

SILVIO ROBERTO THIMOTEO BORGES

**ANÁLISE DO RISCO DA OCORRÊNCIA DA SÍNDROME REPRODUTIVA E
RESPIRATÓRIA DOS SUÍNOS (PRRS) EM GRANJAS DE SUÍNOS
TECNIFICADAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. ESTUDO DO PERFIL
DESCRITIVO DA SITUAÇÃO ATUAL**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista -
UNESP - Campus de Botucatu para
obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária área de Saúde
Animal, Saúde Pública Veterinária e
Segurança Alimentar.**

BOTUCATU – SP

2007

**ANÁLISE DO RISCO DA OCORRÊNCIA DA SINDROME REPRODUTIVA E
RESPIRATÓRIA DOS SUÍNOS (PRRS) EM GRANJAS DE SUÍNOS
TECNIFICADAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. ESTUDO DO PERFIL
DESCRITIVO DA SITUAÇÃO ATUAL**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista -
UNESP - Campus de Botucatu para
obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária área de Saúde
Animal, Saúde Pública Veterinária e
Segurança Alimentar.**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Souza

BOTUCATU – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO
E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU -
UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Borges, Silvio R. Thimoteo

Análise do risco da ocorrência da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos(PRRS)em granjas de suínos tecnificadas do Estado de São Paulo .Estudo do perfil descritivo da situação atual / Silvio R. Thimoteo Borges. – Botucatu [s.n.],2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007

Orientador: Luiz Carlos de Souza

Assunto CAPES: 50502050

1.Suíno - Doenças - Epidemiológica 2.Vigilância epidemiológica 3.Saúde animal

CDD 636.0894

Palavras-chave: Risco, Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos; Suínos

A Deus, muitas graças dou, pela constante presença na minha vida, meu trabalho e agradeço por ter me dado perseverança para chegar até aqui.

*A Minha Família: Graça, Tiago e Gabriela
pela continuidade do incentivo e apoio ao meu trabalho universitário.*

A Minha mãe com grande carinho.

Aos amigos que continuamente me animaram ao continuísmo do desenvolvimento do trabalho que hoje concluo.

A homenagem aqui registrada é dirigida ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos de Souza, a minha sincera gratidão por todos os ensinamentos, sua colaboração na minha vida profissional .Professor,tenho hoje a grata satisfação de dizer:Deus lhe pague por tudo que fez por mim.

A Prof. Dra. Masaio Mizuno Ishizuka, que pacientemente ,através da sua inestimável ajuda nas pesquisas necessárias e com constante determinação e grande talento; deu mais uma vez o seu precioso auxilio nesse trabalho.Agradeço muito.

Aos colegas de trabalho e amigos da Coordenadoria de Defesa Agropecuária.

Aos dirigentes e técnicos dos laboratórios CEPPA-Campinas,EMBRAPA-SC,CEDISA-SC, que colaboraram através da realização dos exames laboratoriais no experimento desse trabalho.

Aos proprietários rurais, que nos cederam a maior preciosidade desse trabalho: os animais.

Aos animais (suínos) que, através de sua involuntária e valiosa colaboração cederam o material necessário á essa pesquisa, visando á saúde do rebanho de suínos do Estado de São Paulo.

Ao professor Dr.Carlos Padovani, pela orientação na parte estatística desse trabalho.

Ao .professor Dr. José Rafel Modolo pelos ensinamentos e co- orientação na estruturação do trabalho e principalmente pelo entusiasmo com a pesquisa desenvolvida nesse trabalho.

A bibliotecária Luciana, pela colaboração na revisão e correções nas referências bibliográficas do trabalho

A professora Emilia pela revisão gramatical

Aos professores da UNESP de Botucatu,que lecionaram as diversas disciplinas do curso de doutorado

A Dra. Vera Figueiredo do MAPA pela colaboração nos trabalhos de campo e colheita de amostras

A Dra. Márcia Catroxo do Instituto Biológico, pela colaboração nos exames de microscopia eletrônica, realizada nas amostras de sêmen dos suínos e ensinamentos a respeito de Microscopia Eletrônica.

Aos professores e pesquisadores ,que compuseram a banca na defesa da tese: Dra. Masaio Mizuno,Dra. Maristela Pituco,Dr. Germano Biondi,Dr.Simone Chiaccio ,Dr. Luiz Carlos de Souza ,muito obrigado pelas correções e ensinamentos

Aos colegas e amigos da Casa da Agricultura de Itu-SP

A todos aqueles que não foram mencionados, mas colaboraram de forma direta ou indireta para que esse trabalho fosse possível.

Todas as religiões, artes e ciências são ramos da mesma árvore. Todas estas aspirações são direcionadas para enobrecer a vida do homem, elevando-o da esfera da mera existência física e conduzindo - o em direção à plena liberdade.

Albert Einstein (1879-1955)

Borges, S.R.T. - Análise do risco da ocorrência da Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos (PRRS) em granjas de suínos tecnificadas do Estado de São Paulo. Estudo do Perfil descritivo da situação atual. Botucatu 2007, 92 p. Tese em Medicina Veterinária - Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi analisar o risco da possível ocorrência de PRRS, nos rebanhos de granjas tecnificadas de suínos, incluindo centrais de inseminação artificial de suínos do Estado de São Paulo nos anos 2005 à 2006, foi estudado a totalidade de 07 (sete) granjas de suínos, as quais importaram reprodutores (machos e/ou fêmeas) neste período ou que possuíam em seus plantéis reprodutores descendentes de importados de países endêmicos para PRRS. A avaliação consistiu na detecção da possível presença de anticorpos para o vírus da PRRS através de prova sorológica de ELISA, exame de PCR para confirmar ou não os soropositivos, pesquisa da presença do vírus da PRRS pela análise por microscopia eletrônica do sêmen dos machos reprodutores destas mesmas granjas. Foram realizadas 434 provas sorológicas por meio do teste de ELISA indireto para PRRS em 228 animais, PCR das amostras positivas no ELISA INDIRETO e paralelamente Microscopia eletrônica (Contrastação Negativa) em amostras de sêmen de 53 suínos reprodutores machos. Relativamente aos resultados de provas e testes de diagnóstico, apenas 1 granja apresentou testes positivos para PRRS no ELISA indireto, sendo que os animais positivos foram sacrificados e amostras de seus tecidos foram submetidos ao teste do PCR vindo a ser negativos. Quanto as amostras de sêmen todas as 53 amostras resultaram como negativas para a PRRS. O resultado do teste sorológico em suínos reprodutores, machos e fêmeas, quando da aplicação da prova de ELISA-PRRS revelaram freqüência de ocorrência da PRRS igual a 0,0%. Os resultados da prova de PCR em amostras de tecidos de suínos que se revelaram positivos ao teste de ELISA, foram negativos indicando ausência de vírus em animais soropositivos, os resultados de microscopia eletrônica de sêmen de reprodutores importados ou seus descendentes, oriundos de países endêmicos para PRRS, foram negativos. Os resultados indicam a ausência de

circulação viral nas granjas estudadas .A técnica de microscopia eletrônica usada neste trabalho pode se tornar um instrumento valioso para o monitoramento do rebanho de suínos reprodutores importados ou material biológico importado(sêmen) para a detecção precoce da PRRS. A Vigilância Epidemiológica da VIGIAGRO somada a sorologia e microscopia eletrônica mostrou-se suficiente para prevenir o risco da ocorrência da PRRS no Estado de São Paulo.

Palavras-chave: risco, síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos; suínos.

Borges, S.R.T. – Analyze the risk of the possible occurrence of porcine respiratory and reproductive disease – PRRS - in the animals of most technical farms of swine certificated swine breeders farms of Sao Paulo state- Descriptive profile of the current situation. Botucatu, 2007, 92p. Thesis for doctor degree in Veterinary Medicine, Animal health area, Public health veterinary medicine and Alimentary securit. Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny. Campus of Botucatu. Paulista State University.

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyze the risk of the possible occurrence of porcine respiratory and reproductive disease – PRRS - in the animals of most technical farms of swine, including central offices for artificial insemination of swines in the State of São Paulo from 2005 to 2006, the total of 07 (seven) swine farms were studied which had imported reproducers (male and/or female) in this period or that had descending reproducers of imported breeding from countries where PRRS was endemic. The evaluation consisted of the detection of possible presence of antibodies for the PRRS virus through ELISA serologic test, PCR examination to confirm or to deny the positives, searches of PRRS virus presence using electronic microscopy analysis of semen from the reproductive males from these same farms. 434 indirect ELISA serological tests for PRRS were done in 228 animals, PCR for Positive samples in INDIRECT ELISA and parallel electronic Microscopy (Negative Contrasting) in semen samples of 53 male reproductive swines. Relatively to the proof and diagnosis test result, only 1 farm showed positive tests for PRRS in indirect ELISA, being the positive animals had been put down and samples of their tissues were submitted to PCR test showing a negative result. Related to the semen samples all the 53 samples resulted as negative for the PRRS the result of the serologic test in reproductive, male and female swines, application of the ELISA-PRRS test were applied they showed occurrence frequency PRRS equals to 0.0%. The results of PCR test in swine tissue samples, which had been positive to the ELISA test had been negative indicating absence of virus in serum positive animals. The results for electronic semen microscopy in imported reproducers or their descendants from endemic countries for PRSS had been negative. The results indicate the absence of viral circulation in the studied farms. The electronic microscopy technique used in this

work can become valuable for monitoring imported reproductive swine or imported biological material (semen) for early detection of the PRRS. The Epidemiologic Surveillance of VIGIAGRO along with the serologic and electronic microscopy showed to be enough to prevent the risk of the PRRS occurrence in the State of São Paulo.

Key-words: risk, porcine respiratory and reproductive disease; swines

Abreviaturas e Siglas

MAPA = Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

SDA = Serviço de Defesa Agropecuária

OIE = Escritório Internacional de Epizootias

CDA = Coordenadoria de Defesa Agropecuária

CCPS= Centro de Coleta e Processamento de Sêmen

SAA = Secretaria da Agricultura e Abastecimento

GRSC = Granja de Reprodutores Suídeos Certificada

PCR = Reação em Cadeia de Polimerase

ELISA = Enzime Linked Imuno Sorbent Assay

PRRS = Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos

PRRSV = Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos

IN = Instrução Normativa

RPM = rotações por minuto

SP = São Paulo

CIA = Central de Inseminação Artificial

CIAs = Centrais de Inseminação Artificial

MA = Macrófagos alveolares

ME= Microscopia Eletrônica

VIGIAGRO= Serviço de Gestão da Vigilância Agropecuária. - Trânsito Internacional de Animais e de Produtos Agropecuários

LISTA DE FIGURAS

Figura	Esquema da estrutura do Vírus da	
1 -	PRRS.....	22
Figura	Animais refugos são comuns numa granja com	
2 -	PRRS.....	32
Figura	Animais com sinais clínicos de	
3 -	PRRS.....	33
Figura	Amostras de sangue de suínos colhidas em tubos de vidro de	
4 -	9ml.....	54
	Suínos de uma Central de Inseminação Artificial de Suínos,	
Figura	cl clinicamente	
5 -	normais.....	57
	
Figura	Colheita de amostras de tecido de suínos para exame de	
6 -	PCR.....	58
Figura	Microscópio eletrônico Philips EM-	
7 -	208.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	As quatro etapas da análise de riscos ,adaptado de	
-	OIE,Código sanitário para los animales terrestres, 2006, São Paulo,2007.....	45
Quadro 2	Seqüência de primers descritos para detecção de vírus da	
-	PRRS adaptado de Gilbert et al. 1997,São Paulo 2007.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Freqüências segundo a variável e ano. São Paulo, 2007.....	56
Tabela 2 -	Nº de amostras de soro e de sêmen segundo a granja ou	

Central de inseminação. São Paulo, 2007.....	56
Tabela 3 - Resultados de sorologia para PRRS em reprodutoras suínas importadas e filhos ou descendentes de importados segundo a granja e número de animais examinados. São Paulo, 2007.....	65
Tabela 4 - Resultados de freqüências corrigidas (THRUSFIELD, 1986) de positivos à sorologia para a sensibilidade (98%) e especificidade (96%) do teste de ELISA para granja G3 e número de animais examinados. São Paulo, 2007.....	65
.....	
Tabela 5 - Resultados de microscopia eletrônica (contrastação negativa) para o vírus da PRRS em sêmen de suínos doadores descendentes de animais importados, segundo a granja e número de amostras examinadas. São Paulo, 2007.....	66
.....	

ANEXOS

ANEXO 1 Instrução Normativa Nº 31, de 10 de maio de 2002, do - MAPA.....	85
ANEXO 2 Instrução Normativa Nº 54, de 17 de junho de 2002 do - MAPA	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 Histórico.....	21
3.2 Etiologia.....	22
3.3 Diagnóstico.....	23
3.4 Epidemiologia	26
3.5 Achados clínicos.....	29
3.5.1 Detecção de sinais clínicos	33
3.6 Lesões e achados de necropsia	34
3.7 Prevenção tratamento e controle.....	34
3.8 Estabilidade do vírus no ambiente.....	37
3.9 Desinfecção.....	38
3.10 Programas de controle e erradicação da PRRS em alguns países.....	39
3.11 O Brasil está livre da PRRS?.....	40
3.12 Legislação pertinente ao assunto(PRRS).....	43
3.13 Análise de risco. e análise do risco de ocorrência de uma doença..	44
3.14 Riscos de ocorrência de PRRS no Brasil.....	46
3.14.1 Através do sêmen.....	46
3.14.2 Através da carne.....	47
3.14.3 Através de suínos importados.....	48
3.14.4 Através de hospedeiros alternativos.....	48
3.14.5 A fonte de infecção mais provável de PRRS.....	49
3.15 Prevenção para evitar a PRRS no Brasil.....	49
3.15.1 Como o Brasil deve se prevenir da introdução da doença ?.....	49
3.15.2 Vigilância epidemiológica.....	49

4 MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Material	51
4.1.1 Granjas	51
4.1.1.1 Granjas amostradas.....	51
4.1.1.2 Tipos de Granjas - CIAs amostradas quanto ao sêmen.....	52
4.1.2 Animais.....	52
4.1.2.1 Amostragem dos animais.....	52
4.1.2.2 Amostragem de reprodutores.....	53
4.1.3 AMOSTRAS de SANGUE.....	53
4.1.4 AMOSTRAS de SÊMEN.....	54
4.1.5 Amostras de tecidos.....	57
4.2 Métodos	-58
4.2.1 SOROLOGIA.....	58
4.2.1.1 ELISA (Enzime-Linked Immunosorbant Assay) INDIRETO	58
4.2.2 PCR das amostras positivas no ELISA indireto	59
4.2.3 Análise do sêmen por microscopia eletrônica de transmissão.....	61
4.2.3.1 Técnica de contrastação negativa.....	61
4.2.4 Diagnóstico epidemiológico.....	62
4.2.5 Análise estatística	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 Resultados	64
5.1.1 Resultado de sorologia.....	64
5.1.2 Resultado da Prova de PCR.....	67
5.1.1 Resultados de exames de sêmen.....	67
5.2 Discussão	69
6 CONCLUSÕES	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8 ANEXOS	88
9. TRABALHO a ser publicado na revista	96

1. INTRODUÇÃO

Entre as inúmeras doenças que acometem os suínos, a PRRS (Síndrome Respiratória Reprodutiva dos Suínos) é indubitavelmente uma das mais temidas pelos criadores de suínos em face do comprometimento da produtividade, causando elevados prejuízos econômicos à atividade suinícola de um estado ou país (HILL&PLATT,1992). É uma doença caracterizada por alterações respiratórias (pneumonia) e reprodutivas em fêmeas reprodutoras (abortamento, repetição de cio, nascimento de fetos mumificados, natimortos, nascimento de leitões debilitados e com problemas respiratórios) causando alta mortalidade em leitões (WENSVOORT et al ,1991). O Agente etiológico é um vírus RNA, pertencente à família Arteriviridae e ao gênero Arterivirus (BEER,1999). A doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos em 1987 e posteriormente no Canadá e Europa em 1990 (CHRISTIANSON et al,1992).

