



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E CLÍNICAS**

**RITA DE CÁSSIA SANTOS PIMENTEL**

**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA PARVOVIROSE SUÍNA  
NO LEITE E NO SANGUE DE FÊMEAS VACINADAS**

**SALVADOR  
2005**

**RITA DE CÁSSIA SANTOS PIMENTEL**

**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA PARVOVIROSE SUÍNA  
NO LEITE E NO SANGUE DE FÊMEAS VACINADAS**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Inês Sardi  
Instituto de Ciências da Saúde – ICS  
Laboratório de Virologia

Salvador  
Semestre 2 /2005

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**RITA DE CÁSSIA SANTOS PIMENTEL**

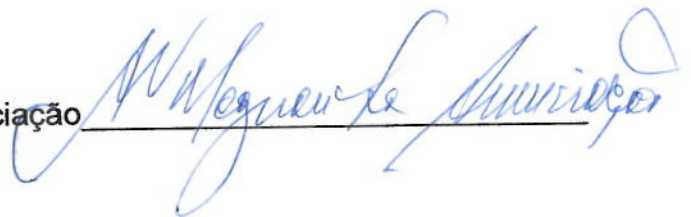
**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA PARVOVIROSE SUÍNA  
NO LEITE E NO SANGUE DE FÊMEAS VACINADAS**

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

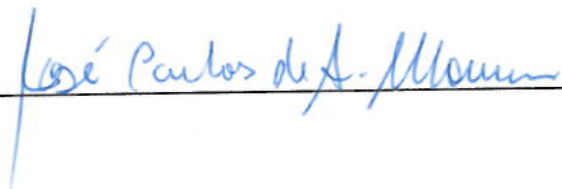
Profª Drª Silvia Inês Sardi:  
Presidente da Banca



Prof. Ms. Antonio Vicente Magnavita Anunciação



Prof. Dr. José Carlos de Andrade Moura



Apresentada em: 20 de dezembro de 2005

*Ao meu pai, que sempre priorizou a educação; à minha mãe, que nunca mediu esforços; ao meu marido e minhas filhas por me ajudarem a viver os meus sonhos,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, essa energia superior que ilumina a minha vida.

Aos meus pais, que sempre incentivaram meus estudos..

À Roberto, meu marido, pela compreensão e apoio, nestes anos de caminhada.

Às minhas filhas Silvia, Luciana, Ana Luisa e Rosana, melhores amigas de todas as horas.

À Gil, meu neto, por ter nos escolhido.

Aos meus irmãos: Vanja, Davi e Fernando por sermos uma família.

A Silvia Sardi, minha Orientadora, pela paciência.

Ao pessoal do Laboratório de Bacterioses e Virologia da MEV, Dra. Sonia, Prof. Magnavita, Elizne, Sr. Antonio, Gal e Ângela pelo tempo que passamos juntos.

Ao pessoal do Laboratório de Virologia do ICS: Isa, Andréa, Camila, Patrícia, Carol, Priscila, Julianna, Dellane e Gúbio .

Ao Dr. Antonio Carlos Junior, Rodrigo e Deni que possibilitaram a realização do experimento.

Ao Sr. Emanuel, grande amigo.

Drª. Selma Turrioni pela "força".

Drª. Ana Paula Peixoto, pelo convívio e ensinamentos no CDP.

Aos companheiros de curso: Ana Karine, Dany, Marcos, Daniel, Nildo, Suzi e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A parvovirose suína é uma doença infectocontagiosa disseminada em todo o mundo. Representa uma causa importante de falhas reprodutivas. O meio mais seguro de controle é a imunização do plantel através da vacinação. Objetivando realizar um estudo da ocorrência de anticorpos contra parvovirose suína em fêmeas imunizadas, foram realizadas, em uma Granja no município de Candéias-Ba, três colheitas a intervalos variados de tempo, de leite e sangue em 23 animais. Os resultados obtidos através de teste de inibição de hemaglutinação (IHA) mostraram que os animais apresentam títulos de anticorpos no leite mais elevados no início da lactação e que não há diferenças significativas entre os tetos cranial e caudal pois, 65 % das matrizes apresentam títulos de anticorpos iguais em ambos os tetos e ainda, que existe uma tendência ao aumento do título no sangue ao final do aleitamento, que pode ser em decorrência de vacinação efetuada durante esse último período.

Palavras-chaves: Parvovirose suína, vacinação, anticorpos, leite.

## LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA – ácido etileno diamínotetracético

IHA – inibição da hemaglutinação

IgA – imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

kb - quilobites

μL – microlitro

mg/dL – miligrama por decilitro

mL – mililitros

Meio Mem-E – Meio de cultura celular. Meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino em solução salina de Earle

nm - nanômetro

NADL2 – cepa não patogênica do Parvovírus suíno usada como referência

Natural killer – células exterminadoras naturais

PBS - "Phosphate Buffered Saline" - Solução tampão fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

PK15 – Porcine kidney cell line (células de rim suíno)

P/V – peso/volume

PVS – *Parvovirus suíno*

rpm – rotações por minuto

UHA – unidade hemaglutinante

UIH – unidade inibidora da hemaglutinação

°C – grau centígrado



VP1 – proteína viral 1

VP2 – proteína viral 2

VP3- proteína viral 3

NS-1 – proteína não estrutural

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição das matrizes de acordo com a idade. Candeias-Ba, 2005.

Figura 2 – Números de doses da vacinas na população de matrizes suínas em estudo. Candeias-Ba, 2005.

Figura 3 – Distribuição percentual de matrizes considerando o título de anticorpos no leite, no teto cranial e no teto caudal nos três momentos de colheita. Candeias-Ba, 2005.

Figura 4 – Título médio de anticorpos no leite, nas três colheitas considerando o número de doses da vacina.

Figura 5- Distribuição percentual de matrizes considerando o título de anticorpos no soro sanguíneo, nos três momentos de colheita. Candeias-Ba, 2005.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparação do percentual de matrizes com relação aos títulos de anticorpos no leite e soro sanguíneo, durante as três colheitas.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1 Parvovirose suína	16
2.1.1 Morfologia viral e características do vírus	17
2.2 Patogenia da infecção viral	18
2.2.1 Vias de transmissão	18
2.2.2 Disseminação	18
2.2.3 Replicação "in vivo" nos tecidos do hospedeiro	19
2.3 Imunidade ao vírus	19
2.3.1 Imunidade no feto e no recém nascido	19
2.3.2 Composição do colostro: imunoglobulinas	20
2.3.3 A glândula mamária	21
2.4 Medidas de controle e prevenção	22
<b>3 OBJETIVOS</b>	24
3.1 Objetivos gerais	24
3.2 objetivos específicos	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
4.1 Desenho experimental	25
4.1.1 Animais	25
4.1.2 Colheita de Amostras	25
4.2 Tratamento e inativação de amostras	26
4.2.1 Sangue de cobaio	26
4.2.2 Leite	26
4.2.3 Sangue suíno	27
4.3 Cultivo de células	28
4.4 Vírus NADL2	28
4.4.1 Produção do vírus	28
4.4.2 Titulação do vírus: Hemaglutinação (HA)	29
4.5 Teste de Inibição da Hemaglutinação (IHA): Titulação de anticorpos	29
4.6 Análise estatística	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	31

