéia) e sinais de definhamento. Além disso, sinais de palidez/icterícia e presença de xifose/lordose também foram monitorados.

Exame dos leitões mortos

Os suínos mortos até a terceira pesagem foram necropsiados para exame macroscópico e colheita de amostras para exames histológico e de IHQ para PCV2, seguindo-se os procedimentos operacionais padrões recomendados pela Embrapa Suínos e Aves para estas técnicas.

Os fragmentos de tecidos fixados em formol 10% tamponado (linfonodos, baço, rins, pulmão, fígado e timo) foram processados para avaliação histopatológica de rotina. Para exame de IHQ, os

linfonodos, baço e timo foram processados pelo método de inclusão em parafina e testados pela técnica de coloração extravidina-biotina-peroxidase em coelho contra a proteína codificada pela ORF2 (ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit® - Sigma E-8386), utilizando-se anticorpo policlonal produzido (capsídeo) do PCV2 (gentilmente cedido por David Driemeier - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

Análise estatística

A análise dos dados de desempenho foi realizada através da análise de variância para o modelo considerando os efeitos de granja e tratamento, para as variáveis: ganho de peso diário na creche e no crescimento.

A análise dos dados de sinais clínicos compatíveis com a circovirose, de mortalidade e dos resultados do exame de nested PCR para PCV2 nas fezes, foi realizada através da análise de regressão logística, considerando os efeitos de granja e tratamento.

Os títulos de sorologia para PCV2 pela ICQ foram transformados em logaritmo na base 2, para obter uma distribuição normal dos dados, e analisados

utilizando-se a teoria de modelos mistos para medidas repetidas, considerando os efeitos de granja, tratamento, período de coleta e a interação entre os dois últimos fatores, usando o PROC MIXED do SAS (2003), conforme Xavier (2000). A estrutura de matriz de variâncias e covariâncias usada na análise foi escolhida com base no menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC). O método de estimativa usado foi o de máxima verossimilhança restrita.

Resultados obtidos

Na avaliação da segurança e inocuidade da vacina não foram observadas reações adversas como morte de porcas, abortos ou reação no local da aplicação. As idades corretas em que foram realizadas as pesagens, coleta de sangue e exames clínicos dos leitões foram em média 21 dias (desmame), 64 dias (saída de creche) e 111 dias (final de crescimento).

Dados reprodutivos

Não houve diferença significativa entre os tratamentos nas variáveis reprodutivas avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1. Leitões nascidos vivos, natimortos e mumificados em cada tratamento.

Tratamento	Vivos	Natimortos	Múmia	Total
Controle	10,81	0,30	0,06	11,17
Vacinado	11,24	0,48	0,15	11,87
Pr > F	0,3564	0,1170	0,3161	0,1431

Não apresenta diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste F.

Sinais clínicos

Na Tabela 2 são apresentadas as freqüências e porcentagens de animais com sinais clínicos compatíveis com a circovirose e o valor do teste de χ^2 associado à regressão logística. Nessas avaliações foi observado diminuição significativa dos sinais de SCS em leitões filhos de porcas vacinadas ($p < 0,05$). Na creche, a vacinação das porcas reduziu os sinais de definhamento e xifose/lordose nos leitões; no crescimento, além desses sinais, houve redução dos sinais respiratórios e entéricos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Sinais clínicos compatíveis com circovirose na saída de creche e de crescimento em função dos tratamentos.

Tratamentos	Animais	Definhamento	Dificuldade respiratória	Sinais Clínicos		
				Sinais entéricos	Palidez/ictericia	Xifose/lordose
Saída de Creche						
Controle	736	19 (2.58)	3 (0.41)	1 (0.14)	1 (0.14)	29 (3.94)
Vacinado	894	9 (1.01)	1 (0.11)	11 (1.23)	2 (0.22)	15 (1.68)
Pr> χ^2		0.0048	0.2485	0.0308	-*	0.0071
Saída de Crescimento						
Controle	702	48 (6.84)	16 (2.28)	1 (0.14)	13 (1.85)	20 (2.85)
Vacinado	851	10 (1.18)	1 (0.12)	0 (0.00)	5 (0.59)	7 (0.82)
Pr> χ^2		<0.0001	0.0009	-*	0.0211	0.0036

* Não foi aplicado o teste por causa da freqüência nula ou quase nula nos dois tratamentos.

Mortalidade

A taxa de mortalidade, independente da causa, foi menor ($p=0,0802$) no grupo de leitões filhos de porcas vacinadas, apenas na fase de crescimento. Todavia, a mortalidade na creche e crescimento (apenas naquela associada à circovirose), foi significativamente reduzida ($p=0,0212$) no grupo de

leitões de porcas vacinadas (Tabela 3). Nesta tabela, observa-se também que a mortalidade total foi aquém do esperado nos dois tratamentos. Além disso, no grupo vacinado houve problema de colibacilose num lote e de pleuropneumonia noutro, o que não aconteceu no grupo controle.