O vírus foi isolado primeiramente na Holanda, por WENSVOORT et al (1991) e subsequentemente identificado em vários países produtores de suínos em todo mundo, nos quais ainda é considerado endêmico (BEER, 1999). Frequentemente, o vírus é introduzido em uma criação através de suínos infectados em decorrência da movimentação comercial desses animais entre as granjas e, na granja, dissemina-se por contágio direto. Se aceita que a transmissão através de aerossóis, seja importante ,mas pesquisa recente sugere que isto pode acontecer, mas que esta via de transmissão não seja a mais importante (DEE et al,2003) No Brasil, a PRRS não foi relatada ou descrita clinicamente ,a despeito dos animais geneticamente melhorados terem sido oriundos da maioria dos países europeus

onde a PRRS é endêmica, com prevalência estimada da ordem de 50% em rebanhos suínos (OSORIO,2002).

Dados sobre o plantel brasileiro de suínos constam de pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e os números revelam que a criação de suínos apresentou um crescimento de 3% em 2005, comparativamente a 2004 e assim, o plantel nacional de suínos do Brasil chegou a 34 milhões de exemplares (PORKWORLD,2006). Para fins de aperfeiçoamento genético dos plantéis, suinocultores brasileiros têm realizado importações de animais e/ou sêmen de suínos oriundos de países de intensa tecnologia genética, como aqueles da América do Norte e da Europa. Esse procedimento comercial pode acarretar problemas graves para a sanidade dos plantéis de suínos do Brasil que são indenes para PRRS (ZIMMERMAN,2006b). A qualidade do sêmen de suínos, pode ser comprometida por contaminação microbiana e viral. Os vírus estão entre os principais agentes causadores de doenças da reprodução em suínos (GLOSSOP, 1998), pois, o sêmen de suínos pode carrear inúmeros vírus, causadores de doenças, como a Febre Aftosa, Doença Vesicular Suína, Síndrome Reprodutiva e Respiratória do Suíno (PRRS), Parvovirose Suína, Doença de Aujeszky, Peste Suína Africana, Peste Suína Clássica, Encefalite Japonesa B, Influenza suína, Gastroenterite Transmissível dos Suínos, Adenovirose, Circovirose e Paramixovirose (SCHEID,2005; WEITZE,1996).

Clinicamente, a PRRS inicia com manifestação de inapetência que progride com comprometimento respiratório em suínos de todas as idades e nas fêmeas acomete também o aparelho reprodutivo com redução da taxa de concepção, aumento na taxa de abortamento, natimortalidade, com o nascimento de leitões debilitados e alta mortalidade em recém-nascidos e desmamados (DONE et al,1996).

Um dos mais importantes aspectos em surtos de PRRS é a variabilidade de sinais clínicos e a freqüência de infecções subclínicas dificultando o diagnóstico da doença devido à ocorrência de estirpes de baixa patogenicidade (DONE et al ,1996). Algumas células como a MARC-145 (macrófagos alveolares de suínos) são susceptíveis a determinados isolados de PRRSV (GOYAL, 1993). Vários isolados já foram identificados nos Estados Unidos e Europa que apresentam

diversidade de patogenicidade comprometendo sobremaneira o diagnóstico da doença (MEULENBERG et al, 1993).

O prejuízo econômico da PRRS é decorrente da elevada mortalidade, baixo desempenho reprodutivo, agravamento da manifestação clínica de outras doenças intercorrentes, elevados gastos financeiros com vacinas, medicamentos diagnósticos laboratoriais e monitorias sorológicas. As perdas financeiras têm sido estimadas entre US\$ 250 a 300 por fêmea do plantel reprodutor (CIACCI-ZANELLA et al, 2004). Estratégias para reduzir as perdas decorrentes da doença têm sido baseadas em boas práticas de manejo e correta vacinação, empregando-se vacinas de vírus vivo modificado, porém, ainda não se dispõem de métodos de diagnóstico capazes de diferenciar anticorpos vacinais dos não-vacinais (SORENSEN et al, 1998).

De acordo com MENGELING et al (1996), estudos sorológicos sugerem que a prevalência da infecção é muito superior à frequência de casos clínicos.

2. OBJETIVOS

Objetivou-se no presente trabalho analisar o risco da ocorrência da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos em granjas de suínos tecnificadas e centrais de inseminação de suínos no Estado de São Paulo que importaram reprodutores (machos e fêmeas) nos anos de 2005 e 2006 e em granjas que possuíam em seus plantéis animais descendentes de importados. A avaliação de risco foi feita pelo diagnóstico de possível presença de PRRS, pela determinação da presença de anticorpos para o vírus da PRRS, na qual utilizou-se a prova sorológica de ELISA e pesquisa da presença do vírus da PRRS pela análise por microscopia eletrônica do sêmen (dos machos). reprodutores de centrais de inseminação artificial de granjas tecnificadas e de 3 centrais de inseminação artificial suína certificada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)

Enfatizou-se e priorizou-se sempre, as colheitas nas granjas que haviam realizado importações nos últimos dois anos e também naquelas que tinham animais em seus plantéis e reprodutores descendentes de animais importados de países endêmicos para PRRS .

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Histórico

Países que adotaram rotineiramente a sorologia para PRRS para fins de levantamento sorológico de seus plantéis, passaram a enfrentar reduções substanciais na comercialização de sêmen e de reprodutores. Em 1992 a PRRS foi incluída na então Lista B do Escritório Internacional de Epizootias ou OIE (International Office of Epizootics) , implicando na notificação, por parte dos países membros, de sua ocorrência e também estabeleceu os métodos para seu controle (DEWEY,1997).

Países da América do Sul como Colômbia, Venezuela e recentemente o Chile detectaram não apenas a presença de anticorpos contra o vírus da PRRS em seus plantéis suínos como também enfrentaram surtos de doença (DEWEY,1997, NARANJO,2001a) e a introdução do vírus deveu-se à importação de suínos infectados no final da década de 80 e início da década de 90. Estudos realizados no Chile baseados na identificação do RNA viral pela prova de RT-PCR e sequenciamento do genoma viral revelaram significativa homologia genética com as estirpes norte-americanas (NARANJO, 2001a, NARANJO, 2001b).

No Brasil, estudo de soroprevalência realizado por empresas integradoras e importadoras de material genético realizado no período entre 1996 e 1997 revelou-se negativo (DEWEY,1997).

3.2. Etiologia

O vírus da PRRS pertence à família *Arteriviridae* em face da organização de seu genoma, estratégia de replicação, composição proteica e à seqüência de nucleotídeos (MEULENBERG et al,1993) juntamente com a família *Coronaviridae* constituem a ordem *Nidovirales* (ELVANDER, et al 1997). É um vírus pequeno, envelopado, com um diâmetro de 50 a 65 nm, de superfície relativamente lisa, possui a parte central do núcleo (capsídeo) em forma de cubo com diâmetro de 25 a 35 nm (CANON et al, 1998) e com espiral positiva para RNA (15 Kb, contendo 7 ORFs ou fases abertas de leitura). A ORF 7 codifica uma proteína de nucleocapsídeo (N) que propicia uma forte resposta imune nos diferentes isolados de PRRSV (MEULENBERG et al,1993) e em macrófagos alveolares de pulmões de suínos (BENFIELD et al, 2000b)

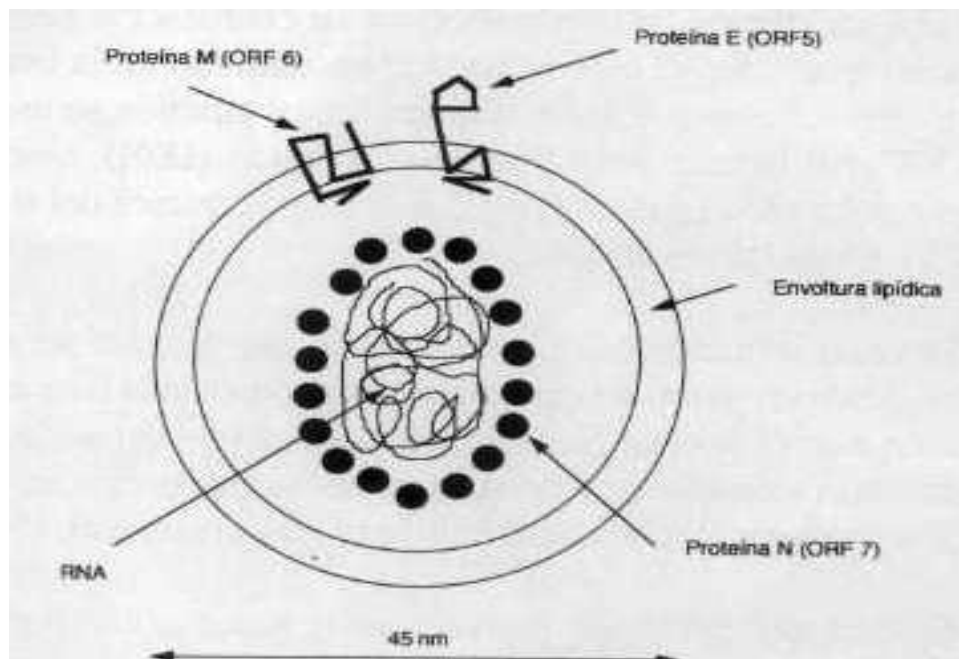


Figura 1 - Esquema da estrutura do Vírus da PRRS

O vírus replica-se também em células germinativas testiculares (espermatídes, espermatócitos, células gigantes multinucleares) de suínos (WILLISA et al, 2000 e BENFIELD et al, 2000a). *In vitro*, o PRRSV replica-se em culturas primárias de macrófagos alveolares de origem suína (CANON et al, 1998).

As linhagens ou isolados do vírus são excepcionalmente variáveis no que respeita à patogenicidade avaliada pela frequência da manifestação clínica da doença e à virulência para o sistema respiratório e/ou reprodutivo; (ALLENDE et al, 2000); diferenças antigênicas são avaliadas pela reatividade frente aos anticorpos policlonais e monoclonais; e quanto ao sequenciamento de RNA (BLOEMRAAD et al, 1994). Existem amostras variantes do PRRSV que podem ser apatogênicas ou de baixa patogenicidade. Alguns isolados de PRRSV exibem preferência para crescimento em células susceptíveis ao vírus como macrófagos alveolares de pulmão suíno (MA) ou MARC-145 (GOYAL, 1993).

O vírus é inativado pelo éter ou clorofórmio, no entanto é instável ao congelamento retendo a sua infectividade por apenas 4 meses a -70° C e é reduzida a temperaturas altas em aproximadamente 15 a 20 minutos a 56° C (DEE et al,2002).

3.3. Diagnóstico

Os procedimentos diagnósticos usuais são o clínico, anátomo-patológico, epidemiológico, laboratorial direto (isolamento viral) e indireto (sorologia).

É preciso considerar que a PRRS pode ser clinicamente confundida com outras doenças virais da esfera respiratória e reprodutiva, como a doença de Aujeszky, influenza suína e parvovirose comprometendo sobremaneira seu diagnóstico e profilaxia (DONE et al,1996). Thrusfield (1986) cita que o diagnóstico clínico não tem sido mais suficiente em decorrência da existência de agentes etiológicos que apresentam baixa patogenicidade exigindo dos epidemiologistas recorrerem ao apoio laboratorial já que a sorologia e o diagnóstico clínico associado ao laboratorial não são suficientes para o diagnóstico epidemiológico de doenças em população ou rebanho de animais. Assim, considera os seguintes aspectos do diagnóstico laboratorial com finalidade epidemiológica:

- a. Ao selecionar uma prova sorológica, há que se conhecer, *a priori*, a sensibilidade e a especificidade e conseqüentemente deduzir a respeito do valor preditivo de um resultado positivo (VPRP) e do valor preditivo de um resultado negativo (VPRN). São importantes por permitirem avaliar, respectivamente, a probabilidade de um animal com resultado positivo ser realmente doente ou
-

infectado e de um animal com resultado negativo ser realmente não doente ou não infectado

- b. Usualmente, é difícil dispor-se de um método que apresente, simultaneamente, alta sensibilidade e especificidade, que são características inerentes a cada prova laboratorial.
- c. Quando se seleciona uma prova sorológica, há que se decidir, *a priori*, o objetivo do trabalho ou pesquisa. Provas de alta sensibilidade são preferenciais para fins de triagem, pois permitem a aplicação em grande número de amostras e os casos positivos podem ser encaminhados para provas de alta especificidade, além de deixar de fora pequeno número de casos positivos que são classificados como falsos negativos.
- d. Em Medicina Veterinária, notadamente em Saúde Animal (Defesa Sanitária Animal), quando se trabalha com rebanhos ou população de animais, recomenda selecionar provas que apresentem alta sensibilidade por serem mais práticas e menos onerosas, mas, cientes de que a especificidade é previsivelmente menor.
- e. Os resultados positivos obtidos pela aplicação de provas de alta sensibilidade são a soma de resultados verdadeiros positivos (VP) e falsos positivos (FP).
- f. Em casos de doenças exóticas, é recomendado também recorrer à provas de alta sensibilidade. Provas de alta especificidade são mais demoradas para execução, mais onerosas e são poucos os laboratórios habilitados ou interessados em trabalhar com elas e às vezes podemos nos deparar com situações em que doenças inexistem e parece ser o caso da PRRS no Brasil.
- g. O dilema com que um Serviço de Veterinária se depara ao aplicar uma prova de alta sensibilidade para monitorar pequenos rebanhos (granjas) a fim de certificar-se de que certa doença (exótica no país) está realmente ausente, no resultado obtém-se alguns resultados positivos: como interpretar esses resultados soropositivos, são verdadeiros ou falsos positivos?

O valor de prevalência pode ser corrigido para a sensibilidade e especificidade da prova utilizada, (FERRIN et al, 2004 e DEA et al, 2000).