5.1 Animais em estudo	31
5.2 Título de anticorpos no leite nos tetos cranial e caudal	32
5.3 Média dos títulos de anticorpos no leite considerando o número de doses da vacina	34
5.4 Títulos de anticorpos no sangue das porcas vacinadas	35
5.5 Relação entre títulos de anticorpos no leite e no sangue	36
<b>6 CONCLUSÕES</b>	37
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	38
<b>APÊNDICE</b>	
APÊNDICE A	
<b>ANEXOS</b>	
ANEXO 1	
ANEXO 2	
ANEXO 3	
ANEXO 4	
ANEXO 5	
ANEXO 6	
ANEXO 7	
ANEXO 8	

## 1. INTRODUÇÃO

A parvovirose suína é uma das causas mais importantes de falhas reprodutivas. Ela provoca, principalmente, mortalidade embrionária, mumificação fetal, retorno ao estro, e natimortalidade, o que resulta em perdas econômicas para o produtor. O vírus está disseminado em 100% dos rebanhos e os sinais da doença são subclínicos, necessitando testes laboratoriais para o diagnóstico.

O controle da doença baseia-se na imunização do plantel, garantindo que leitoas sejam imunizadas antes da primeira cobertura. A vacinação é o meio mais seguro para a prevenção da doença, pois garante proteção à mãe e aos recém-nascidos através da imunidade passiva.

Na Bahia não existem até o presente, estudos da ocorrência do vírus e dados sorológicos, assim como um programa de controle através de vacinação. Nesta monografia se pretende realizar um estudo da ocorrência de anticorpos contra Parvovírus suíno em leite e sangue de porcas vacinadas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Parvovirose suína

A parvovirose suína é uma doença infecciosa e endêmica associada a falhas reprodutivas e disseminada em rebanhos de todo o mundo (DAMM et al., 2002; MENGELING et al., 2000). O primeiro reporte foi realizado por Cartwright e Huck em 1967 na Inglaterra (ARNAULD et al., 1998; SOARES et al; 1998 GOUVEIA et al., 1984).

O agente etiológico é o *Parvovirus suino* (PVS) também encontrado na literatura como *Parvovirus porcino* (PPV). No Brasil, estudos sorológicos têm sido desenvolvidos em granjas de São Paulo (BERSANO et al., 1993), Santa Catarina com animais vacinados (DAMBRÓS et al., 1994), ou não-vacinados: no Rio Grande do Sul, Santa Catarina (MARTINS et al., 1994) e Minas Gerais (GOUVEIA et al., 1984), dados que mostram a incidência da doença nestes animais (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A infecção decorrente da parvovirose em porcas gestantes e em leitões de reposição não imunizadas, é responsável por falhas reprodutivas que têm como consequência morte embrionária, fetos mumificados, natimortalidade, pequenas leitegadas e retorno ao estro (SMEDI) (MALDONADO et al., 2005; DAMM et al.,

2002; MENGELING et al., 2000; ARNAULD et al., 1998 MADSEN et al., 1996), tornando-se a maior causa da síndrome da deficiência reprodutiva em suínos (SOARES et al., 1998).

### **2.1.1 Morfologia viral e características do vírus**

O *Parvovírus suíno* pertence a família *Parvoviridae*, sub-família *Parvovirinae*, gênero *Parvovirus*. É um pequeno vírus não envelopado, diâmetro de 20nm, simetria icosaédrica, cujo material genético está contido numa fita simples de ácido desoxirribonucléico (DNA) com tamanho de 5,2 kb. (MENGELING et al., 2000 ).

Foram descritas três proteínas estruturais envolvidas na formação do capsídeo viral: VP1, VP2 e VP3, com pesos moleculares de 83.000, 64.000 e 60.000 Daltons respectivamente, e apenas uma proteína não estrutural NS-1 de peso molecular 84.000 Daltons (MUZYCZKA & BERNS 2002). O vírus possui atividade aglutinante para hemácias de diversas espécies (ROEHE et al., 1986). As células de rim fetal suíno suportam replicação do PVS "in vitro" (MENGELING et al., 2000). É estável em pH entre três e nove, podendo ser destruído em cinco minutos quando é usada soda cáustica ou hipoclorito de sódio. É sensível ao formol a 10% e glutaraldeído a 2%. Pode se manter ativo por mais de 20 semanas em instalações desocupadas. Em secreções e excreções de animais infectados pode resistir durante meses, principalmente em rebanhos onde a higiene não é satisfatória. É



inativado a 56°C por 60 minutos (SOBESTIANSKY et al., 1999), ou pela ação da formalina,  $\beta$ -propiolactona (PRIKHOD'KO et al., 2003; MUZYCZKA & BERNIS 2002).

## **2.2 Patogenia da infecção viral**

### **2.2.1 Vias de transmissão**

A transmissão ocorre por via predominantemente oronasal, pela ingestão de fezes contaminadas, contatos com produtos de abortamento, restos fetais ou placentários e indiretamente através de fômites. Fetos ao serem infectados após 70 dias de gestação, podem se tornar fonte de infecção persistente no rebanho, se nascerem infectados (SOBESTIANSKY et al., 1999).

### **2.2.2 Disseminação**

A infecção pode ocorrer através da aquisição de reprodutores infectados que eliminam vírus pelo sêmen (BICAN et al., 2002; GRADIL et al., 1990), fetos ou fezes contaminadas (SOBESTIANSKY et al., 1999). Após introdução no plantel, o vírus é fácil e rapidamente disseminado levando apenas três meses para que todo o rebanho esteja infectado (JOHNSON et al., 1976). A disseminação é facilitada em

regiões onde ocorre intenso tráfego de animais ou a suinocultura é praticada em alta densidade como a exemplo das granjas tecnificadas (KRZYZANIANK et al., 2002).

### **2.2.3 Replicação "in vivo" nos tecidos do hospedeiro**

O vírus tem afinidade pelos linfonodos, tonsilas, timo, pulmão, glândulas salivares, e outros órgãos. Replica-se com grande facilidade em tecidos de rápida multiplicação como de embriões, fetos e espermatozóides (SOBESTIANSKY et al., 1999; BACHMANN et al., 1975). Após a infecção oronasal o parvovírus aloja-se nas tonsilas, replica-se e ocorre viremia três a cinco dias após infecção. Os anticorpos podem ser detectados entre cinco e sete dias atingindo níveis máximos por volta de 14 dias pós-infecção (SOBESTIANSKY et al., 1999).