Tabela 3. Mortalidade de leitões na creche e crescimento e suas causas.

Variáveis	Tratamentos		Pr> χ^2
	Controle	Vacinado	
Animais na Creche	766	927	
Animais no crescimento	736	894	
Mortalidade na Creche	17 (2,22%)	21 (2,27%)	0,8070
Mortalidade no Crescimento	16 (2,17%)	10 (1,12%)	0,0802
Mortalidade total	33 (4,31%)	31 (3,34%)	0,3462
Causas das Mortes			
Mortalidade associada à Circovirose	15 (1,96%)	6 (0,65%)	0,0212
Polisserosite e ou broncopneumonia exudativa	4 (0,52%)	5 (0,54%)	
Colibacilose ou doença do edema	1 (0,13%)	7 (0,76%)*	
Torção do mesentério	5 (0,65%)	1 (0,11%)	
Pleuropneumonia	0 (0,00%)	4 (0,43%)**	
Autólise, sem condições de exames	3 (0,39%)	2 (0,22%)	
Septicemia bacteriana	1 (0,13%)	3 (0,32%)	
Não examinados	4 (0,52%)	3 (0,32%)	

*Nesse lote houve um surto de colibacilose pós-desmame na Granja A, confirmado por histopatologia.

**Nesse lote houve um surto de pleuropneumonia na Granja B, confirmado no laboratório como sendo causada pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae* sorotipo 5.

Ganho de peso diário

Não houve diferença em ganho de peso diário (GPD) entre os lotes filhos de porcas vacinadas e o controle na fase de creche. Na fase de crescimento houve diferença estatística ($p<0,0015$) no GPD com maior desempenho para o grupo controle. É importante observar que os casos de colibacilose e de pleuropneumonia ocorridos na creche dos lotes

vacinados, provavelmente afetaram a mortalidade total (Tabela 3) e o ganho de peso (Tabela 4).

Tabela 4. Médias e erros padrões das variáveis de desempenho em função do tratamento.

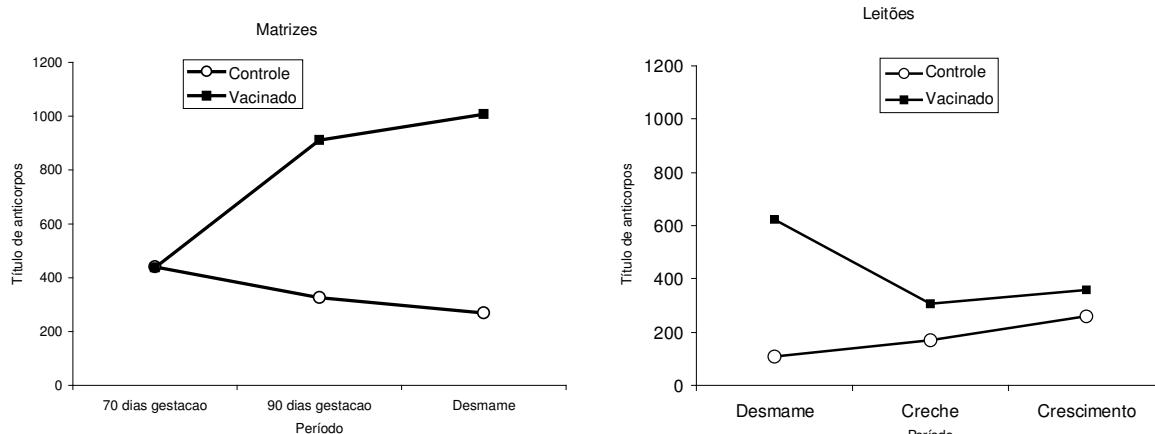
Variáveis	Tratamento		Pr>F
	Controle	Vacinado	
Peso Desmama (kg)	6,11 ± 0,050	6,05 ± 0,044	0,3791
GPD Creche (g)	261 ± 2,13	264 ± 1,90	0,2489
GPD Crescimento (g)	312 ± 2,48	302 ± 2,21	0,0015

GPD: ganho de peso médio diário.

Anticorpos anti-PCV2

A Fig. 2 é uma representação gráfica dos títulos de anticorpos para PCV2 por ICQ em soros das matrizes aos 70 e 90 dias de gestação e ao desmame, e dos leitões na desmame, saída de creche e final de

crescimento. As porcas vacinadas apresentaram maior título de anticorpos anti-PCV2 no soro ($P < 0,05$) na segunda vacinação e no desmame e seus leitões tinham maior título de anticorpos ($P < 0,05$) nas três avaliações realizadas.