Os procedimentos laboratoriais disponíveis são: os métodos direto e indireto, dentre os métodos diretos têm-se o isolamento viral, prova viável desde que o laboratório receba a amostra em menos de 12-24h e usualmente é recomendada a remessa de plasma, soro, macrófagos alveolares, líquidos torácicos e de ascite de

animais suspeitos. No soro, o vírus pode ser detectado até algumas semanas pós-manifestação da doença ou em animais portadores convalescentes. Outros materiais indicados para diagnóstico virológico são fragmentos de órgãos (amígdalas, pulmões e linfonodos), fetos natimortos ou leitões recém-nascidos, preferencialmente aqueles que se encontram em bom estado de conservação e/ou que não tenham vindo a óbito há muito tempo. Recomenda-se enviar várias amostras de vários animais ao laboratório (SOBESTIANSKY, 1999). Suspensões de líquidos e tecidos corporais de animais suspeitos podem ser inoculadas em cultivos apropriados (macrófagos alveolares de suínos). O teste de PCR é também indicado para pesquisa do genoma viral.

Um valioso recurso diagnóstico é o método indireto para detecção de anticorpos específicos sendo os mais utilizados os testes de ELISA, imunoperoxidase, imunofluorescência indireta ou testes de soro neutralização (SOBESTIANSKY et al, 1999).

No Brasil é empregado o teste de ELISA com kit importado da empresa IDEXX ® (EUA). É uma prova que apresenta vantagens como as elevadas praticidade e sensibilidade detecta anticorpos IgG para as estirpes norte-americanas e européias, porém, apresenta algumas desvantagens como o alto custo e baixa especificidade redundando em alguns resultados falso-positivos requerendo procedimentos adicionais para fins de confirmação. Embora seja prova utilizada nacionalmente e em vários laboratórios de diagnóstico, a sua validade tem sido questionada por exigir confirmação por procedimentos de diagnóstico adicional de maior especificidade como o isolamento viral, a prova de imunofluorescência direta ou a RT-PCR. Esta última prova apresenta elevadíssima sensibilidade, especificidade e rapidez na execução. Na rotina é importante dispor-se de um método de diagnóstico que apresente altas sensibilidade e especificidade e que seja rápido, pois, frequentemente os animais são portadores exigindo pronto atendimento profilático para minimizar as oportunidades de disseminação viral (SAYD, 2006).

Um dos mais importantes aspectos dos surtos de PRRS é a variabilidade de sinais clínicos e a frequência de infecções subclínicas dificultando o diagnóstico clínico da doença (BENFIELD et al., 2000, b) Além disso, existem amostras variantes do PRRSV como as apatogênicas ou de baixa patogenicidade.

Alguns isolados de PRRSV exibem preferência para crescimento em células susceptíveis ao vírus como macrófagos alveolares de pulmão suíno (MA) ou MARC-145 (BENFIELD et al,1994).

Vários isolados identificados nos Estados Unidos (> 20) e Europa (>10) possuem diversidade antigênica, complicando assim o diagnóstico da doença. (CHANG et al, 2002).

3.4. Epidemiologia

As fontes de infecção são representadas principalmente por portadores e doentes atípicos. As vias de eliminação do vírus são as secreções oronasais e sêmen. As vias de transmissão são o contágio direto via coito, o contágio indireto através aerossóis, transplacentária e através inseminação artificial. As portas de entrada são representadas pelas mucosas respiratória e genital (DONE et al,1996;SWENSON et al,1994). A presença do PRRSV no sêmen suíno pode ser uma via de transmissão para a introdução do agente no plantel suíno indene, acarretando problemas para os países livres de PRRSV, mas que importam sêmen congelado de países onde o agente é endêmico. (SARUBBI, 2006) A qualidade do sêmen de suínos, pode ser comprometida por contaminação microbiana e viral. Os vírus estão entre os principais agentes causadores de doenças da reprodução em suínos (DEE et al , 2003).

O sêmen suíno pode conter inúmeros vírus, causadores de doenças, como a Febre Aftosa, Doença Vesicular Suína, Síndrome Reprodutiva e Respiratória do Suíno (PRRS), Parvovirose Suína, Doença de Aujeszky, Peste Suína Africana, Peste Suína Clássica, Encefalite Japonesa B, Influenza suína, Gastroenterite Transmissível dos Suínos, Adenovirose, Circovirose e Paramixovirose (MENGELING et al, 1994)

De acordo com CIACCI-ZANELLA et al (2004), o vírus da PRRS apresenta elevada infectividade, de sorte que um suíno se infecta por exposição a algumas partículas virais (10 ou menos), porém, não é muito contagioso, pois não é facilmente transmitido de um suíno infectado para outro suíno.

A transmissão vertical pode ser compreendida da seguinte maneira: o PRRSV é transmitido de reprodutoras fontes de infecção na fase de viremia para os

fetos, por via transplacentária, resultando em morte fetal ou no nascimento de leitões infectados, os quais são debilitados ou aparentemente normais e alguns animais, em leitegadas afetadas, podem não ser infectados pelo PRRSV (BOTNER et al,1994;CHRISTIANSON et al,1992;TERPSTRA et al,1991). O PRRSV pode replicar-se em fetos com 14 dias de idade gestacional ou mais velhos, mas a infecção de fetos durante os primeiros dois terços da gestação é pouco comum porque muitas estirpes do PRRSV atravessam a placenta de modo eficiente apenas no último terço da prenhez. (CHRISTIANSON et al ,1993; LAGER & MENGELING,1995; MENGELING et al,1994; PRIETO et al 1996). A razão para a diferença na eficiência da transmissão do vírus através do seu percurso pela placenta materna em diferentes estágios de gestação e respectivos mecanismos é desconhecida. Esta patogenia independe da virulência da estirpe viral para o aparelho reprodutor. PARK, et al.1996 demonstraram que as estirpes (do PRRSV) de baixa e alta virulência para os fetos, atravessam a placenta com igual eficiência quando as reprodutoras suínas são inoculadas aos 90 dias de gestação.

A transmissão do PRRSV ocorre pelo contato direto ou indireto com secreções e excreções de animais infectados, os quais podem eliminar o vírus até 8 semanas pós-infecção (SOBESTIANSKY et al, 1999). De acordo com ALBINA (1997), o contato relativamente próximo entre suínos é o primeiro fator importante para a transmissão da doença .A transmissão pode, provavelmente, ocorrer por via oral-fecal, visto que o PRRSV já foi isolado em fezes, urina e saliva (SOBESTIANSKY et al, 1999).

LE POTIER (1997), citado por ALBINA (1997), observou que algumas fazendas (45%) localizadas a 500m de raio ao redor de epidemias de PRRS tornaram-se infectados. Apenas 2% foram contaminados na zona de 1 a 2 km da epidemia.

É possível que outros vertebrados participem da transmissão como carreadores (SOBESTIANSKY et al, 1999). A infecção experimental de pássaros resultou em processo subclínico e das suas fezes o vírus foi isolado por até 24 dias. O papel dos pássaros e disseminação do PRRSV requer investigações mais consistentes (CIACCI-ZANELLA et al, 2004).Não foram encontradas outras espécies susceptíveis ao PRRSV. Roedores são geralmente associados à enfermidades nas granjas, porém, não foram infectados experimentalmente (ALBINA, 1997).

Considerando que a infecção natural de pássaros não foi comprovada, o suíno e o javali selvagem são os únicos animais conhecidos por adquirirem naturalmente a infecção com PRRSV. Contudo, não são descritas manifestações clínicas da infecção pela PRRS em javalis selvagens e não são substanciais as provas do seu papel como reservatórios do vírus para suínos domésticos (ALBINA, 1997).

Entretanto, ALBINA et al (2000) submeteram a exames sorológicos para PRRS javalis selvagens (*Sus scrofa*) na França e aproximadamente 4% foi positivo indicando que esses animais poderiam ser reservatórios para suínos domésticos.

Comprovadamente, a infecção ocorre por inalação, ingestão e coito (SOBESTIANSKY et al, 1999).

ALLENDE et al (2000) afirmam que o PRRSV pode permanecer no organismo de um suíno infectado por um longo período de tempo antes de iniciarem a infecção e que animais persistentemente infectados podem transmitir o vírus.. Os mecanismos de persistência no animal hospedeiro não são conhecidos. Poucos estudos neste sentido têm sido realizados “in vivo”.

Cachaços infectados podem eliminar o vírus pelo sêmen por toda a vida produtiva (CIACCI-ZANELLA et al, 2004).

Para ALBINA (1997) os maiores fatores de risco são: rebanhos de tamanho elevado, não realização de quarentena, reposição constante do plantel e alta densidade de animais.

MOUSING et al (1997), com o objetivo de investigarem os fatores de risco da doença, realizaram um estudo que indicou o aumento do risco de soropositividade para PRRS em rebanhos que utilizam a inseminação artificial com sêmen de animais soropositivos para a enfermidade. Também inferiram na pesquisa que o tamanho do rebanho não tem relação com o risco de soropositividade, e que a propagação por via aerógena do PRRSV não foi uma característica predominante na Dinamarca.

MORTENSEN et al (2002), detectaram como fatores de risco para rebanhos de matrizes na Dinamarca: a proximidade de rebanhos infectados com amostra americana, aquisição de animais portadores em incubação da estirpe americana, aumento do tamanho do rebanho e aquisição de sêmen de cachaços

infectados. Os autores sugeriram que a disseminação do vírus via aerossol é um freqüente mecanismo de transmissão.

GOLDBERG et al (2000), realizaram um experimento, em 52 granjas, objetivando associar genética, características da fazenda e a doença (clínica). Os resultados sugeriram que o manejo pode desencadear o aparecimento de doença como em caso de uma epidemia. Em geral, a manifestação da PRRS surge como resultado de uma combinação de fatores genéticos e características de manejo do rebanho.

Devido ao longo período de transmissibilidade, a movimentação de animais infectados foi muito importante nos surtos da doença na Europa, facilitando inclusive a introdução em outros países, através da importação de animais infectados (SOBESTIANSKY et al, 1999).

O PRRSV se localiza no sangue, ou seja, realiza viremia e é encontrado em órgãos bastante irrigados. Após a vacinação ou exposição à infecção natural, o vírus é atenuado num período de 7 a 14 dias.

O tecido muscular de suíno pode manter o PRRSV em níveis baixos quando algumas condições específicas são mantidas (4°C por 48 horas) (CIACCI-ZANELLA et al, 2004).

LAROCHELLE & MAGAR (1997) avaliaram a presença do PRRSV na carne suína. Não isolaram vírus nas diversas peças e sugerem que a transmissão pela ingestão de carne é improvável.

3.5. Achados clínicos

A freqüência de manifestação clínica (patogenicidade) da PRRS e a gravidade da manifestação clínica de um caso da doença (virulência) variam muito. Esta variação na gravidade depende de fatores como a amostra do PRRSV, a presença de outros agentes infecciosos, a idade dos suínos infectados, estágio reprodutivo, imunidade do rebanho, tamanho do rebanho e ambiência (CIACCI-ZANELLA et al, 2004). As diferenças clínicas e patológicas entre as estirpes norte americanas e européias são variadas. Em leitões, a estirpe européia e algumas norte-americanas do PRRSV podem induzir apenas febre suave e dificuldade respiratória enquanto que outras estirpes americanas podem causar doença respiratória severa

(PESCH et al, 2005). Após a replicação, instala-se viremia que pode se estender por até 8 semanas.

Os animais podem apresentar manifestações clínicas (doentes) ou subclínicas (portadores) e permanecer disseminando o vírus por longo período de tempo (SOBESTIANSKY et al, 1999). O PRRSV induz apoptose em culturas de células e tecidos de suínos infectados tendo sido a proteína GP5 relatada como a responsável por esse fenômeno (LEE et al, 2004). A doença pode se manifestar sob forma de surtos ou pode ser endêmica. Geralmente, a endemia se instala depois de uma severa epidemia (ALBINA, 1997). O período de incubação perdura de 10 a 37 dias (SOBESTIANSKY et al, 1999), a manifestação inicia-se com sinais pouco específicos como anorexia, hipertermia (40 a 43°C) ou hipotermia, letargia e apatia principalmente. Podem ainda ser observados sinais de coloração azulada nas orelhas, abdômen e vulva; sinais nervosos; edema subcutâneo de membros posteriores e lesões de pele (CIACCI-ZANELLA et al, 2004). (Figura 3)

Em leitões lactentes podem ocorrer diarreia e abortamento em fêmeas prenhes (SOBESTIANSKY, 1999), edema de pálpebras e conjuntivite (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 2003). Leitões recém-nascidos apresentam dificuldade respiratória como primeiro sintoma, caracterizada por movimentos do abdome e peito e respiração com a boca aberta. Seguem-se sinais nervosos, anorexia e outros sintomas como edema ao redor dos olhos, conjuntivite, coloração azulada das orelhas, hematomas na pele, diarreia, tremores, pêlos arrepiados (CIACCI-ZANELLA et al, 2004). Quando as fêmeas são infectadas durante ou depois da lactação, pode ocorrer aumento do intervalo desmame-estro. Além disso, a diminuição do consumo de alimento pode colaborar com o aumento neste intervalo. (PARK et al, 1996)

O efeito da infecção pelo PRRSV nos cachacos é muito variável, mas estudos mostram diminuição da qualidade do sêmen e da capacidade de cobertura. O vírus pode ser detectado no sêmen por até 92 dias pós-infecção, mas, se a qualidade do sêmen for adequada, não haverá comprometimento das taxas de concepção ou de fertilização. O impacto será conseqüente à infecção da fêmea que resultará em doença (CIACCI-ZANELLA et al, 2004). A anorexia e febre nas porcas em lactação levam à agalaxia que culmina com a morte dos leitões pela fome ou colibacilose. Assim sendo, a mortalidade pode chegar a 80% (BARCELLOS & SOBESTIANSKY, 2003). Em leitões desmamados, a doença revela maior impacto

nas 8 primeiras semanas de vida, principalmente quando outros agentes infecciosos estão presentes como o circovírus suíno tipo 2, o vírus da influenza suína, coronavírus respiratório suíno, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis* e *Bordetella Bronchiseptica*.

Além da redução nas taxas de crescimento e aumento na mortalidade, a infecção pelo PRRSV reduz a eficácia de medicamentos e das vacinações (CIACCI-ZANELLA et al, 2004). (Figura 2)



Figura 2 - Animais refugos são comuns numa granja com PRRS
(Foto cedida pelo governo do Canadá)

O PRRSV apresenta tropismo pelos macrófagos pulmonares e, assim, reduzindo a capacidade do animal em responder à infecções tornando-os susceptíveis à infecções secundárias, representando, com freqüência, um grande problema para a higiene dos animais. Muitos são os relatos de doenças que atuam sinergicamente e/ou como infecções secundárias dentre as quais o *Haemophilus parasuis*, *S. suis*, *S. choleraesuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, Influenza suína. Mortalidade perinatal, aumento na taxa de natimortos, abortamentos

além de doença respiratória com lesões nos lobos anteriores do pulmão e presença de hemorragia, são sugestivos de PRRS. Infecções leves ou assintomáticas podem ser observadas (SOBESTIANSKY et al, 1999). O PRRSV provoca uma infecção crônica e persistente nos suínos. O vírus replica-se em células susceptíveis de animais portadores, por vários meses. Esse é o único fato epidemiologicamente mais significativo da infecção pelo PRRSV. Infecções persistentes pelo PRRSV têm sido documentadas através de experimentos envolvendo a transmissão do agente e pela detecção do vírus em animais. (ZIMMERMAN et al, 1992)

Benfield et al. (2000b) isolaram o vírus de tonsilas e linfonodos, de suínos em até 132 dias pós-parto. Allende et al. (2000) detectaram a variedade infecciosa do PRRSV através de ensaios biológicos em 2 entre 5 suínos aos 150 dias após a infecção.