## **2.3 Imunidade ao vírus**

### **2.3.1 Imunidade no feto e no recém-nascido**

O desenvolvimento do sistema imune segue uma ordem comum para os fetos dos mamíferos. O timo é o primeiro órgão a se desenvolver, e nos suínos ocorre por volta de 40 dias pós-concepção. As células que contêm imunoglobulinas

têm seu desenvolvimento posterior ao aparecimento do baço e linfonodos, mas anticorpos dificilmente serão encontrados. Apesar da capacidade da resposta imune se desenvolver rapidamente após surgimento dos órgãos linfóides, nem todos os antígenos são capazes de sensibilizar o tecido linfóide fetal. Nos fetos suínos a produção de anticorpos contra parvovírus ocorre 58 dias pós-concepção e os linfócitos sanguíneos podem responder aos mitógenos no período de 48 a 54 dias. Os linfócitos B circulantes, têm seu número aumentado por volta de 70 e 80 dias e as células "natural killer" se desenvolvem algumas semanas após o nascimento. A resposta a antígenos no feto é essencialmente do tipo IgM (TIZARD 1996).

### **2.3.2 Composição do colostro: imunoglobulinas**

Os leitões recém-nascidos são dependentes do colostro para aquisição da imunidade passiva. Este é o resultado do acúmulo de secreções da glândula mamária nas semanas finais da gestação com proteínas transferidas da circulação sanguínea. Nos suínos, como na maioria dos animais domésticos, a imunoglobulina predominante no colostro é a IgG (3000 a 7000 mg/dL), seguida de IgA (950 a 1050 mg/dL) e por último a IgM (250 a 320 mg/dL), assim a IgG corresponde com 65 a 90% dos anticorpos presentes no colostro. Com o decorrer da lactação e mudança da secreção para leite, há queda dos níveis de IgG (100-300 mg/dL) e IgM (30-90 mg/dL) e aumento do nível de IgA (300 a 700 mg/dL) que se torna predominante (ROOKE et al., 2002; TIZARD 1996). Fêmeas primíparas apresentam menor valor

na concentração de IgG comparando-se com pluríparas (MACHADO NETO et al.,2001).

A concentração de imunoglobulinas no plasma de leitões está diretamente relacionada com o aumento da sobrevivência após o nascimento (HENDRIX et al., 1976), bem como a ordem de nascimento, e de sucção (TUCHSCHERER et al., 2000). O tempo de nascimento, o intervalo entre o nascimento e a primeira sucção, e a duração da mamada nas oito primeiras horas afetam o nível individual de anticorpos nos leitões (DAMM et al., 2002).

### **2.3.3 A glândula mamária**

A glândula mamária é uma glândula cutânea com ampla variação entre as espécies, no que diz respeito ao aspecto e quantidade de substâncias secretadas (PARK e JACOBSON 1993). Segundo MORÉS et al., (1998), as glândulas mamárias, na porca, classificam-se em três grupos: peitorais, abdominais e inguinais alinhadas em duas fileiras paralelas que vão da região do peito até a prega da virilha. Os leitões demonstram maior preferência pelos tetos peitorais, onde o leite é mais abundante, mais açucarado e mais gorduroso. A diferença de produtividade em função da localização dos tetos, interfere no desenvolvimento dos recém-nascidos, pois estes elegem um teto preferido, durante os primeiros dias pós-parto, isto favorece a falta de uniformidade na leitegada.

## 2.4 Medidas de controle e prevenção

Podem ser usadas as seguintes medidas de controle ou prevenção da doença causada pelo PVS:

1 – Exposição ao vírus: Esta forma de controle é chamada de “feed back” e consiste em colocar marrãs junto com animais adultos infectados pelo PVS para que entrem em contato com suas secreções e excreções, mas esta medida além de não garantir a imunidade das leitoas causa risco de contaminação por outras doenças.

2 – Utilização de vacinas: É a forma mais prática e segura para prevenção da doença. No Brasil as vacinas de uso comercial são inativadas podendo ser do tipo aquosas ou oleosas, sendo as do tipo aquosa mais usadas no nosso país.

As vacinas devem ser administradas, principalmente, às fêmeas de reposição que se tornam os animais mais susceptíveis do plantel quando cessa a imunidade passiva, via colostro, por volta do quinto mês de vida (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Para estes animais são recomendadas duas doses da vacina duas a quatro semanas antes do início da vida reprodutiva (ORAVAINEN et al., 2005). Estes animais devem ser revacinados 10 a 15 dias após o primeiro, segundo, terceiro, quinto, sétimo e nono partos com vacinas oleosas ou 10 a 15 pós partos para vacinas aquosas (SOBESTIANSKY et al., 1999; BARCELLOS et al., 1996).

Nos machos a vacinação deve ser realizada cinco a seis semanas antes de entrarem para reprodução e uma segunda dose 15 a 20 dias após primeira vacinação. À partir daí deve ser revacinado anualmente.

Existem as vacinas atenuadas que também podem ser usadas, mostrando efetividade no controle das falhas reprodutivas e infecção fetal (MADSEN et al., 1996). Entretanto o desenvolvimento de vacinas inativadas, mais seguras, permitiu o controle das falhas reprodutivas causadas pelo PVS (DAMM et al., 2002), assim, estas vacinas inativadas impedem também a infecção intra-uterina e o efeito teratogênico da infecção pelo vírus (KAMSTRUP et al., 1998).

Dentre outras medidas de controle os procedimentos regulares no manejo são importantes para manter a população imune contra PSV.

1-Evitar a compra de animais gestantes sem vacinação, que é a única maneira de assegurar que porcas jovens sejam soropositivas antes da primeira cobrição

2-As marrãs vacinadas apenas uma vez, apresentam pequenas leitegadas e grande número de fetos mumificados (ORAVAINEN et al., 2005; CLARK et al., 1996).

3- Animais pluríparas e cachaços devem também fazer parte do programa de vacinação e os protocolos devem ser seguidos à risca bem como as recomendações dos fabricantes (ORAVAINEN et al., 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Detectar anticorpos contra *Parvovirus suíno* a partir do sangue e leite de porcas vacinadas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1- Utilizar a técnica de IHA para a detecção de anticorpos no leite e sangue em porcas vacinadas.

2- Comparar os títulos de anticorpos no leite e verificar diferenças nos níveis de imunoglobulinas entre tetos cranial e caudal

3- Comparar os títulos de anticorpos no leite e no sangue durante o período de aleitamento.

4- Determinar possíveis diferenças no título de anticorpos no leite, segundo o número de doses de vacina recebida.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Desenho experimental**

#### **4.1.1 Animais**

Foram utilizados fêmeas suínas híbridas da linhagem denominada Naima, com idade de 9 a 50 meses, vacinadas aos 185 dias de idade, revacinadas 21 dias após a primeira vacinação e 10 a 12 dias pós-parto, com vacina inativada, por via intramuscular na dosagem de 5mL. Estes animais pertencem a uma Granja situada no Município de Candeias-Bahia.