**Fig. 2.** Perfil sorológico das porcas e leitões por ICQ.

Eliminação de PCV2 nas fezes

Na Tabela 5 estão os resultados de detecção de DNA do PCV2 por nested-PCR e PCR em tempo real em amostras de fezes de porcas. Observou-se que a detecção de DNA em fezes de porcas vacinadas foi significativamente inferior que nas das porcas controle. O teste de PCR em tempo real também foi realizado para quantificar PCV2 nessas amostras. Todavia, o número de amostras positivas foi muito

pequeno. O teste usado tinha um limite de detecção (calculado pelo teste Probit) de 4.500 vírus/mL – com 95% de reteste com resultados positivos e 1.000 vírus/mL – com 50% de reteste com resultados positivos. Esses resultados sugerem que o PCR em real usado aqui não é sensível o suficiente para detectar a quantidade de PCV2 presente nas fezes.

Tabela 5. Porcentagens de amostras positivas para PCV2 por PCR nas fezes de porcas no puerpério.

Variáveis	Tratamentos		Pr> χ^2
	Controle	Vacinado	
Número de amostras	80	93	
Positivas por Nested-PCR	17 (21,25%)	6 (6,45%)	0,0039
Positivas na PCR em tempo real	1 (1,25%)	2 (2,15%)	p > 0,05

Conclusões

Num ambiente contaminado com PCV2, a vacina CIRCOVAC® reduziu os sinais clínicos e as mortes associadas a SCS.

A vacinação das porcas induziu aumento significativo de títulos de anticorpos para PCV2 e redução da

quantidade de amostras de fezes positivas para PCV2 em comparação com o controle.

Anticorpos anti-PCV2 foram transferidos para os leitões via colostrum e permaneceram elevados até a fase final de crescimento, última medida realizada.

Referências Bibliográficas

CHARREYRE, C.; BÉSÈME, S.; BRUN, A.; BUBLOT, M.; JOISEL, F.; LAPOSTOLLE, B.; SIERRA, P.; VAGANAY, A. Vaccination strategies for the control of circoviral diseases in pigs. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL CIRCOVIRUS AND ASSOCIATED DISEASES; INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL CIRCOVIRUS AND ASSOCIATED DISEASES, 2005, Belfast. Proceedings. Belfast: [s.n.], 2005. p. 26-30.

GAVA, D.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; BRITO, M.; OSORIO, F.A. Utilização da técnica de imunocitoquímica (ICQ) para detecção de anticorpos contra o circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) em soro suíno. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 12., 2005, Fortaleza. Anais. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005. v. 2, p. 115-116.

KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods , v. 98, n.1, p.25-31, 2001.

LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces of Institute of Pathology. 3^{ed}. New York: McGraw Hill, 1968. 260p.

OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. 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 , v.117, n.1, p.75-80, 2004.

SAS INSTITUTE INC. System for Microsoft Windows: release 9.1. Cary, 2002-2003. 1 CD-ROM.

ZANELLA, J.R.C.; MORES, N. Síndrome Multisistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado (SMDLD) causada por circovírus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. Anales. Buenos Aires: [s.n.], 2000. p. EIP16.

ZANELLA, J.R.C.; MORES, N. Diagnostic of Post-Weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by Porcine Circovirus type 2 (PCV2). Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.55, p. 522-527, 2003.

ZANELLA, J.R.C.; MORES, N.; SIMON, N. L.; OLIVEIRA, S. R. de; GAVA, D. Identificação de circovírus suíno tipo 2 (PCV2) em estudo retrospectivo em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. Ciência Rural, v.36, n. 5, p. 1480-1485, 2006.

XAVIER, L.H. Modelos univariado e multivariado para análise de medidas repetidas e verificação da acurácia do modelo univariado por meio de simulação. Piracicaba, 2000. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Comunicado Técnico, 473

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves
Eereço: BR 153, Km 110,
 Distrito de Tamanduá, Caixa Postal 21,
 89700-000, Concórdia, SC
Fone: 49 34410400
Fax: 49 34410497
E-mail: sac@cnpsa.embrapa.br
1^a edição
 Versão Eletrônica: (2008)

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Cicero J. Monticelli
Membros: Teresinha M. Bertol, Jean C.P.V.B. Souza, Gerson N. Scheuermann, Airton Kunz, Valéria M.N. Abreu.
Suplente: Arlei Coldebella

Revisores Técnicos

Fátima R.F. Jaenisch, Jalusa D. Kich, Jean C.P.V.B. Souza e Paulo A. Esteves

Expediente

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant
Normalização bibliográfica: Irene Z.P. Camera
Editoração eletrônica: Vivian Fracasso