A permanência da infecção não é em função da idade do suíno, ocorrendo independentemente da exposição do suíno *in útero* (ROWLAND et al, 1999), como leitão, ou como adulto (BIERK et al, 2001; FAIRBANKS et al, 2002; ZIMMERMAN et al, 1992). O(s) mecanismo(s) pelo qual o vírus é capaz de se preservar frente à resposta imune (proteção ativa) ainda não foi identificado. CHANG et al (2002) encontraram níveis relativamente baixos de mutação em animais infectados persistentemente.



Figura 3 - Animais com sinais clínicos de PRRS (Foto cedida pelo governo do Canadá)

3.5.1 Detecção de sinais clínicos

Nenhum dos sinais clínicos atribuídos à PRRS é específico da doença causada pelo PRRSV, ou seja, a doença reprodutiva ou respiratória determinada pelo PRRSV pode ser semelhante as causadas por outros patógenos bacterianos e virais. Não há lesões patognomônicas (específicas) para o PRRSV e torna-se necessário dispor de testes diferenciais para um diagnóstico definitivo. O diagnóstico diferencial inclui doenças causadas pelo parvovírus suíno, vírus da doença de Aujeszky, vírus da encefalomielite hemaglutinante, circovírus suíno tipo 2, enterovírus suíno, vírus da influenza suína, vírus da peste suína clássica, citomegalovírus suíno e leptospirose (ALLAN & ELLIS, 2000; MENGELING et al,1993; PATON et al, 1992). Seria recomendável que a PRRS fosse incluído entre

os diferenciais quando se realiza o diagnóstico de doença reprodutiva ou respiratória (OIE, 2006b). No entanto, uma história clínica e patológica que sugira a presença do PRRSV ,deve ser confirmada pela detecção de antígenos virais, material genômico viral ou isolamento do vírus a partir de casos clínicos suspeitos (ALBINA, 1997).

3.6. Lesões e achados de necrópsia

Histologicamente pode ser detectada pneumonia intersticial com ausência de macrófagos. Antígenos virais podem ser encontrados em cortes de tecidos observados pela técnica de Imunofluorescência direta. Macroscopicamente, o cordão umbilical dos fetos natimortos pode apresentar manchas hemorrágicas e edemaciação com aumento de tamanho de até 3 vezes em relação ao normal. Em alguns fetos pode ser observado acúmulo de fluido de cor âmbar, distendendo as membranas dos rins, cólon e baço, e na cavidade torácica e abdominal. Pulmões não colabados, firmes e manchados em tons de cinza e marrom são observados e que tendem à coloração avermelhada em casos severos.

Os linfonodos aumentam de volume de 2 a 10 vezes, com coloração amarronzada e podem apresentar pequenos cistos com presença de fluidos sob a cápsula (CIACCI-ZANELLA et al, 2004).

3.7. Prevenção, Tratamento e Controle.

O objetivo dos programas de prevenção da PRRSV é o de impedir a introdução do vírus em rebanhos negativos ou de novas cepas em rebanhos já infectados com o PRRSV (DEE et al, 2002). Animais e sêmen têm sido considerados, respectivamente, as fontes de infecção e vias de transmissão primárias do PRRSV (LE POTIER et al 1997), mas a importância de outras fontes de infecção tem se tornado evidente (ALBINA et al, 2000)

TORREMORELL et al, 2004 relataram que mais de 80% de novas infecções ocorridas em rebanhos comerciais, nos EUA, não foram devidas a suínos ou sêmen, mas, devido à transmissão através de contato (local,) com as granjas vizinhas próximas; à movimentação de suínos através de meios de transporte contaminados

com o PRRSV; a falta de atenção aos protocolos de biossegurança ou a possível introdução por insetos.

Em áreas altamente infectadas, a possibilidade é baixa ou nula em eliminar o vírus de forma progressiva ou espontânea (ALBINA, 1997). A redução dos fatores que minimizam a presença do vírus em plantéis de suínos resulta em melhorias no crescimento de suínos e que pode ser quantitativamente mensurado pela avaliação da relação com o grau de eliminação ou minimização sistêmica do vírus (GREINER et al, 2000). Nos países onde a enfermidade é endêmica, medidas de controle incluem monitoramento constante do manejo e acompanhamento da disseminação do vírus no rebanho.

Como prevenção deve-se reduzir o estresse dos animais e intensificar as medidas de biossegurança pela adoção de medidas como: monitoração da temperatura e umidade ambiental; limitação da entrada de pessoas nas granjas e quando necessário, os visitantes devem utilizar vestimentas esterilizadas e vesti-las após banho completo; evitar a entrada de possíveis carreadores do vírus da PRRS, como pássaros; lavar e desinfetar os caminhões; praticar vazios; sacrificar os animais infectados e destruir suas carcaças; realizar sorologias dos animais de reposição de granjas de reprodução, especialmente daqueles provenientes de outros países. (TORREMORELL, 2004). De acordo com NIELSEN et al (1997) as centrais de inseminação artificial dinamarquesas abrigam muitos cachaços que possuem anticorpos contra o PRRSV. Cachaços jovens e recém-introduzidos tornam-se agudamente infectados.

O risco de transmissão do PRRSV via sêmen constitui um sério problema à suinocultura (ALBINA, 1997). Na Dinamarca se valeram de programas de vacinação para prevenir ou reduzir o problema (MOUSING et al ,1997).,No mercado internacional existem vacinas para o controle da doença que estabilizam a infecção(NIELSEN et al., 1997).

LABARQUE et al. (2000) comprovaram que a diversidade genética da amostra Européia do PRRSV pode afetar a eficácia da vacina utilizada na Europa. Para estes autores, ainda não é clara a razão pela qual as vacinas comumente utilizadas com a amostra européia, sejam eficazes contra amostras de campo geneticamente diferentes.

Experimentos recentes revelam significativa redução na quantidade de vírus encontrados em pulmões e no sangue de suínos vacinados com o vírus atenuado da amostra europeia (com vírus isolado do grupo ao qual pertence o PRRSV). Uma acentuada redução na viremia e quantidade de vírus eliminadas via sêmen, foi demonstrada com o uso de vacina viva quando comparado com animais não vacinados. Por outro lado, não houve alteração no nível e na duração da viremia e quantidade de vírus no sêmen quando utilizada vacina inativada (NIELSEN et al., 1997).

Deve-se tomar cuidados com o efeito da vacina em situações endêmicas, pois, tratando-se de um RNA-vírus, há alta capacidade de mutação e conseqüente complexidade na biologia imunológica podendo, a vacinação, causar resultados inesperados (ALBINA, 1997).

CIACCI-ZANELLA et al (2004) fizeram considerações interessantes a respeito dos fundamentos que devem nortear o controle, prevenção ou erradicação da PRRS e representada pela compreensão dos recursos para a persistência e transmissão do vírus. Um fator importante é a persistência do vírus no sistema reprodutor masculino e sua conseqüente eliminação pelo sêmen, podendo infectar fêmeas e comprometer a reprodução. Em rebanhos grandes (acima de 100 porcas), podem coexistir subpopulações soronegativas e soropositivas, indicando que a transmissão do vírus é esporádica e inconsistente. Foi comprovado também que porcas positivas estão normalmente alojadas em grupos, ou seja, em condições que favorecem a transmissão em decorrência da proximidade.

Em rebanhos com infecção crônica é necessário controlar a infecção ou circulação do vírus no plantel de reprodutores. Em um primeiro passo é necessário manter a infecção estável, onde não ocorra transmissão de porca para porca e nem de porca para leitão. Quando leitões não-aclimatadas ou não-expostas ao PRRSV são introduzidas, o plantel se desestabiliza.

Recomenda-se evitar a introdução de novos animais por um período de 60 a 180 dias para que o rebanho adquira estabilidade frente à infecção. Durante este período, todos os animais negativos têm a oportunidade de se tornarem infectados, desenvolver imunidade e assim, reduzir a carga viral. A aclimação de leitões para serem introduzidas no plantel infectado por PRRSV é um método bastante empregado no controle da infecção.

O programa de controle é dividido em isolamento, aclimação e recuperação, sendo cada período de 30 a 60 dias. Durante o isolamento as leitoas são testadas sorologicamente para conhecimento do nível de anticorpos e seu grau de infecção. Caso a granja opte pela vacinação, esta deve ser realizada quando da chegada das leitoas na propriedade. Durante a aclimação, as leitoas tomam contato com as estirpes existentes na granja. Na recuperação, se reduz a possibilidade de introduzir fêmeas com infecção ativa no plantel reprodutor. O despovoamento parcial, vazio sanitário e o uso de vacinas contra PRRS também auxiliam na estabilização da infecção no rebanho. O despovoamento parcial e o vazio sanitário possibilitam a redução da transmissão horizontal e o impacto da infecção por outros agentes patogênicos oportunistas.

De acordo com SORENSEN et al (1998), as vacinas mais utilizadas são as vacinas vivas modificadas que reduzem a frequência de casos clínicos, mas, não eliminam as infecções. As vacinas podem ser utilizadas a partir de 3 semanas de idade e em fêmeas no período de 3 a 4 semanas antes da cobertura. Não é recomendada a vacinação de rebanhos negativos, fêmeas gestantes ou em cachos em idade reprodutiva em virtude de certos efeitos na performance reprodutiva. Os procedimentos dirigidos aos produtores que importam suínos, recomendam que animais importados devem permanecer em quarentena, e durante esse período, testados para presença de anticorpos para o vírus da PRRS. E ainda que, os suínos importados deverão ser oriundos de propriedades livres de PRRSV, testados para presença de anticorpos para PRRSV no país de origem e durante a quarentena no país importador(OIE,2006a).

3.8. Estabilidade do vírus no ambiente.

A eliminação do vírus na saliva, urina e fezes resulta na contaminação do ambiente, cria um potencial para transmissão via fômites. O PRRSV é frágil e rapidamente inativado pelo calor e pela falta de umidade. Entre 25 e 27°C, o vírus infectante não foi detectado em plástico, aço inoxidável, borracha, alfafa, maravalha de madeira, palha, milho, ração inicial para suínos ou tecido tipo "jeans" (PIRTLE & BERAN, 1996).

O PRRSV pode manter-se infectante por um período prolongado sob condições específicas de temperatura, umidade e pH. O PRRSV é estável por meses a anos em temperaturas entre -70°C e -20°C. Aproximadamente 90% da infectividade do PRRSV perde-se em menos de 1 semana a 4°C, mas títulos baixos de infecção pelo vírus podem ser detectados por pelo menos 30 dias. Em solução, a infectividade do PRRSV persiste por 1 a 6 dias a 20 a 21°C, de 3 a 24 horas a 37°C, e de 6 a 20 minutos a 56°C. A estabilidade térmica do PRRSV no soro e tecidos é similar ao que foi descrito para a armazenagem do vírus em meios de cultura. O PRRSV foi isolado de 47%, 14%, e 7% de amostras de soro suíno armazenadas a 25°C por 24, 48, e 72 horas, respectivamente. Quando o soro foi armazenado a 4°C ou -20°C, o PRRSV foi isolado de 85% das amostras, após 72 horas (VAN ALSTINE et al. 1993). O PRRSV é estável no pH entre 6,5 e 7,5, mas sua atividade se perde rapidamente no pH abaixo de 6 e acima de 7,5 (BENFIELD et al 1992; BLOEMRAAD et al,1994).

3.9 Desinfecção

O PRRSV é inativado por solventes lipídicos, por exemplo, clorofórmio e outros (BENFIELD et al 1992). O PRRSV é altamente instável em soluções contendo baixas concentrações de detergentes, as quais rompem o envelope viral, liberando concomitantemente as partículas não infecciosas contidas na sua região central e levando à perda da infectividade (SNIJDER & MEULENBERG,2001). A desinfecção requer, primeiramente, a remoção de todo o material orgânico. Daí em diante, o processo de inativação obedece a um padrão que depende do tempo de contato e da temperatura, específicos para o agente e o desinfetante.

O PRRSV é relativamente lábil no ambiente e particularmente sensível à falta de umidade (PIRTLE & BERAN,1996) Em “temperatura interna”, SHIRAI et al. (2000) relataram a completa inativação do PRRSV com cloro (0,03%) em 10 minutos, iodo (0,0075%) em um minuto e com um composto de quaternário de amônio (0,0063%) em um minuto. Os efeitos da temperatura ou pH não foram estudados. DEE et al (2004 a,b) relataram que protocolos envolvendo limpeza,

lavagem, desinfecção e secagem foram efetivos na inativação do PRRSV em veículos de transporte.

3.10 Programas de Controle e Erradicação da PRRS em alguns países

A PRRS é encontrada principalmente na parte ocidental da Dinamarca, porém está disseminada por outras partes do país. Com a finalidade de impedir a propagação da doença, a Federação de Criadores de Suínos e Abatedouros (Federation of Danish Pig Producers and Slaughterhouses) estabeleceu um programa voluntário de controle da doença. O programa iniciou em 1995 e, como primeira medida, propôs a vacinação de todos os cachaços, pelo menos 8 semanas antes de entrarem nas Centrais de Inseminação. Uma vacina viva, oriunda de amostra americana do vírus (Ingelvac ® PRRS MLVO), foi aprovada pelas autoridades dinamarquesas. O próximo passo foi a seleção por sorologia do rebanho para a presença do vírus. Os soropositivos eram submetidos a vacinação no ano subsequente. Posteriormente, foi encontrado um vírus da PRRS em rebanhos não vacinados e previamente livres de PRRS e que era 99% idêntico ao vacinal

Por esta razão, foi desenvolvido um teste de ELISA para a diferenciação dos anticorpos das amostras americanas e das amostras européias e que fosse aplicável em grande escala, já que os exames disponíveis como o Imunoperoxidase, são muito trabalhosos (SORENSEN et al, 1998).

A mesma situação, com relação à introdução do vírus vacinal no país ocorreu na Áustria (INDIK et al, 2005).

Deve - se tomar cuidados com o efeito da vacina em situações enzoóticas. Por ser um RNA-vírus há alta capacidade de mutação e de complexa biologia imunológica, a vacinação pode causar resultados inesperados (ALBINA, 1997).

No caso da região francesa de 'Pays de la Loire', na qual a doença foi introduzida em 1992, a autoridade sanitária regional (Regional Sanitary Defence Confederation - FRGDS) estabeleceu, em 1993, um programa de controle da doença

que foi aplicado na compra de animais (matrizes, cachacos e leitões), Central de Inseminação Artificial, e á outros fatores ambientais (pessoas, veículos, materiais). Animais de vários rebanhos infectados foram abatidos. Foi, estabelecido controle de movimentação destes animais. Desta maneira, conseguiram minimizar a disseminação do PRRSV e reduzir a prevalência da doença na região. Com novas descobertas a respeito da epidemiologia do vírus, como por exemplo, a transmissão via sêmen, o programa foi renovado, quando considerado o modelo inicial. Atualmente é realizada sorologia por amostragem em rebanhos próximos aos infectados (LE POTIER et al, 1997). Na Áustria, um levantamento feito em abatedouros em 1993 com 253 suínos de 44 rebanhos não mostrou indícios de infecção pelo vírus da PRRS (NOWOTNY et al., 1994), mas surtos clínicos surgiram em dezembro de 1993 (KRASSNIG et al, 1994). Portanto, é necessário realizar uma vigilância contínua a fim de validar o "status" contínuo de cada país como livre do vírus da PRRS (ZIMMERMAN ,2006b).