#### **4.1.2 Colheita de Amostras**

Foram colhidas amostras de 23 animais. De cada animal foram realizadas três colheitas sucessivas durante três semanas. À primeira colheita corresponde um período de 0 a seis dias de lactação, a segunda de sete a 13 dias, e a terceira dos 14 aos 20 dias de lactação. Em cada colheita foram retiradas: uma amostra de leite de um teto cranial, uma de um teto caudal e cerca de 1,5 mL de sangue da orelha.



Para facilitar a ejeção do leite foi aplicado 0,3 mL de ocitocina sintética por via endovenosa na orelha.

Todo material colhido foi acondicionado em tubos de vidro previamente autoclavados à 121°C por 30 minutos, mantidos sob refrigeração em caixa térmica até centrifugação e posterior armazenagem à -20°C, no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

## **4.2 Tratamento e inativação de amostras**

### **4.2.1 Sangue de cobaio**

O sangue de cobaio foi utilizado para tratamento das amostras (JOO et al., 1976). Era colhido por punção cardíaca e recolhido em tubos com antiaglutinante (EDTA) e submetido a três lavagens sucessivas com PBS sob centrifugação à 1700 rpm, por 10 minutos.

### **4.2.2 Leite**

O leite foi centrifugado na temperatura ambiente à 5000 rpm, durante dez minutos. Em seguida o sobrenadante foi tratado com solução de caolim a 25% (P/V)

em PBS com pH 7,2, (1:2) e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida centrifugado à 3000 rpm durante 10 minutos.

#### **4.2.3 Sangue suíno**

No Laboratório de Virologia do ICS, o sangue foi centrifugado à temperatura ambiente à 3000 rpm durante 10 minutos. O soro foi coletado, armazenado em microtubo estéril e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O soro foi mantido a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em banho Maria com objetivo de inativar o complemento. Ao soro inativado foi adicionada solução de caolim à 25% (P/V) em PBS com pH 7,2, na proporção (1:2) e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida centrifugado à 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi tratado com hemácias de cobaio à 30% em PBS, pH 7,2 por 30 minutos e novamente centrifugado à 3000 rpm por 10 minutos. O objetivo do tratamento de amostras a serem testadas com caolim e hemácias é remover hemaglutininas naturais e inibidores inespecíficos da HA.

### **4.3 Cultivo de células**

Foram cultivadas células da linhagem PK15 em meio Mem-E com 10% de soro fetal bovino (SFB), para serem usadas na replicação do *Parvovirus suíno*. A camada celular foi tripsinada, ressuspensa em meio Mem-E com 10% de SFB, incubadas, em estufa, a 37°C e diariamente observadas, em microscópio óptico invertido para verificar a monocamada celular.

## **4.4 Vírus NADL 2**

### **4.4.1 Produção do vírus**

As células PK15 após tripsinadas foram infectadas com o vírus da cepa NADL2 e deixadas por uma hora à 37°C para adsorção viral. Posteriormente a garrafa foi completada com meio Mem-E com 10% de SFB e incubado à 37°C. Observado o efeito citopático em microscópio óptico invertido, a garrafa foi congelada, descongelada para rompimento das células e centrifugada numa temperatura de 10°C à 10 000 rpm por 15 minutos, para que o sobrenadante ficasse livre das células nas quais o vírus foi cultivado. Depois de centrifugado o vírus foi aliquotado em frascos de vidro previamente esterilizados a 180°C os quais foram fechados e congelados a – 20°C até o momento do teste.

#### **4.4.2 Titulação do vírus: Hemaglutinação (HA)**

Para verificar a atividade do vírus a técnica utilizada foi a hemaglutinação (HA). A titulação foi realizada em microplaca de fundo U com 96 poços. Em todos os poços das colunas 1 e 2, a partir fila B até a fila G, foram colocados 50 $\mu$ L de PBS. Foram adicionados 50 $\mu$ L do vírus nas filas A e B. A diluição foi feita à partir da fila B retirando-se 50 $\mu$ L da solução e transferindo para o poço seguinte até a fila H, quando se desprezava os 50 $\mu$ L restantes. Na coluna 3, em todos os poços foram colocados 50 $\mu$ L de PBS. Em seguida foram adicionados 50 $\mu$ L de solução de hemácias de cobaio à 0,6% em PBS em todos os poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente por duas horas. A atividade do vírus foi de 64 UHA. Para realização da prova de IHA, o vírus foi diluído para que a atividade hemaglutinante ficasse entre 4 e 8 UHA JOO et al., (1976).

#### **4.5 Teste de Inibição da Hemaglutinação (IHA): Titulação de anticorpos**

A prova de IHA adaptada de JOO et al., (1976) foi realizada em microplacas com fundo em U com 96 poços. 25 $\mu$ L de PBS foram colocados em todos os poços da fila B até a fila H. Em cada coluna nas filas A, B e H foram colocados 25 $\mu$ L de cada amostra a ser testada. A diluição foi feita à partir da fila B, retirando-se 25 $\mu$ L de cada poço e adicionando ao seguinte até a fila G, e se desprezava os restantes 25 $\mu$ L. O vírus foi adicionado em todos os poços das filas de A até G na quantidade

de 25 $\mu$ L. Após uma hora em que a placa esteve incubada em temperatura ambiente, foram colocados 50 $\mu$ L de solução de hemácias de cobaio a 0,6% em todos os poços e a leitura realizada após duas horas.

#### **4.6 Análise estatística**

Este trabalho foi analisado com o programa *SPSS-Statistical Package Social Science. V.10.0*, onde foram realizadas análises bivariadas admitindo-se nível de significância  $\alpha < 5\%$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Animais em estudo

Na figura 1 observa-se que avaliando o perfil da amostragem, identificou-se que o maior percentual de animais encontra-se entre o segundo e o terceiro ano de vida.

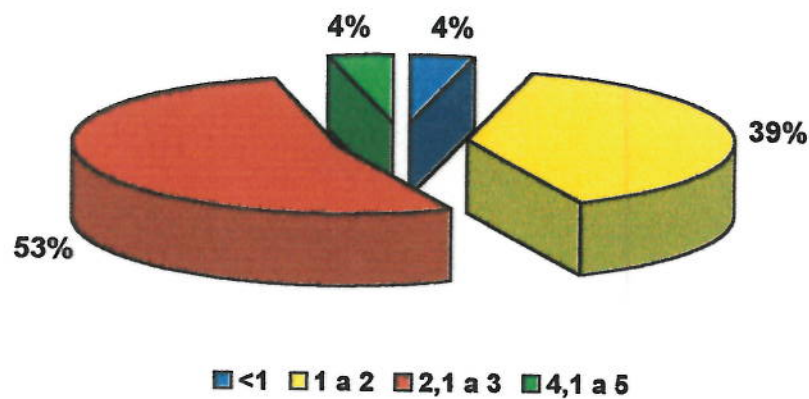


Figura 1- Distribuição das matrizes de acordo com a idade. Candeias-Ba, 2005.