3.11 *Brasil está livre do PRRSV ?*

A ausência do PRRSV no Brasil traz vantagens comerciais aos produtores brasileiros, pois, podem comercializar animais livres da doença, além de auferirem vantagem econômica direta em termos de custos de produção mais baixos, pois, segundo NEUMANN et al. (2005), a PRRS afeta as populações de suínos nas fases de crescimento e de reprodução. Os rebanhos afetados (pela PRRS) apresentaram taxas de parição menores, reduzido número de leitões desmamados, taxa de crescimento mais lenta, menor eficiência de crescimento e aumento da mortalidade. O impacto econômico anual total destes efeitos para os suinocultores dos Estados Unidos foi estimado em US\$ 66,75 milhões nos rebanhos de cria e em US\$ 493,57 milhões em populações de suínos em crescimento, totalizando aproximadamente US\$ 560,32 milhões em perdas anuais (ZIMMERMAN,2006b)

No Brasil, inquérito sorológico foi realizado entre 1999 e 2000, pelo MAPA, em granjas de suínos localizados em 8 (oito) Estados do Brasil, que haviam importado recentemente reprodutores suínos e material genético de países positivos

para PRRS. Foram examinadas 3.785 amostras de soros (3442 da sorologia inicial e 343 da recolheita) de animais oriundos de 54 plantéis, pela prova de ELISA (kit da Idexx) no Laboratório de Virologia da Embrapa Suínos e Aves em Santa Catarina.

O resultado revelou que, dentre os 3442 animais, 99,1% eram negativos pela prova de ELISA e o restante 0,9% foram positivos (P = 27 amostras) e suspeitos (S = 4 amostras). A relação S/P foi igual a 0.4 (0.78%) e 04 amostras suspeitas (S/P > 0.2 e < 0.4), somando um total de 31 amostras positivas/suspeitas (0.9%). De acordo com o produtor do kit de ELISA, somente amostras com S/P = 0.4 são consideradas positivas e estes resultados indicando uma taxa de 0.78% de animais positivos, ou seja, inferior a 1% da amostragem realizada.

Nova colheita de amostras de sangue foi realizada nas 5 granjas que apresentaram animais positivos e/ou suspeitos e foram incluídos animais que estiveram em contacto com estes, totalizando 343 amostras (Figura1). Dentre essas amostras de soro, apenas 07 animais resultaram positivos ao mesmo teste de ELISA (CIACCI – ZANELLA et al, 2004).

Paralelamente ao teste de ELISA, 38 amostras (positivas e negativas) foram submetidas à prova de imunofluorescência indireta (IFI) em lâminas contendo células MARC-145 infectadas com PRRSV e todas se revelaram negativas (OSÓRIO, 2002).

Posteriormente, amostras de animais positivos e pool de amostras de animais contacto foram cultivados em células MARC-145 (fibroblastos de rim de macaco) que são susceptíveis ao vírus da PRRS (MENGELING et al,1996) para fins de isolamento viral *in vitro*. Esses inóculos eram representados por mistura de soro, sangue, suabes de amídalas e suspensão de fragmento de amídalas obtido por biopsia. Sete dias após a inoculação, não foi observado efeito citopático (CPE) característico de PRRSV (MENGELING et al,1996).

Foi realizada também tentativa de isolamento viral (IV) *in vivo* ou bio-ensaio suíno (BES) pela inoculação em leitões lactentes (5 a 10 dias de idade) mantidos em isoladores com pressão negativa. Estes suínos foram inoculados com 5 ml do inoculo. Esses animais foram avaliados quanto aos sinais como febre, anorexia ou inapetência, diarreia, e manifestações de natureza respiratória e foram também acompanhados por sorologia semanal pelo mesmo teste de ELISA. Esses animais foram submetidos à necrópsia acompanhada de colheita de amostras de sangue e órgãos para análises histopatológicas e virológicas. Este bio-ensaio em suíno lactente indicou que durante as 4 primeiras semanas todos os leitões inoculados não manifestaram sinais clínicos de PRRS e a sorologia não indicou soroconversão. À necrópsia e histopatologia, não foram observadas lesões patológicas e ausência de lesões histopatológicas características de PRRS no material examinado.

Exames virológicos (IV) e moleculares (RT-PCR) não indicaram a presença de partículas virais ou RNA de PRRSV. A prova de RT-PCR apresentou resultado negativo para RNA viral em todas as amostras de soros positivos ao teste de ELISA, “pool” de órgãos, suabes de amídalas, sangue e soro de suínos da recolheita e para RNA extraído de órgãos de fetos suínos provenientes de porca positiva para PRRSV no teste de ELISA. As reações de transcriptase reversa (RT) e de PCR utilizaram “primers” para a região da ORF7 (CHRISTOPHER-HENNINGS et al, 1995) que codifica uma proteína de nucleocapsídeo viral conservada em diferentes isolados do PRRSV. A RT-PCR “nested”, também foram realizadas em amostras de RNA utilizando “primers” para a nucleoproteína ORF7. Os “primers e condições para a RT-PCR foram os mesmos descritos anteriormente (CHRISTOPHER-HENNINGS et al, 1995). Todas as amostras de RNA de soro suíno positivas, suspeitas pelo teste de ELISA, tecidos fetais de porca positiva pelo teste de ELISA, “pool” de órgãos de suínos positivos no ELISA foram testadas inicialmente em “pool” com três amostras cada e amostras suspeitas do “pool” foram testadas individualmente. Todas as amostras resultaram negativas.

Assim, o status do Brasil como negativo para PRRSV evita o custo elevado que enfrentam os países positivos para PRRSV e, portanto, proporciona uma grande vantagem de produção a seus produtores (ZIMMERMAN, 2006b).

3.12 Legislação Pertinente ao Assunto (PRRS)

Quanto à legislação pertinente ao assunto e de acordo com a Instrução Normativa 31, de 10 de maio de 2002, do MAPA, os suínos destinados à exportação para o Brasil devem ser submetidos a testes de diagnóstico estabelecidos durante a quarentena realizada na origem e no destino. No caso de algum animal resultar positivo (para os testes de diagnóstico requeridos) durante a quarentena de origem, todo o lote é impedido de ser exportado para o Brasil.

Os requisitos para exportação para o Brasil de suínos, destinados à reprodução, contido nesta Instrução Normativa, estabelece que o Veterinário Oficial do país exportador deve certificar que os suínos necessitam ser oriundos de estabelecimentos sem registro de ocorrência clínica de várias doenças incluindo a PRRS, nos últimos 12 meses que antecedem ao embarque. Estabelece também que os animais devem ser submetidos a testes de diagnóstico com resultado negativo para PRRS em dois testes consecutivos de ELISA com intervalo mínimo de 21 dias.

Na quarentena no Brasil, os animais devem ser submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos contra PRRS (BRASIL, 2002a).

Na Instrução Normativa Nº 54 do MAPA, de 17 de junho de 2002 (BRASIL, 2002b), estão estabelecidos os requisitos zoonosológicos para importação de sêmen suíno e constam do Anexo as referências às regras e procedimentos para importação de sêmen suíno de países não integrantes do MERCOSUL, exigindo que o sêmen destinado à exportação para o Brasil deva ser colhido em um Centro de Colheita e Processamento de Sêmen (CCPS) devidamente registrado junto ao Serviço Veterinário do país exportador que opere sob supervisão do respectivo Serviço Veterinário Oficial, controlado periodicamente quanto ao estado de saúde e ao bem-estar dos animais, assim como os métodos utilizados para a colheita, processamento e armazenamento do sêmen, os registros efetuados e os controles sanitários realizados no CCPS.

Durante o período da colheita até o momento do embarque do sêmen, o país exportador deve encontrar-se livre de peste suína africana, doença vesicular do suíno, peste bovina e de febre aftosa de acordo com as recomendações do

Código Zoossanitário Internacional do OIE (OIE,2006b). Nesta legislação também consta que esses animais devem ser negativos para PRRS de acordo com o seguinte protocolo: teste de ELISA, no mínimo 30 (trinta) dias que antecederam a colheita do sêmen e, 15 (quinze) a 60 (sessenta) dias após a colheita (BRASIL, 2002b).

3.13 A análise de risco e a avaliação do Risco de ocorrência de uma doença

As importações de animais ou produtos de origem animal implicam em certo risco da introdução de diferentes doenças nos rebanhos do país importador. A principal finalidade da análise de risco associada às importações é proporcionar aos países importadores um método objetivo e justificável para avaliar os riscos da introdução de uma enfermidade associada a qualquer importação de animais, produtos de origem animal, material genético animal, alimentos para animais, produtos biológicos e materiais patológicos.

Risco: função da probabilidade de um efeito adverso e da magnitude deste efeito em decorrência de um perigo acontecer. A moderna Epidemiologia se estrutura, a partir da incorporação deste conceito, e nos propõe um novo modelo explicativo: *Epidemiologia dos fatores de risco*. a Epidemiologia, a partir da utilização do conceito de risco, não procura mais a etiologia e sim a associação de determinados fatores (de risco) com as patologias (ALMEIDA - FILHO ,1989)

Avaliação de Risco: é o processo de estimativa de probabilidade de ocorrência de um determinado acontecimento e a magnitude de efeitos adversos (em termos de segurança, saúde, ecologia, ou economia) durante um determinado período de tempo (USEPA , 1989).

Risco, é considerado como função de vários fatores, nomeadamente:

- da natureza do perigo,
- da possibilidade de contacto (potencial de exposição),
- da característica das populações expostas (comunicantes),
- da freqüência de ocorrência,
- do grau de severidade e suas conseqüências, (USEPA , 1989).

Análise de Risco para a Saúde:,segundo(LOUVAR&LOUVAR, 1998), é um processo organizado de forma metodológica, utilizado para descrever e estimar a

possibilidade de ocorrência de um efeito adverso para a saúde a partir da exposição ambiental de determinadas substâncias químicas. As quatro fases do processo são:

- identificação de perigos,
- avaliação dose-resposta,
- avaliação de exposição e
- caracterização de risco.

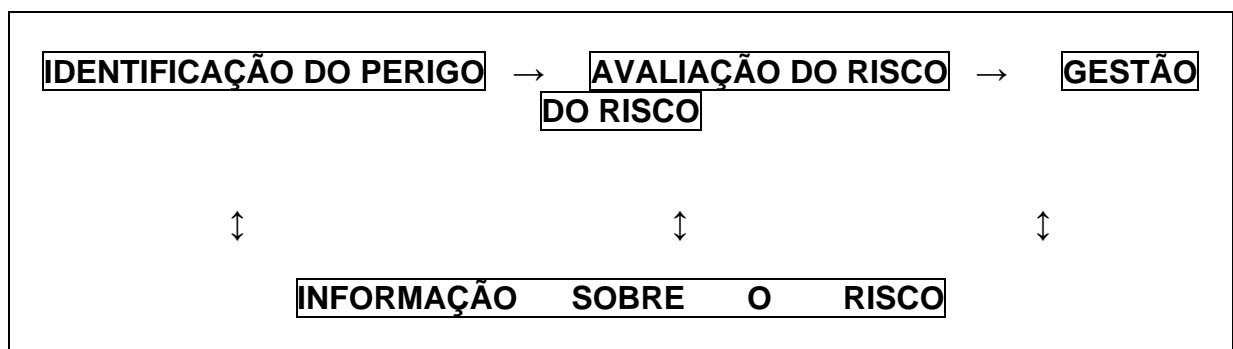
A “Análise de Risco” e “Avaliação de Risco”, são termos frequentemente utilizados como sinônimos, embora a análise de risco seja mais vasta incluindo os aspectos de gestão de risco

A análise deve ser transparente para justificar de forma clara e documentada a respeito das razões das condições impostas à importação ou a recusa desta.

A transparência também é essencial para o fato de que os dados podem ser incertos ou incompletos e se a falta de uma documentação completa pode criar confusão entre os dados e o valor que lhes concede uma pessoa que os analisa (LOUVAR& LOUVAR, 1998)

As fases de uma análise de risco são: identificação do perigo, avaliação do risco, gestão do risco e a informação sobre o risco.(OIE, 2006b)

Quadro. 1. As quatro etapas da análise de Riscos ,Adaptado de OIE,Código Sanitário para los Animales Terrestres, 2006, São Paulo 2007



A avaliação do risco é a etapa da análise em que se procura estimar o risco associado a um determinado perigo. Uma avaliação de risco pode ser qualitativa ou quantitativa. Para muitas doenças em particular que figuram no Código Terrestre da OIE que contém normas difundidas e reconhecidas internacionalmente, existe um amplo consenso sobre os riscos possíveis. Nesses casos, uma avaliação qualitativa será provavelmente suficiente

A avaliação qualitativa não requer competências particulares em matéria de modelagem matemática e para tal se utilizam frequentemente de conhecimentos de epidemiologia e informações correntes. Nenhum método de avaliação de risco associado às importações é aplicado a todas as situações e segundo as circunstâncias um método pode ser mais conveniente que outro.

O processo de análise de risco associado às importações devem levar em conta os resultados de uma avaliação dos serviços veterinários, o zoneamento e compartimentalização, assim como os sistemas de vigilância epidemiológica utilizadas no país exportador para o controle contínuo das doenças dos animais.(OIE 2006b)

3.14 Riscos de Ocorrência de PRRS no Brasil

3.14.1 Através de sêmen.

Na fêmea, as conseqüências reprodutivas de receber sêmen contaminado com vírus são mínimas, desde que a qualidade do sêmen seja aceitável. Vários estudos não conseguiram demonstrar uma redução nos índices de fertilização ou concepção após a inseminação com sêmen contaminado pelo vírus (LAGER et al , 1997; PRIETO et al , 1997). Portanto, o sêmen contaminado pelo vírus não pode ser imediatamente reconhecido por uma redução no desempenho reprodutivo. Mais importante é a possível transmissão do PRRSV para a fêmea que recebe o sêmen contaminado e o potencial de disseminação a outros animais no rebanho (PRIETO et al.,1997; YAEGER et al , 1993).

3.14.2 Através da Carne

Os países livres do PRRSV revelam preocupação com a introdução do vírus através da importação de produtos de origem suína contaminados com o vírus (ZIMMERMAN, 2006b). Esta preocupação foi reforçada por um estudo de BLOEMRAAD et al (1994) que relataram pela primeira vez que o vírus estava presente, embora em títulos baixos, em tecido muscular colhido de suínos na fase de viremia e que a quantidade de vírus havia sido ligeiramente afetada pelo armazenamento por até 48 horas a 4^o C. Mais recentemente, um estudo de análise de risco (EFSA, 2005) conclui que cerca de 1,9% das carcaças de suínos poderiam conter o PRRSV ao abate. Esta conclusão baseou-se em relatos de FREY et al. (1995) que constataram que 6 de 1.049 (0,6%) das amostras de carne de abatedouro foram positivas para o vírus da PRRS por prova de isolamento viral, e MAGAR e LAROCHELLE (2004) constataram que 19 de 1.027 (1.9%) das amostras de carne eram positivas pela prova de PCR. Em um estudo posterior, o vírus só foi isolado em uma das amostras de carne positivas no PCR, indicando que o título de vírus infeccioso era baixo, se é que estava presente. O importante em termos de avaliação de risco é a redução progressiva dos títulos de vírus infeccioso durante o processo de abate, armazenamento, congelamento-descongelamento.

No geral, os dados sugerem que o vírus está presente em níveis reduzidos ou ausente na carne de suínos em idade de abate e que o risco de transmissão para suínos através do consumo de carne suína é extremamente baixo provavelmente aproximando-se a zero. Embora vários países negativos para o PRRSV tenham importado muitas toneladas de carne fresca de suíno de países onde o PRRSV é endêmico, não há casos em que o PRRSV tenha sido detectado em carne importada ou em que o vírus tenha sido introduzido através da carne de suíno importada (ZIMMERMAN, 2006b)

3.14.3 Através de Suínos Importados

O primeiro caso clínico de PRRS na Espanha, ocorrido em janeiro de 1991, apresentou relação com a importação de suínos vivos (PLANA DURAN et al., 1992).

Na Ásia, foram retrospectivamente documentados anticorpos contra o vírus da PRRS em soros de suínos importados da República da Coreia (Coreia do Sul) em outubro de 1985 (SHIN et al, 1993).

3.14.4 Através de Hospedeiros alternativos

Presumivelmente, uma espécie silvestre pode ter sido a fonte de infecção original do vírus. Admitindo-se que esta hipótese seja plausível, podem então existir uma ou mais espécies de hospedeiros alternativos. Portanto, a identificação de hospedeiros não suínos suscetíveis é importante do ponto de vista epidemiológico porque uma espécie ainda não reconhecida pode atuar como reservatório do PRRSV. Já se constatou que várias espécies não são suscetíveis ao PRRSV, incluindo camundongos, ratos, cobaias (ZIMMERMAN et al 1997). Semelhantemente, WILLS et al (2000) não detectaram indícios de replicação do vírus da PRRS em gatos, cães, camundongos, gambás, guaxinins, ratos, cangambás, pardais domésticos ou estorninhos. ZIMMERMAN et al (1997) relataram que os marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) eram suscetíveis ao PRRSV, pois, quando expostos ao vírus contido na água de bebida foram recuperados de fezes e resultado semelhante foram observados em 8 dos 20 patos após 39 dias da exposição. No entanto, outros pesquisadores não conseguiram reproduzir estes experimentos. Até o momento, a questão sobre espécie hospedeira que não a suína permanece sem resposta. (ZIMMERMAN ,2006a).

3.14.5 A fonte de infecção mais provável de PRRSV

Com base na literatura disponível, o meio mais provável de introdução do PRRSV em uma área, região ou país é através de suínos infectados ou sêmen contaminado com o vírus. (ZIMMERMAN .2006b)

3.15 Prevenção para evitar a PRRS no Brasil

3.15.1 Como o Brasil deve se prevenir para evitar a introdução dessa doença ?

De acordo com STEFHANO (2006), um ponto vulnerável do Brasil indica ser o diagnóstico que requer mais apoio. O outro, aspecto importante é a biossegurança e para tanto, o Brasil poderia dispor de programas de prevenção preestabelecidos. Para romper um programa de controle sanitário, basta apenas um descuido e o problema estará instalado. É preciso aprimorar as medidas preventivas incluindo procedimentos de diagnóstico. E deve-se realizar sorologias periódicas (bimensais, trimestrais ou semestrais) para manter um controle seguro do rebanho brasileiro ou detectar precocemente a doença caso venha a ser introduzida.

3.15.2 Vigilância Epidemiológica.

Em um país livre de PRRSV como o Brasil, a medida de profilaxia mais importante é a vigilância epidemiológica, incluindo a detecção precoce do PRRSV, as medidas de vigilância envolvem uma adequada validação dos testes de diagnóstico disponíveis. (STEFHANO,2006) De acordo com DUFRESNE et al. (2003), o valor preditivo de um teste é a probabilidade de que um resultado seja específico, ou seja, a probabilidade de um teste detectar como positivo um animal realmente positivo ou infectado e a de detectar como negativo um animal realmente negativo ou não infectado . À medida que a prevalência se aproxima de zero, por exemplo, em um país livre do PRRSV, uma proporção crescente de

resultados positivos ao teste serão falsos positivos (THRUSFIELD, 1986). Isto ocorre em função da prevalência e não significa que o teste seja inadequado. No entanto, do ponto de vista do veterinário de suínos ou do suinocultor, os resultados falsos positivos podem resultar em perdas, já que os animais são descartados ou rebanhos interditados. (ZIMMERMAM, 2006a). Importante também é que o falso positivo pode resultar em perda de credibilidade dos resultados obtidos pelo laboratório de diagnósticos (SAYD, 2006).

É importante que os laboratórios de diagnóstico tenham conhecimento de testes confirmatórios, de sorte que os falsos negativos possam ser rapidamente eliminados. (STEFHANO, 2006)

CIACCI-ZANELLA et al, 2004, inferiram que a prevalência obtida igual a 0,78% na população testada nos estados do Brasil onde a suinocultura é expressiva, não caracteriza a ocorrência de PRRS no Brasil, pois, este valor estimado não se enquadra nas características epidemiológicas da PRRS, conhecida em países endêmicos para essa doença tais como as abaixo relacionadas:

Após uma fase epidêmica severa, a infecção torna-se endêmica. A prevalência da infecção é geralmente elevada em países infectados. Entretanto, nas áreas com uma densidade baixa de população suína, a infecção pode espalhar lentamente e se o trânsito de animais infectados não forem significativos dentro dos rebanhos, o vírus espalha rapidamente infectando até 85 a 95% dos suínos em um rebanho os suínos tornam-se soro - positivos dentro de dois a três meses. Depois disso, a atividade do vírus persiste por períodos prolongados (diversos meses a anos). Não obstante, alguns autores relataram a eliminação espontânea de PRRSV nas granjas infectadas (ALBINA, 1997)

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 MATERIAL:

4.1.1 GRANJAS:

4.1.1.1 Granjas amostradas

Foi examinada a totalidade das 03 granjas de reprodução existentes no Estado de São Paulo no período entre 2005 e 2006, que apresentavam risco para a PRRS identificadas por G1, G2 e G3 constituídas por matrizes e reprodutores rotineiramente submetidas à monitoria sorológica para PRRS por iniciativa do respectivo Médico Veterinário Responsável Técnico e que apresentavam as seguintes características:

Granja G1*: localizada da Região de Andradina, com plantel de 570 matrizes e 6 reprodutores, que repõe seu rebanho com reprodutores filhos e descendentes de importados e que no período estudado adquiriu 22 reprodutores considerados com risco de terem sido expostos ao vírus da PRRS pelo fato dos ascendentes terem sido oriundos de países endêmicos para esta doença.

Granja G2*: localizada na Região de Mogi Mirim, com plantel 600 matrizes e 6 reprodutores, importadora de suínos e que adquiriu 145 animais do Canadá em 2005.

Granja G3*: localizada na região de Jaú, com plantel de 1.800 matrizes e 12 reprodutores, e que adquiriu 61 reprodutores considerados com risco de terem sido expostos ao vírus da PRRS pelo fato dos ascendentes terem sido oriundos de países endêmicos para esta doença.

* Granja GRSC (Granja de Reprodutores Suídeos Certificada)

O número de animais amostrados em sorologia dessas granjas encontra-se na Tabela 1 e o número de reprodutores machos dessas Granjas, amostrados em colheita de sêmen, encontra-se na Tabela 2

4.1.1.2 Granjas Centrais de Inseminação Artificial com reprodutores para exame de sêmen

Foram estudadas sete (07) Centrais de Inseminação Artificial (CIA) localizadas no Estado de São Paulo, que alojavam suínos reprodutores filhos ou descendentes de animais importados que poderiam ter apresentado risco de exposição a PRRS. (além das centrais das Granjas G1;G2;G3, já mencionadas acima). Foram estudadas também as granjas identificadas por G4; G5; G6; G7 (todas pertencentes à categoria GRSC) e com as seguintes características:

CIA G4: localizada na região de Sorocaba, com plantel de 1.000 matrizes e 16 reprodutores sendo apenas 2 (dois) descendentes de animais importados;

CIA G5: localizada na região de Bauru, com plantel de 32 reprodutores .

CIA G6: localizada na região de Bragança Paulista, com plantel constituído de 15 reprodutores;

CIA G7: localizada na região de Mogi Mirim, plantel de 28 reprodutores.

Reprodutores recém adquiridos foram mantidos em quarentena na própria granja e para colheita de amostras de sêmen foram selecionados ao acaso.

4.1.2 ANIMAIS:

4.1.2.1 Amostragem dos animais

Das 3 (três) granjas de reprodutoras foi examinada uma amostra de 228 animais, estatisticamente significativa, tamanho estabelecido por critérios de amostragem segundo Thrusfield (1986) para detecção de pelo menos 1 caso de doença exótica para 95% de confiança e reprodutoras selecionadas ao acaso.

4.1.2.2 Amostragem de Reprodutores

Das 7 (sete) Centrais de Inseminação Artificial foi examinada uma amostra de 53 reprodutores, , estatisticamente significativa, tamanho estabelecido por critérios de amostragem segundo Thrusfield (1986) para detecção de pelo menos 1 caso de doença exótica para 95% de confiança e reprodutoras selecionadas ao acaso;

4.1.3 AMOSTRAS DE SANGUE:

Foram colhidas 434 amostras de sangue por punção na veia cava cranial direita do animal. As amostras de sangue (Figura 4) foram colhidas com auxílio de agulhas metálicas de medidas 100x15 mm, com o animal mantido em pé e contido por um laço de nylon denominado cachimbo, passado na altura do focinho, método de contenção descrito por MORENO et al, (1997), as amostras de sangue foram transferidas para tubos de vidro de 9ml, deixadas em repouso em estantes por 2 horas em temperatura ambiente, para retração do coágulo, a seguir centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, transferido o soro sanguíneo (2 mL) com auxílio de pipetas plásticas do tipo descartáveis para frascos de vidros do tipo penicilina estéreis com capacidade para 10 mL, acondicionados em caixas isotérmicas sob refrigeração à temperatura de 2 a 5°C e enviados para os laboratórios CEPPA-SP e CEDISA-SC onde foram realizados os testes diagnósticos de PRRS. As colheitas foram realizadas em 2005. Na 1ª granja foi realizada uma única colheita de 22 animais. Na 2ª granja foram realizadas 4 colheitas de sangue sendo 2 colheitas de 70 animais e 2 colheitas de 75 animais. Na 3ª granja foram realizadas 2 colheitas de 61 animais.



Figura 4 - Amostras de sangue de suínos colhidas em tubos de vidro de 9ml.

4.1.4 AMOSTRAS DE SÊMEN: Foram colhidas 53 amostras de sêmen durante os procedimentos de rotina de obtenção de sêmen, observando as normas de manejo da Central de Inseminação (Figura 5) segundo metodologia preconizada por CORRÊA et al, (2001).

As colheitas foram realizadas no período da manhã ; observando o intervalo entre colheitas dos machos, seguindo o seguinte esquema:

Machos jovens, com até um ano de idade – colheita uma vez por semana; machos adultos, com mais de um ano de idade, e boas condições de sêmen – colheita 3 vezes a cada 15 dias, ou seja intervalo de 5 – 4 – 5 dias.

Procedimentos: Fazia-se a limpeza do macho antes de levá-lo para sala de colheita, lavando-o com sabão neutro e esgotando o líquido prepucial, os machos foram treinados em manequim fixo para a coleta de sêmen pelo método da mão enluvada. Foram utilizados no local ,tapetes de borracha para que o macho não

escorregasse na hora do salto. O sêmen foi coletado em sala de colheita, limpa e isolada das baias, evitando assim contaminações. Utilizou-se recipientes separados para colher fração rica e pobre

Foi estabelecido o regime de uma colheita semanal de sêmen, com colheita do doador que estivesse em serviço na semana da visita à Granja.

No Laboratório da Central, o sêmen era recebido através de um óculo, evitando-se, assim a entrada da mesma pessoa que faz a coleta dentro do laboratório. O material para análise era preparado para fazer os testes de rotina rapidamente, o sêmen era diluído o mais rápido possível, deixado descansar por 2 horas antes de envasá-lo, em bisnagas plásticas de 100 ML, sempre com a temperatura interna do laboratório estável a 20 ° C

Foram tomados os seguintes cuidados com o sêmen :

O sêmen recebido era colocado diretamente na geladeira (15 a 18 ° C). Procurou-se observar se o sêmen chegou em boas condições para armazenamento. Também evitou-se colher amostras de sêmen estocado por mais de 3 dias contando a data da colheita.

No estoque o sêmen era colocado em posição horizontal na geladeira de 15 a 18° C e movido lentamente 2 a 3 vezes ao dia para uma melhor homogeneização do diluente com o sêmen.

Manteve-se um termômetro de máxima e mínima no interior da geladeira. a fim de se observar e notificar a temperatura 2 vezes ao dia.

As amostras de sêmen dos 53 reprodutores foram acondicionadas em frascos apropriados. (bisnagas plásticas com capacidade para 100 ML) e enviados em caixa de isopor ao Instituto Biológico para realização da prova de triagem por microscopia eletrônica de transmissão

Dados referentes às variáveis selecionadas para o estudo estão reunidos na Tabela 1.

O número de amostras de soros de matrizes e de sêmen nas amostras está reunido na Tabela 2.

Tabela 1 – Frequências segundo a variável e ano. São Paulo, 2007.

Variável	ANO		Total
	2005	2006	
Nº granjas importadoras	01	-	01
Nº granjas c/ filhos ou descendentes de importados	01	06	07
Nº animais examinados	145	83	228
Nº amostras examinadas	290	144	434
Nº animais importados	145	-	145
Nº granjas importadoras	01	-	01

Tabela 2 – Nº de amostras de soro e de sêmen segundo a granja ou Central de Inseminação. São Paulo, 2007.

	Identificação	Nº animais amostrados sorologia	Nº amostras sêmen	Nº amostras soro
Granja	G1	22	2	22
	G2*	145**	16	290
	G3	61	8	122
Granja-CIA	G4	-	2	
	G5	-	6	
	G6	-	15	
	G7	-	4	
	7	228	53	434

* 2 importações

** 2 sorologias



Figura 5 – Suínos de uma Central de Inseminação Artificial de Suínos, clinicamente normais.