A Figura 2 mostra que na população estudada o número de vacinas está entre 2 e 10, apresentando um percentual reduzido de porcas com 10 doses de vacinas. Os maiores percentuais se destacam para 3, 4, 6 e 7 doses. Cada animal recebeu duas doses de vacina antes da primeira gestação e se repetiu após 10 a 12 dias de cada parto.

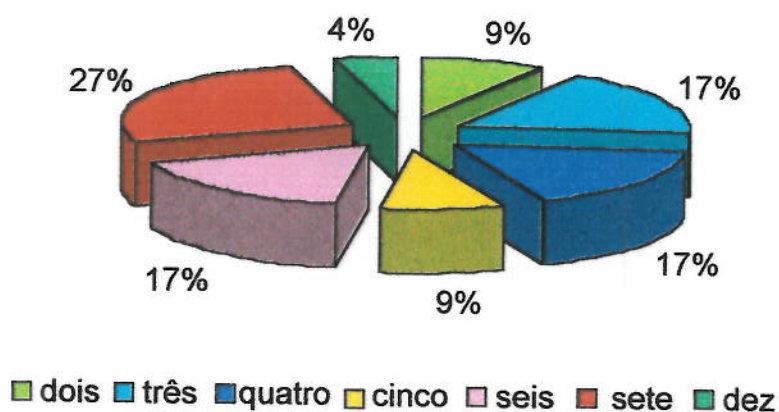


Figura 2 – Números de doses da vacina na população de matrizes suínas em estudo. Candeias-Ba, 2005.

## 5.2 Título de anticorpos no leite nos tetos cranial e caudal

Na figura 3 observa-se que o maior percentual de matrizes encontra-se com título de anticorpos no leite de 1025 a 4096 UIH durante todas as colheitas, tanto no teto cranial quanto no caudal.

Na primeira colheita foram encontrados 69,6% de matrizes com resultado de título igual em ambos os tetos, nas segunda e terceira o resultado é de 65,2%. Neste estudo, a análise estatística demonstrou que o nível de imunoglobulinas no teto caudal é estatisticamente semelhante ao teto cranial ( $p < 0,05$ ). Estes resultados independem do número de vacinas e seriam diferentes daqueles estudos que afirmam que no teto cranial são encontrados maiores níveis de imunoglobulinas (JANSEN et al., 2001; SOBESTIANSKY et al., 1999; TIZARD 1996).

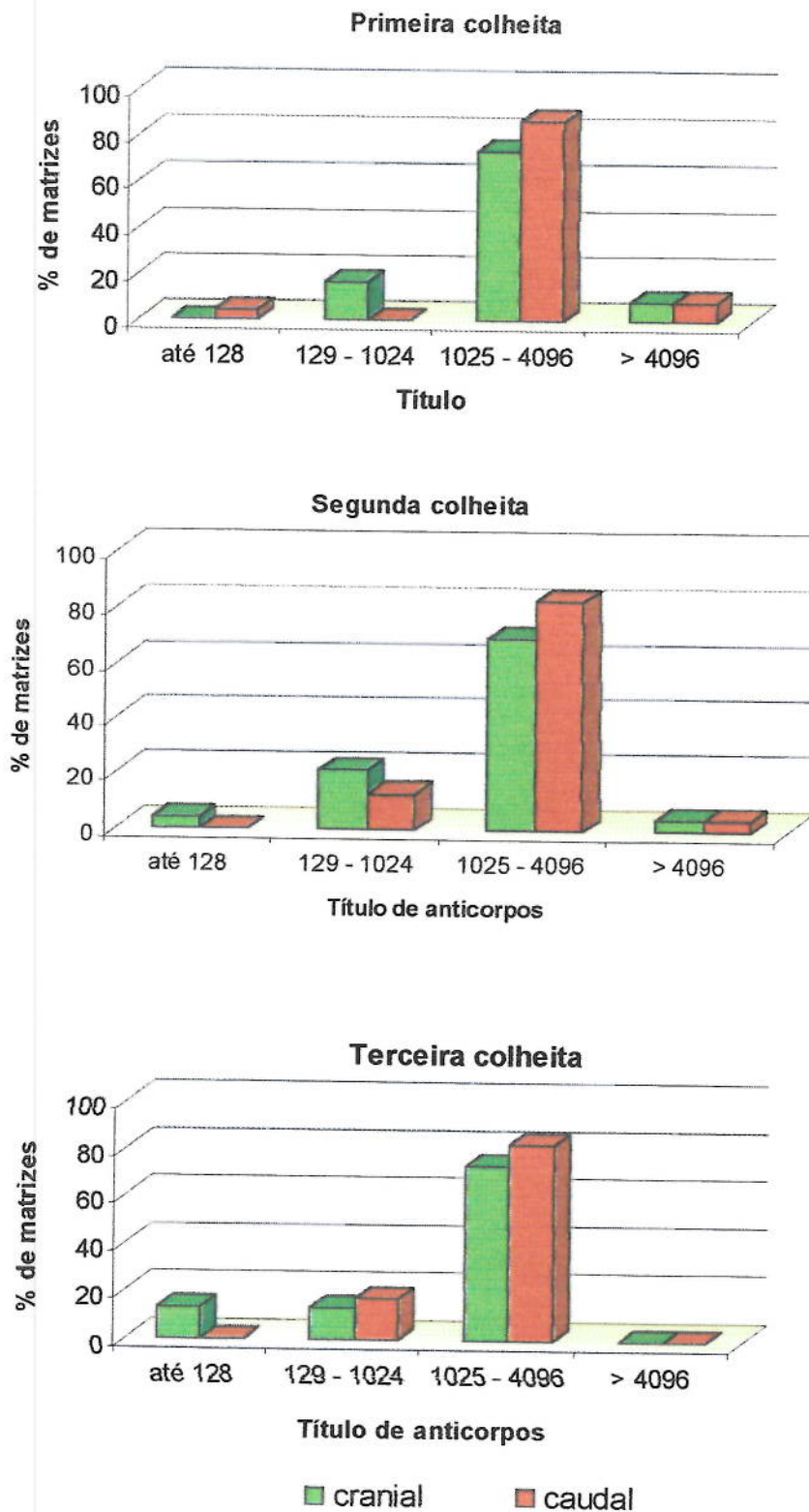


Figura 3 – Distribuição percentual de matrizes considerando o título de anticorpos no leite no teto cranial e no teto caudal nos três momentos de colheita. Candeias-Ba, 2005.



Neste estudo observa-se também na terceira colheita, uma queda no título de anticorpos, já que nenhuma matriz atinge a faixa de título de anticorpos superior a 4096 UIH. Os dados individuais mostram que desde a 2ª dose até a 7ª dose, os títulos variam de 1024 a 4096 UIH.