4.1.5 AMOSTRAS DE TECIDOS: Foram colhidas amostras de tecido de amígdalas, pulmões e linfonodos mediastínicos dos animais positivos (2) submetidos ao teste de ELISA .As amostras (cerca de 100mg de tecido) foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em gelo seco. Foram colhidas 3 fragmentos, em duplicata, de cada órgão dos 2 animais positivos á sorologia. Uma parte da amostra foi colocada em tubos contendo Trizol® (GibcoBRL) e a outra foi enviada ao laboratório congelada, embalada em sacos plásticos tipo ziploc e enviada em gelo seco. Quanto ao procedimento de colheita das amostras, foi utilizado um conjunto de luvas, pinças e tesouras para cada animal, objetivando prevenir contaminações cruzadas, pois, procurou-se realizar colheita asséptica de amostras. Foram colhidas amostras de sangue, aproximadamente 5 mL em frascos contendo anticoagulante (EDTA) e conservado em gelo seco . Estas amostras foram imediatamente enviadas ao

laboratório para a realização do teste de RT-PCR para fins de averiguação dos 2 animais soropositivos para PRRS.



Figura 6 - Colheita de amostras de tecidos de suínos para Exame de PCR

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 SOROLOGIA: para detecção de anticorpos anti-vírus da PRRS foi realizada a técnica de ELISA INDIRETO: utilizando-se o kit importado da empresa IDEXX[®] Laboratories ELISA HerdCheck para anticorpos para o vírus de PRRS., calculando os resultados e interpretando-os baseados na sensibilidade, especificidade e valor preditivo do teste.

4.2.1.1 ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbant Assay) INDIRETO

Teste imunoenzimático, que utiliza anti-anticorpos marcados com uma enzima para detectar anticorpos no soro teste.

As amostras de soro de suínos foram colocadas em orifícios de placas de poliestireno impregnadas previamente com PRRSV, para promover reação antígeno-anticorpo caso este último estivesse presente no soro sob teste. A mistura foi colocada para incubação, 37° C por uma noite a seguir, lavou-se a placa para remoção das substâncias que não reagiram. Adicionou-se, em cada orifício, um conjugado anti IgG de suínos ligado a peroxidase. Colocou-se a mistura para incubação a 37° C por 12 horas e a seguir, lavou-se para retirada de todo excesso do conjugado. Adicionou-se um substrato cromógeno, que em presença da enzima desenvolve cor. Amostras positivas apresentaram cor azul e amostras negativas permaneceram incolores. Submeteu-se a placa a uma leitora de espectrofotômetro medindo O.D. (Densidade Óptica) com filtro A650λ. Calculou-se a razão S/P (relação entre a densidade óptica da amostra e os controles positivos e negativos).

Para o kit de ELISA PRRS, a nota de corte ou seja, um ponto a partir do qual se distinguem os resultados positivos dos negativos foi 0.4 e, portanto, soros com valores da razão acima de 0,400 foram positivos e igual ou abaixo de 0.399 foram negativos.(SAYD,2006)

4.2.2 PCR das Amostras Positivas no ELISA INDIRETO

As amostras foram submetidas à extração do RNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do Tiocianato de Guanidina, junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucleicos foi descrito por BOOM et al, (1990). Após a extração do RNA uma alíquota do produto foi estocada a - 20° C.

A amplificação do RNA viral foi realizada utilizando-se 200 mM da mistura de deoxi-nucleotídeos (dNTPs), 2.5 µl do tampão de PCR, 0.75 µl de MgCl₂, 10 pmoles do “primer sense”, 10 pmoles do “primer antisense”, 5 µl da solução de DNA, 0.2 µl da enzima Taq polimerase, água bidestilada para um volume final de 25µl e uma gota de óleo mineral fino.(ALLENDE et al,1999) .

Terminada esta fase os tubos foram fechados e colocados no termociclador. Os “primers” utilizados para detecção do agente foram os que se seguem no quadro abaixo:

Quadro 2 - Seqüência de “primers” descritos para detecção de Vírus da PRRS

Adaptado de Gilbert et al. 1997, São Paulo 2007.

Tipos de Primers -	Posição no Genoma	Seqüências - vírus PRRS
EU (Amostra americana)	8628-8645	CTCCTGTATGAACTTGC
ED (Amostra Européia)	8863-8882	CAGCTCAAGTTCGAGGACCT

O RT-PCR: o RNA viral total foi preparado de amostras de soros positivos no teste de ELISA para PRRSV, fragmentos de órgãos, sangue total e soro de suínos suspeitos e positivos pelo teste de ELISA. O RNA do soro ou do sangue total foi isolado das amostras positivas para anticorpos de PRRS usando o reagente Trizol® (GibcoBRL). O RNA dos órgãos dos suínos (pulmão, tonsilas, linfonodos,) mantidos previamente congelados a - 80°C foi isolado usando métodos da extração de CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) usando o thiocyanate do guanidine (Promega), o fenol e o clorofórmio. A reação da transcriptase reversa e o PCR foram realizados como descritos por ALLENDE et al (2000). O RNA positivo do controle usado nestes testes era o RNA extraído de PRRSV cultivado nas pilhas MARC-145 (CIACCI-ZANELLA et al,2004)

As reações de transcriptase reversa (RT) e de PCR utilizaram primers para a região da ORF7 (CHRISTOPHER-HENNINGS, 1995), que codifica uma proteína de nucleocapsídeo viral conservada em diferentes isolados do PRRSV.

A RT-PCR nested foram realizadas em amostras de RNA utilizando-se primers para a nucleoproteína ORF7 (CIACCI-ZANELLA et al,2004)

Os “primers” e condições para a RT-PCR foram os mesmos descritos anteriormente (CHRISTOPHER-HENNINGS et al, 1995). A reação da PCR foi realizada segundo protocolo descrito por KIM et al.(2001), em ciclos de temperatura de desnaturação (95°C), de anelamento (65°C) e de extensão (72°C), por um minuto cada, com o prolongamento, por 10 minutos, da temperatura de extensão no último ciclo. A reação externa apresentou 35 ciclos; a interna, 30. Tanto a reação externa quanto a interna foram realizadas nas mesmas condições. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% sob luz ultravioleta.

Todas as amostras de RNA dos suínos positivados pelo teste de ELISA(tecidos,, órgãos,sangue) foram testadas individualmente. Todas as amostras resultaram negativas.

4.2.3 ANALISE DO SÊMEN REALIZADO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

A técnica de contrastação negativa para microscopia eletrônica de transmissão é um dos métodos mais usuais para o diagnóstico de viroses (ALMEIDA,1983;DOANE& ANDERSON,1987;FIELD,1982;MILLER,1988).

Quando o número de partículas víricas em uma amostra é muito baixo, a técnica de imunomicroscopia eletrônica permite a identificação destes vírus pela reação específica antígeno-anticorpo e pela detecção da morfologia viral. Além disso, não requer purificação dos anticorpos e detecta antígenos e/ou anticorpos contaminantes (KATZ &KHON,1984), No laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Biológico as amostras foram processadas pela técnica de contrastação negativa

4.2.3.1 Técnica de Contrastação Negativa

Esta técnica foi realizada segundo a metodologia descrita por BRENNER & HORNE (1959), ALMEIDA (1980), HAYAT & MILLER (1990) e MADELEY (1997). O sêmen diluído a 1:10. (gotas de sêmen) suspenso em tampão fosfato 0,1M , pH 7,0, foi colocado em contato com grades metálicas de cobre, previamente cobertas com filme de colódio e carbono, drenadas com papel filtro e contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0. e finalmente analisadas ao microscópio de transmissão.

Se as amostras resultassem em suspeitas ou positivas, seriam processadas por imunomicroscopia e imunocitoquímica por imunomarcação com ouro coloidal. Pelo método da imunomarcação com ouro é possível detectar e identificar antígenos, localizar nas células infectadas estruturas induzidas por vírus, sorotipar cepas virais (KJELDSBERG, 1986) e determinar variantes antigênicas em um isolado (PATTERSON & OXFORD, 1986). Usamos em nosso trabalho para análise das amostras de sêmen de suínos um microscópio eletrônico da marca Philips EM-208 (Figura 7).



Figura 7 - Microscópio eletrônico Philips EM-208

4.2.4. DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO. Baseou-se na correção da prevalência e cálculo do Valor Preditivo de um Valor Positivo (VPRP) segundo THRUSFIELD, (1986) ; MARTIN et al (1987) Cálculo do VPRP Valor Preditivo de um Valor Positivo (THRUSFIELD, 1986)

4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA: Foi aplicada Estatística Descritiva representada pelo cálculo da proporção de reagentes com correção para a sensibilidade e especificidade da prova sorológica THRUSFIELD, (1986) ; MARTIN et al (1987). e teste de uma proporção com aproximação Normal segundo VIEIRA (1980).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

5.1.1 Resultado de sorologia.

Foram considerados positivos todos os soros que apresentaram relação S/P igual ou superior a 0,4 (ponto de corte) como estabelecido para o kit de ELISA PRRS (SAYD,2006).

As amostras de soros oriundos das Granjas G1 e G2 apresentaram - se sem dificuldades de discriminação entre resultados positivos e negativos, porém a granja G3, apresentou 1 amostra positiva e uma suspeita (1º teste, realizado em laboratório particular), o Serviço Oficial Estadual foi notificado por tratar-se de doença exótica em nosso país. A decisão foi a de repetir o teste nos mesmos animais em laboratório oficial o que resultou em 2 soropositivos .

Os resultados do diagnóstico sorológico por ELISA encontram-se resumidos nas Tabelas 3 e 4, sendo que e na Tabela 3 foram considerados para o cálculo do total, os resultados observados nos 2 testes da granja G3.

Tabela 3 – Resultados de sorologia para PRRS em reprodutoras suínas importadas e filhos ou descendentes de importados segundo a granja e número de animais examinados. São Paulo, 2007.

Granja	Colheita sangue	Nº de animais na amostra	Resultado					
			Positivo		Suspeito		Pos. + Susp	
			Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%
G1	Única	22	0	0,0	0	0,0	0	0,0
G2	2 importações	145	0	0,0	0	0,0	0	0,0
G3*	1º repetição	61	1	1,6	1	1,6	2	3,3
	2ª repetição	61	2	3,3	0	0,0	2	3,3
Total**	4	228	2	0,9	1	0,4	2	0,9

* granja submetida a 2 testes sucessivos em razão do 1º resultado

** foram considerados os resultados da segunda repetição da G3

Se na população classificada como não apresentando a PRRS a proporção de positivos ao teste é igual a P^t e a verdadeira prevalência é P , existem 2 componentes para P^t : ou são verdadeiros positivos ou falsos positivos; considerando a prevalência da PRRS em nosso país é igual a 0%, a Sensibilidade (S) igual a 98,0% (0,98) e a Especificidade (E) igual a 96,0% (0,96) (FERRIN et al, 2004 e DEA et al, 2000).

Considerando tão somente os resultados positivos observados na granja G3, foi realizada correção do valor das freqüências para a prova de ELISA utilizada que apresentou Sensibilidade e Especificidades iguais, respectivamente a 98% e 96% e esses valores corrigidos estão reunidos na Tabela 4.

Considere a verdadeira prevalência da PRRS igual a 0%, a Sensibilidade (S) igual a 98,0% (0,98) e a Especificidade (E) igual a 96,0% (0,96) (FERRIN et al, 2004 e DEA et al, 2000). O valor de P^t será:

$$P^t = P \times S + (1 - P)(1 - E) = 0 \times 0,98 + (1 - 0)(1 - 0,96) = 0,04$$

Verifica-se que este valor não difere muito do valor encontrado que é igual a 0,032. Correção da estimativa da prevalência (P) da PRRS, ou seja, da verdadeira prevalência a partir do valor obtido na sorologia.

$$P = \frac{P^t + E - 1}{S + E - 1} = \frac{0,04 + 0,96 - 1}{0,98 + 0,96 - 1} = 0$$

O valor do VPRP é:

$$\text{VPRP} = \frac{P \times S}{(P \times S) + (1 - P)(1 - E)} = \frac{0 \times 0,98}{(0,04 \times 0,98) + (1 - 0)(1 - 0,96)} = 0$$

Sendo então a probabilidade do resultado positivo detectado no quarentenário ser realmente PRRS é igual a 0,0%.

Tabela 4 – Resultados de freqüências corrigidas (THRUSFIELD, 1986) de positivos à sorologia para a Sensibilidade (98%) e Especificidade (96%) do teste de ELISA para granja G3 e número de animais examinados. São Paulo, 2007.

Granja	Colheita sangue	Nº de animais na amostra	Resultado Positivo		
			Freq.	% Observada	% Corrigida
G1	Única	22	0	0,0	-
G2	2 importações	145	0	0,0	-
G3	1ª repetição	61	1	1,6	0,0
	2ª repetição	61	2	3,3	0,0
Total	4	228	2	0,9	0.0

O valor 0,9% é estatisticamente inferior ao valor esperado de 4,0% de falsos positivos que o teste de ELISA-PRRS da IDDEXX[®] detecta (teste estatístico de proporção com aproximação Normal segundo Vieira, 1980)

5.1.2 Resultado da prova de PCR

Todas as amostras de tecidos (amídalas, pulmões e linfonodos mediastínicos) dos suínos que foram positivos à sorologia na prova de ELISA indireto ,apresentaram resultados negativos no PCR.

5.1.3 Resultados de exames de sêmen.

Todas as 53 amostras de sêmen apresentaram resultados negativos à microscopia eletrônica de contrastação negativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados de Microscopia eletrônica (Contrastação Negativa) para o vírus da PRRS em sêmen de suínos doadores descendentes de animais importados, segundo a granja e número de amostras examinadas. São Paulo, 2007.

GRANJA	Nº de amostras de sêmen examinadas	% de amostras positivas PRRSV nas diversas Granjas
G1	2	0 %
G2	16	0%
G3	8	0%
G4	2	0%
G5	6	0%
G6	15	0%
G7	4	0%
TOTAL	53	0%

5.2 Discussão

Poucas empresas do Brasil importam periodicamente suínos reprodutores e comercializam seus descendentes para granjas localizadas em estados de maior produção suína ,para fins de melhoramento do material genético brasileiro. Países exportadores são, na sua maioria, aqueles da América do Norte e Europa, que apresentam alta endemicidade para PRRS (HILL et al, 1992, WENSVOORT,1991 e CHRISTIANSON,1992) e o Brasil é indene para esta doença (OSORIO, 2002).

A despeito do Brasil adotar rigorosas medidas de Vigilância Epidemiológica para prevenir o ingresso de doenças exóticas em nosso território, análise do risco se faz necessária para monitorar a situação de livre da doença. Este mesmo princípio norteou a realização da análise do risco da ocorrência da PRRS em granjas tecnificadas de suínos e em centrais de inseminação artificial do Estado de São Paulo que importaram reprodutores de ambos os sexos no ano de 2005 e naquelas que adquiriram filhos ou descendentes de importados em 2005 e 2006. Este estudo foi conduzido com base em 3 procedimentos laboratoriais representados pelo diagnóstico laboratorial indireto pela prova de ELISA-PRRS, prova de PCR em fragmentos de tecidos e Microscopia Eletrônica em amostras de sêmen.

Pela observação dos resultados de sorologia reunidos na Tabela 3, poderia-se inferir que a PRRS se encontrasse presente na granja G3, comprovada por 2 repetições com frequências de positivos iguais a 0,9%.Este valor encontrado é igual ao observado por CIACCI-ZANELLA et al (2004) que foi de 0,9% (positivos e suspeitos),indicando ser improvável a presença do vírus da PRRS em face das características epidemiológicas da doença.