### 5.3 Média dos títulos de anticorpos no leite considerando o número de doses da vacina

Na figura 4 observa-se uma variação da média de títulos de anticorpos no leite indicando que o número de vacinação não está influenciando um maior título de anticorpos.

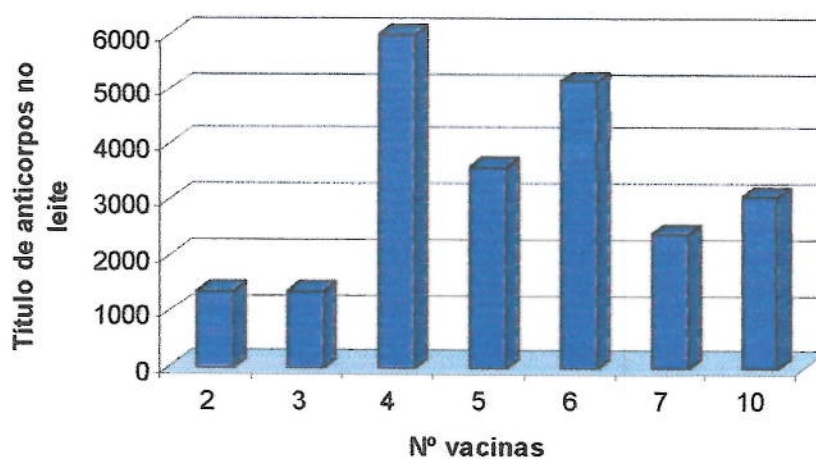


Figura 4 título médio de anticorpos no leite, nas três colheitas considerando o número de doses da vacina

#### 5.4 Títulos de anticorpos no sangue das porcas vacinadas.

Na figura 5 a pesquisa de anticorpos no soro sanguíneo indicou que todas as matrizes apresentaram um título maior que 128 UIH nos três momentos de colheita. Avaliando sua variação observa-se na primeira colheita maior percentual de matrizes na faixa de 129 a 1024 UIH; na segunda colheita os percentuais encontram-se bem distribuídos entre as três faixas de títulos. Observa-se na terceira colheita elevação do percentual de matrizes com título maior que 4096 UIH, resultados que indicariam títulos de anticorpos em resposta à vacinação no período final de aleitamento e coincidente com a 3ª colheita.

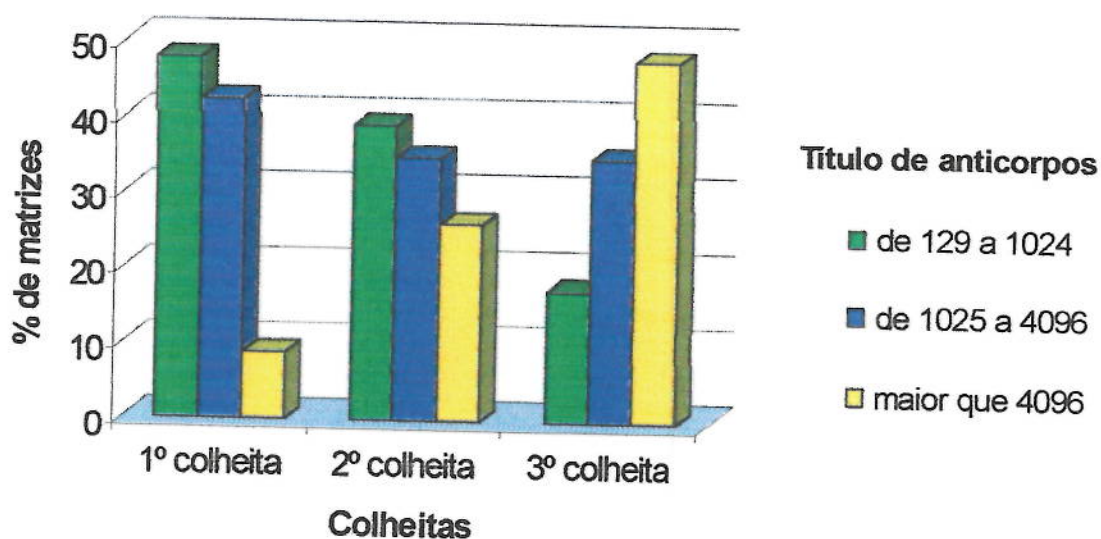


Figura 5 – Distribuição percentual de matrizes considerando o título de anticorpos no soro sanguíneo, nos três momentos de colheita. Candeias, 2005.

### 5.5 Relação entre títulos de anticorpos no leite e no sangue

Na primeira colheita, as matrizes tendem a apresentar maior de título de anticorpos no leite (quadro 1). A tendência mostra que o percentual de matrizes com títulos de anticorpos mais elevados no leite, começa a diminuir na segunda colheita e na terceira colheita existe expressivo aumento de matrizes com título de anticorpos mais elevados no soro sanguíneo. Esses resultados são coincidentes com DAMM et al., (2002) e KLOBASA et al., (1987) os quais mostram essa tendência no leite e no sangue. Segundo JOHNSON et al., 1976 o colostro pode ter de 10 a 100 vezes mais anticorpos que o soro da porca no momento da parição.

Quadro 1 – Comparação do percentual de matrizes com relação aos títulos de anticorpos no leite e soro sanguíneo durante as três colheitas.

	1º Colheita	2º Colheita	3º Colheita
Percentual de animais com título de anticorpos mais elevados no leite	47,8%	26,0%	8,7%*
Percentual de animais com título de anticorpos semelhante no leite e no soro sanguíneo	17,4%	43,4%	39,1%*
Percentual de animais com título de anticorpos mais elevados no soro sanguíneo	34,8%	30,3%	52,1%*

Candeias, 2005

\*  $p < 0,05$

## 6 CONCLUSÕES

1. Neste trabalho foi determinado que a vacinação é efetiva em favorecer a imunidade passiva aos recém-nascidos. As porcas devem possuir altos níveis de imunoglobulinas no colostro para que os recém-nascidos adquiram quantidade suficiente de anticorpos e estejam protegidos até o desenvolvimento total de seu sistema imune.

2. As diferentes colheitas a intervalos de sete dias mostraram as variações dos títulos de anticorpos no leite contra *Parvovirus suíno* em porcas vacinadas.

3. Os títulos de anticorpos maiores no leite, como era previsto, foram encontrados durante a primeira colheita (0-6 dias pós parto).

4. Não foram encontradas diferenças significativas de títulos de anticorpos entre os tetos cranial e caudal portanto, pelo nosso estudo, é importante garantir que todos os recém-nascidos mamem o colostro, independente da localização destes.

5. Existe uma tendência à diminuição de títulos de anticorpos no leite, com um aumento nos títulos de anticorpos no sangue.

6. Esta pesquisa precisa de um maior número de amostras para confirmar estes achados, assim como seria interessante verificar a duração da imunidade passiva nos filhotes até o momento em que estes venham a ser vacinados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.L.; MORÉS, N.; BARIONI JUNIOR, W. Fatores de risco associados ao desempenho reprodutivo da fêmea suína. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.52, n.5, p.479-486, 2000.

ARNAULD, C.; LEGEAY, O.; LAURIAN, Y.; THIERY, R.; DENIS, M.; BLANCHARD, P.; JESTIN, A. Development of a PCR-based method coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of porcine parvovirus and application to diagnosis in piglet tissues and human plasma. **Molecular and cellular probes**, v.12, p. 407-416, 1998.

BACHMANN, P.A.; SHEFFY, B.E.; VAUGHAN, J.T. Experimental in utero infection of fetal pigs with s Procine Parvovirus. **Infection and immunity**, v.12, n.3, p. 455-460, 1975.

BARCELLOS, D.E.S.N.; SOBESTIANSKY, J.; PIFFER, I. utilização de vacinas em produção de suínos. **Suinocultura Dinâmica**, Concórdia-SC, Ano V, n.19, 1996.

BERSANO, J.G.; SCHOTTEN, M.H.S.; KROEFF, S.S.E.; BASTOS, G.M. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o Parvovírus Suíno no Estado de São Paulo. In: **Reunião anual do instituto biológico**, n.6, São Paulo, 1993. p.17.

BICAN, J.; SVOBODA, M.; DRABEK. Porcine parvovirus infection in boars in the Czech Republic. **Acta veterinary brno**, v.71, p.45-49, 2002.

CLARK, K.L. Epidemiology and management of selected swine reproductive diseases. **Animal reproduction science**, v.42, p.447-454, 1996.

DAMBRÓS, R.M.F.; MARQUES, J.T.L.; JAENISCH, F.R.F. Demonstrativo sorológico para parvovírus suíno no Estado de Santa Catarina no ano de 1994. Embrapa-CNPSa, Concórdia-SC, 1994,

DAMM, B.I.; FRIGGENS, N.C.; NIELSEN, J.; INGVARTSEN, K.L.; PEDERSEN, L.J. Factors affecting the transfer of Porcine Parvovirus antibodies from sow to piglet. **Journal Veterinary medicine**, v.49, p.487-495, 2002.

GOUVEIA, A.M.G.; GOMEZ, M.C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. **Pesquisa veterinária brasileira**, v.41, n.1, p.17-22, 1984.

GRADIL, C.M.; JOO, H.S.; MOLITOR, T.W. Persistence of porcine parvovirus in swine infected in utero and followed through maturity. **Zentralbl veterinarmed B**. 1990 V.37,n.4, p.309-316.

HENDRIX, W.F.; KELLEY, K.W.; GASKINS, C.T.; HINRICH, D.J. Porcine neonatal survival and serum gamma globulins. **Jorunal animal science**, v.47, p.1281-1286, 1976.

JANSEN, A.R.; ELNIF, J.; BURRIN, D.G.; SANGILD, P.T. Development of intestinal immunoglobulin absorption and enzyme activities in neonatal pigs is diet dependent. **Journal of nutrition**, v.131, p.3259-3265, 2001.

JOHNSON, R.H.; DONALDSON-WOOD, C.; JOO, H.S.; ALLENDER, U. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. **Australian veterinary journal**, v.52, n.2, p.80-84, 1976.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H.; PATH, M.R.C. A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Australian veterinary journal**, v.52, p.422-424, 1976.

KAMSTRUP, S.; LANGEVELD, J.; BOTNER, A.; NIELSEN, J.; SCHAAPER, W.M.M; BOSHUIZEN, R.S.; CASAL, J.I.; HOJRUP, P.; VELA, C.; MELOEN, R.; DALSGAARD, K. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. **Virus research**, v.53, p.163-173, 1998.

KLOBASA, F.; WERHAHN, E.; BUTLER, J.E. Composition of sow milk during lactation. **Journal animal science**, v.64, n.5, p.1458-1466, 1997.

KLOBASA, F.; BUTLER, J.E. Absolute and relative concentrations of immunoglobulins G, M, and A, and albumin in the lacteal secretion of sows of different lactation numbers. **Animal journal veterinary research**, v.48, n.2, p.176-82, 1987.

KRZYZANIANK E.L.; GOTTSCHALK, A.F.; MODOLO, J.R.; PADOVANI, C.R.; KIECKHOFER.; VISENTINI, P.R.S. Avaliação da mobilização e distribuição temporal e espacial de focus de parvovirose suína no Estado de São Paulo. **A hora veterinária**, Porto Alegre, Ano 21, n.126, p.33-37, 2002.

MACHADO NETO, R.; PACKER, I. U.; MENTEN, J. F.; LAVORENTI, A. Efeito da raça, dieta, época e ordem de parição na concentração de imunoglobulina G no

colostro de suínos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.36, n.10, p.1295-1299, 2001.

MADSEN, E.S.; MADSEN, K.G.; NIELSEN, J.; JENSEN, M.H.; LEI, J.C.; HAVE, P. Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NS1 may distinguish between vaccinated and infected pigs. **Veterinary microbiology**, v.54, p.1-6, 1996.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **The veterinary journal**, v.169, p.454-456, 2005.

MARTINS, R.M.; ROEHE, P.M.; GUIMARÃES, L.G.; BANGEL, E.V.; GUIZZARDI, I.I.; BRUCHMAN, H.A.; VIDOR, T. Sorologia de parvovirose suína em granjas dos estados de santa catarina e rio grande do sul. **Anais do 1º congresso nacional de veterinários especialistas em suínos**, Santa Catarina, ABRAVES, 1994.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C.; The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. **Animal reproduction science**, v.60, n.61, p.199-210, 2000.

MORÉS, N.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; MORENO, A.M.. Manejo do leitão desde o nascimento até o abate. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P.R.S.; SESTI, L.A.C. **Suinocultura intensiva: produção, manejo e saúde do rebanho**, 1ª.ed. Concórdia: Embrapa-CNPSa, 1998. 388p. p.135-162.



MUZYCZKA, N.; BERNS, K.I. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology** 5th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. v.2, p.2327-2359.

ORAVAINEN, J.; HEINONEN, M.; TAST, A.; VIROLAINEN, J.; PELTONIEMI, O. High porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. **Reproduction domestic animal**, v.40, n.1, p.57-61. 2005.

PARK, C. S. JACOBSON, N.L. Glândula mamária e lactação. In: DUKES, H.H. **Fisiologia dos animais domésticos**, 11<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1993. 858p.p.645-659.

PRIKHOD'KO, G.G.; REYES, H.; VASILYEVA, I.; BUSBY, T.F.; Establishment of a porcine parvovirus (PPV) DNA standard and evaluation of a new lightcycler nested-PCR assay for detection of PPV. **Journal of virology methods**, v.111, n.1, p.13-19, 2003.

ROEHE, P. Parvovirose suína. **A hora veterinária**, Porto Alegre, Ano 6, n.31, p.28-33, 1986.

ROOKE, J.A.; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock production science**, v.78, p.13-23, 2002.

SOARES, R.M.; DURIGON, E.L.; BERSANO, J.G.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of virological methods**, v.78, p.191-198, 1998.

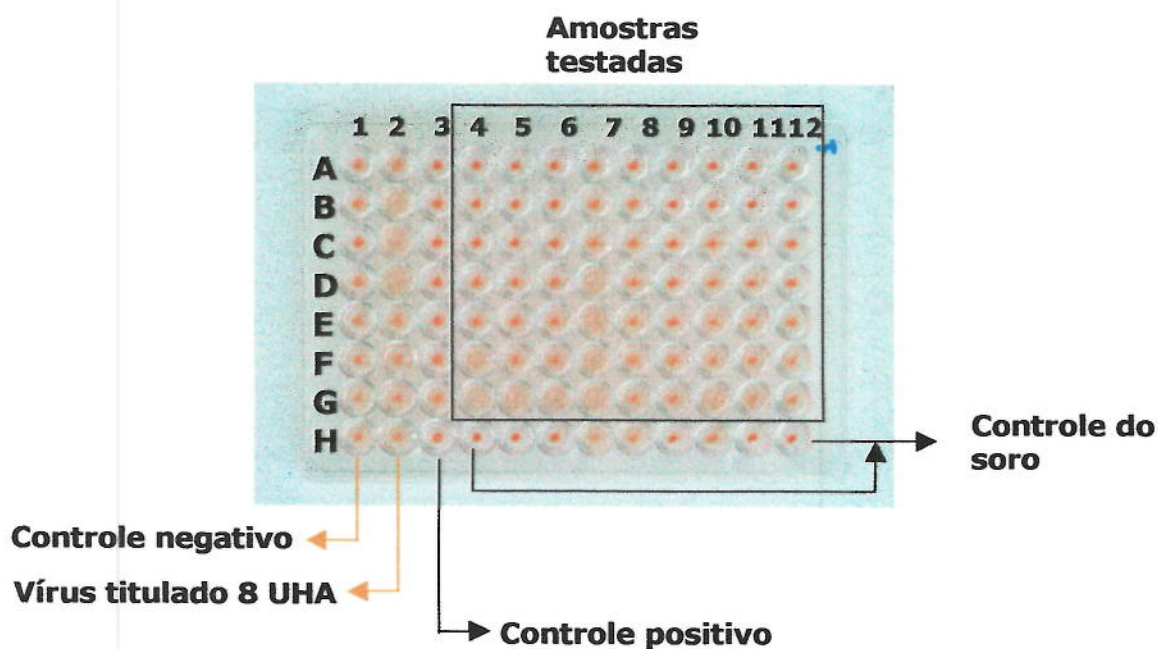
SOBESTIANSKY, J.; MORES, N.; ROEHE, P.M. Parvovirose Suína. **Suinocultura Dinâmica**, Embrapa-CNPSa, Concórdia-SC, Ano 7, n.21, 1999.

TIZARD, I.R. Imunidade no feto e no recém-nascido. In: \_\_\_\_\_ **Imunologia veterinária uma introdução**. 5ª.ed. São Paulo: Roca, 1996. 531p.p.244-258.

TUCHSCHERER, M.; PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A.; TIEMANNB, U. Early identification of neonates at risk traits of newborn piglets with respect to survival. **Theriogenology**, v.54, p.371-388, 2000.

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE A**  
**TITULAÇÃO DO VÍRUS E PROVA DE INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (IHA)**

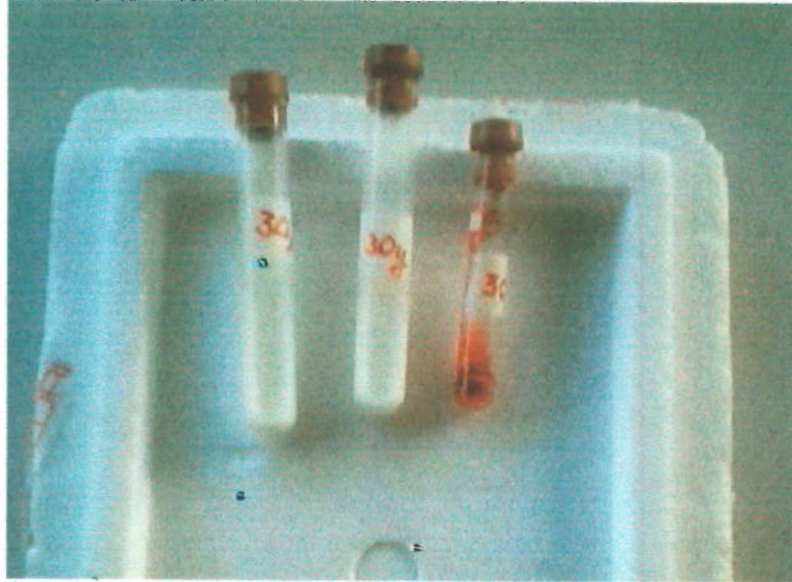


Esta é a imagem de uma microplaca com 96 poços e fundo em U. Na coluna 1 temos o controle negativo, uma solução (1:1) de PBS e solução de hemácias de cobaio a 0,6%; na coluna 2 o vírus diluído foi titulado através do teste de hemaglutinação e o resultado foram 8 UHA.

Para prova de inibição da hemaglutinação (IHA) foi usado um controle positivo na coluna 3, ou seja, um soro previamente testado cujo resultado, deve ser repetido na prova para garantir a validade da mesma, foi 16 000 UIA. Nas colunas de 7 a 12 estão as amostras diluídas que foram testadas e onde pode-se observar diferentes títulos (UIA) como resultado.

## **ANEXOS**

**ANEXO 3**



**Leite e sangue após colheita. Candeias-Ba, 2005**

**ANEXO 4**



**Sobrenadante de leite**



**Soro sanguíneo**

**Lab.Virologia - ICS-UFBa, 2005**

## ANEXO 5



### **Natimortos**

[http://allategeszsegugy.pfizer.hu/cms/netalon.xml?data\\_id=60](http://allategeszsegugy.pfizer.hu/cms/netalon.xml?data_id=60)

## ANEXO 6



**Fetos infectados em diferentes estágios**  
[www.saudeanimal.com.br/artig145.htm](http://www.saudeanimal.com.br/artig145.htm)



**ANEXO 7**



**Feto mumificado, Sobestiansky 1999.**

**ANEXO 8**



**Fetos mumificados em diferentes estágios  
© 1987 Uitgeverij Terra Zutphen**



**ANEXO 1**



**Colheita de Sangue. Candeias-Ba, 2005**

**ANEXO 2**



**Colheita de leite. Candeias-Ba, 2005**