Nesta pesquisa, aprofundou-se na avaliação destas freqüências percentuais obtidas introduzindo a correção para a prevalência (THRUSFIELD, , 1986 ; MARTIN et al, 1987) para as sensibilidades e especificidades da prova de ELISA empregada. Assim, os valores corrigidos reunidos na tabela 4 revelam, para a granja G3, que os verdadeiros valores das estimativas do rebanho considerando separadamente as duas repetições, foi igual a 0,0%.

Pela aplicação de uma prova sorológica que apresenta sensibilidade de 98% e especificidade de 96% é esperado encontrar-se 4% de falsos positivos. O valor encontrado na 2ª repetição deste experimento (1,6%) é estatisticamente inferior ao valor esperado de 4%. Pode-se, assim, inferir que a PRRS está ausente nos rebanhos estudados para o nível de rejeição estabelecido de 5%. Esta observação estatística encontra amparo nos conhecimentos da Epidemiologia da doença que revela que o vírus apresenta altas infectividade e imunogenicidade que se refletiriam em termos de elevada prevalência de animais reagentes em ausência de sintomas em se tratando de vírus de alta patogenicidade ou elevadas freqüências de reagentes e de doentes em se tratando de vírus de alta patogenicidade (TORREMORELL, 2004).

Estimadas as prevalências corrigidas das 3 granjas estudadas e considerando as 3 situações em função das duas repetições realizadas na granja G3, como apresentadas nas Tabelas 3 e 4 é lícito inferir que a PRRS encontra-se ausente nas granjas certificadas e/ou monitoradas/tecnificadas e que a Vigilância Epidemiológica aplicada pelo MAPA/Brasil tem prevenido a introdução do vírus da doença em nosso país.

Finalmente, em relação à sorologia empregando a prova de ELISA, pode-se inferir que não é recomendável para o diagnóstico sorológico individual, mas recomendável como prova de triagem e de aplicação em populações animais requerendo cautela em sua aplicação e interpretação. Poder-se-ia eventualmente aventar a hipótese do Serviço Oficial interpretar os resultados globais a cada momento e não interferir quando de ocorrência de situações de conflito quando um Médico Veterinário Responsável se depara com resultados de interpretação que exige conhecimento de Epidemiologia e de Validação de Métodos de Diagnóstico.

Os resultados negativos pela prova de PCR comprovam a ausência do PRRSV, nas amostras soropositivas no teste ELISA indireto.

A técnica de contrastação negativa para microscopia eletrônica de transmissão usada neste trabalho (microscopia do sêmen de suíno) visando a detecção da morfologia viral, é um dos métodos mais usuais para o diagnóstico de viroses, quando o número de partículas víricas em uma amostra é muito baixo, (ALMEIDA,1983;DOANE & ANDERSON,1987;FIELD,1982;MILLER,1988). Os resultados negativos pela prova microscopia eletrônica de sêmen dos reprodutores suínos, não somente confirmam a ausência de atividade viral em rebanhos de suínos de granjas certificadas e/ou monitoradas,mas comprova ser este um método de diagnóstico eficaz para detectar a presença de vírus,quando estiverem presentes, em materiais como o sêmen.

6. CONCLUSÕES

1. A prova de Elisa indica não ser recomendada para o diagnóstico individual da PRRS.
 2. Os dados obtidos revelam que a Vigilância Epidemiológica da VIGIAGRO tem sido suficiente para prevenir a entrada do vírus da PRRS em nosso território.
 3. A vigilância periódica da PRRS indica ser um instrumento valioso para o monitoramento do rebanho de suínos reprodutores importados para a detecção precoce da doença caso seja introduzida.
 4. O uso da microscopia eletrônica na análise do sêmen de reprodutores importados de países endêmicos para PRSS pode ser um instrumento muito útil para a verificação da presença de vírus(vírus da PRRS) nesse tipo de material.
 5. Os resultados negativos obtidos neste experimento frente aos testes de PCR e microscopia eletrônica obtidos neste experimento confirmaram que a correção da prevalência é um procedimento epidemiológico indicado para a interpretação final de vigilância de doenças em populações.
-

6. A análise do risco da ocorrência da PRRS no estado de São Paulo realizada neste estudo por iniciativa não governamental, poderá servir como um exemplo aos órgãos de defesa agropecuária, objetivando como finalidade de realizarem testes laboratoriais de diagnóstico periodicamente para a comprovação do status de livre da presença do PRRVS.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINA, E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. **Vet. Microbiol.**, v.55, p.309-316, 1997.

ALBINA, E. et al. A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. **Vet. Microbiol.**, v.77, p.43-57, 2000.

ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: a review. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.12, p.3-14, 2000.

ALLENDE, R. et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. **J. Gen. Virol.**, v.80, p.307-315, 1999.

ALLENDE, R. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in Individual pigs upon experimental infection. **J. Virol.**, v.74, n.22, p.10834-10837, 2000.

ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia sem números**: uma introdução à ciência. epidemiológica. Rio de Janeiro. Campus, 1989. 108p.

ALMEIDA, J.D. Practical aspects of diagnostic electron microscopy. **Yale J. Biol. Med.**, v.53, p.5-18, 1980.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

ALMEIDA, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.104, p.147-158, 1983.

BARCELLOS, D.; SOBESTIANSKY, J. **Atlas de doenças dos suínos**. Goiânia: Art 3, 2003. 207p.

BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1999. 837p.

BENFIELD, D.A. et al. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4, p.127-133, 1992.

BENFIELD, D.A.; YAEGER, M.J.; COLLINS, J.E. **Experimental studies on the transmission and persistence of swine infertility and respiratory disease virus**. Des Moines: National Pork Producers Council, 1994. p.5-14.

BENFIELD, D.A. et al. Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. **Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Swine Pract.**, p. 405-408, 2000a.

BENFIELD, D. et al. Diagnosis of persistent or prolonged porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. **J. Vet. Res.**, v. 31, p.71, 2000b.

BIERK, M. et al. Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. **Can. J. Vet. Res.**, v.65, p.261-266, 2001.

BLOEMRAAD, M. et al. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. **Vet. Microbiol.**, v.42, p.361-371,1994.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

BOTNER, A.; NIELSEN, J.; BILLE-HANSEN, V. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. **Vet. Microbiol.**, v.40, p.351-360, 1994.

BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAPA n. 31, de 10 de maio de 2002. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 maio 2002a.

BRASIL. Instrução Normativa SDA/MAPA nº 54 de 17 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 2002b.

BRENNER, S.; HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochim. Biophys. Acta**, v.34, p.103, 1959.

CANON, N. et al. Evidence of freedom from porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in Switzerland. **Vet. Rec.**, v.142, p.142-143, 1998.

CHANG, C.C. et al. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus during sequential pig passages. **J. Virol.**, v.76, p.4750-4763, 2002.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v.162, p.156-159, 1987.

CHRISTIANSON, W.T. et al. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.485-488, 1992.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J. et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.7, p.456- 464, 1995.

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

CORRÊA, N.M. et al. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printpar, 2001. 124p.

DEA, S. et al. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E. coli-expressed nucleocapside protein as antigen. **J. Virol Methods**, v. 87, n.1-2, p.109-122, 2000.

DEE, S. et al. Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. **Can. J. Vet. Res.**, v.67, p.12-19, 2003.

DEE, S.A. et al. Mechanical transmission of porcine and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. **Can. J. Vet. Res.**, v.66, p.232-239, 2002.

DEE, S. et al. An assessment of sanitation protocols for commercial transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Can. J. Vet. Res.**, v.68, p.208-214, 2004a.

DEE, S.A. et al. An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. **Can. J. Vet. Res.**, v.68, p.128-133, 2004b.

DEWEY, C. Global PRRS. In: ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1997, Saint Paul. **Proceedings...** Ni: University of Minnesota, 1997. v.24, p.28-32.

DOANE, F.W.; ANDERSON, M. **Electron microscopy in diagnostic virology: a practical guide and atlas.** Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 178 p.

DONE, S.H.; PATON, D.J.; WHITE, M.E.C. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. **Br. Vet. J.**, v.152, p.153-174, 1996.

DUFRESNE, L. et al. Serological monitoring in negative and low prevalence populations. In: ZIMMERMAN, J.J.; YOON, K.J. (Eds.). **PRRS compendium: a comprehensive reference for pork producers, veterinary practitioners, and researchers.** 2.ed. Des Moines: National Pork Board, 2003. p.87-102.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY SCIENTIFIC – EFSA. Opinion on the probability of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to naive pigs via fresh meat. **EFSA J.**, n.239, p.1-85, 2005.

ELVANDER, M. et al. Nation-wide surveys of TGE/PRCV, CSF, PRRS, SVD, *L. pomona*, and *B. suis* in reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. **Vet. Rec.**, v.138, p.521-522, 1997.

FAIRBANKS, K.; CHASE, C.; BENFIELD, D.A. Tonsil biopsies and polymerase chain reaction assay for detection of breeding age gilts persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **J. Swine Health Prod.**, v.10, n.2, p.87-88, 2002.

FERRIN, N.H. et al. Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Clin Diagn Lab Immunol.** v11, n.3, p.503-14, 2004.

FIELD, A.M. Diagnostic virology using electron microscopy. **Adv. Virus Res.**, v.27, p.1-69, 1982.

FREY, M.L. et al. Recovery of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from tissues of slaughter weight pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM PRRSV, 2., 1995, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen, 1995. p.28.

GILBERT, S.A. et al. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, p.264-267, 1997.

GLOSSOP, C.E. AI in pigs: the production of quality-assured, healthy semen. **Practice**, v.4, n.20, p.182-188, 1998.

GOLDBERG, T.L. et al. Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.171-179, 2000.

GOYAL, S.M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.5, p.656-664, 1993.

GREINER, L.L.; STAHLY, T.S.; STABEL, T.J. Quantitative relationship of systemic virus concentration on growth and immune response in pigs. **J. Anim. Sci.**, n.78, p.2690-2695, 2000.

GUEGUEN, B.; AYNAUD, J.M. ; VANNIER, P. Etude de L'éclosion du virus de la maladie d'Aujeszky par les voies genitales du porc. **Récl. Méd. Vét.**, v.156, p.307-312, 1980.

HAYAT, M.A.; MILLER, S.E. **Negative staining**. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990. 253p.

HILL, H.T.; PLATT, K.B. P.R.R.S. In: DUNNE, H.W.; LEMAN, A.D. **Diseases of swine**. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.312-323.

INDIK, S. et al. Genetic variability of PRRS virus in Austria: consequences for molecular diagnostics and viral quantification. **Vet. Microbiol.**, v.107, n.3-4, p.171-178, 2005.

KATZ, D.; KOHN, A. Immunosorbent electron microscopy for detection of viruses. **Adv. Virus Res.**, v.29, p.169-194, 1984.

KIM, J. et al. Differentiation of porcine Circovírus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested Polimerase Chain reaction. **J. Virol. Methods**, v.98, p.25-31, 2001.

KRASSING, G. et al. Occurrence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Austria, a case report Auftreten des "Porcine Reproductive and Respiratory syndrome" (PRRS). **Wien. Tierarztl. Monatsschr.**, v.81, p.285-289, 1994.

KJELDSBERG, E. Use of gold IgG complexes and human antisera for electron microscopy identification of hepatitis A virus and polioviruses. **J. Virol. Methods**, v.13, p.207, 1986.

LABARQUE, G.G. et al. Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. **J. Gen. Virol.**, v.81, pt.5, p.1327-1334, 2000.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L. Pathogenesis of *in utero* infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Can. J. Vet. Res.**, v.59, p.187-192, 1995.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L.; BROCKMEIER, S.L. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. **Vet. Microb.**, v.58, p.113-125, 1997.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in packaged pig meat using virus isolation and polymerase chain reaction (PCR) method. **Vet. Microbiol.**, v.58, p.1-8, 1997.

LEE, C. et al. Characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoprotein 5 (GP5) in stably expressing cells. **Virus Res.**, v.104, n.1, p.33-38, 2004.

LE POTIER, M.F. et al. Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French 'Pays de la Loire' region. **Vet. Microbiol.**, n.55, p.355-360, 1997.

LOUVAR, J.F.; LOUVAR, B.D. **Health and environmental risk analysis: Fundamentals with applications**. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998. 704p.

MADELEY, C.R. Electron microscopy and virus diagnosis. **J. Clin. Pathol.**, v.50, p.454-456, 1997.

MAGAR, R., LAROCHELLE, R. Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. **Can. J. Vet. Res.**, v.68, p.259-266, 2004.

MARTIN, S.W. et al. **Veterinary epidemiology—principles and methods**. Iowa State University Press. Ames, IA. p.22–47 1987.

MENGELING, W.L.; PAUL, P.S.; LAGER, K.M. Virus-induced maternal reproductive failure of swine. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.203, p.1268-1272, 1993.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with PRRS virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.55, p.1391-1398, 1994.

MENGELING, W.L. et al. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. **Vet. Microbiol.**, v.49, p.105-115, 1996.

MEULENBERG, J.J.M. et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. **J. Virol.**, v.192, p.62-72, 1993.

MILLER, S.E. Diagnostic virology by electron microscopy. **ASM J.**, v.54, p.475-481, 1988.

MORENO, A.M. et al. **Colheita e processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico**. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1997. 30p.

MOUSING, J. et al. A case-control questionnaire survey of risk factors for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) seropositivity in Danish swine herds. **Vet. Microbiol.**, v.55, p.323-328, 1997.

MORTENSEN, S. et al. Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. **Prev. Vet. Méd.**, v.53, p.83-101, 2002.

NARANJO, J.Y. Informativo preliminar sobre o diagnóstico da situação do PRRS no Chile. In: CONFERENCIA VIRTUAL GLOBAL SOBRE SAÚDE DE SUÍNOS, 1., 2001, Chile. **Proceedings...** Chile, 2001a. Disponível em: <www.conferencia.uncnet.br/swine/swine.html>. Acesso em: jun. 2001a

NARANJO, J.Y. 2001b. **Comunicação pessoal.**

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

NIELSEN, T.L. et al. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vet. Microbiol.**, v.54, n.2, p.101-112, 1997.

NOWOTNY, N. et al. Serological studies in Austrian fattening pigs with respiratory disorders. **Acta Vet. Hung.**, n.42, p.377-379, 1994.

OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. porcine reproductive and respiratory syndrome.** 2006a. Disponível em: <http://www.oie.int/fr/normes/manual/a_00099.htm>. Acesso em: 10 dez. 2006.

OIE. **Codigo sanitario para los animales terrestres.** 2006b. Disponível em: <http://www.oie.int/esp/normes/mcode/_chapitre_1.3.1.htm>. Acesso em: 28 dez. 2006.

OSORIO, F. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 17., 2002, Iowa. **Proceedings...** Iowa: International Pig Veterinary Society, 2002. p.105-112.

PARK, B.K.; YOON, I.J.; JOO, H.S. Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, p.320-323, 1996.

PATON, D.J. et al. Isolation of a Lelystad virus-like agent from British pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. **Vet. Microbiol.**, v.33, p.195-201, 1992.

PATTERSON, S.; OXFORD, J.S. Analysis of antigenic determinants on internal and external proteins of influenza virus and identification of antigenic subpopulations of virions in recent field isolates using monoclonal antibodies and immunogold labelling. **Arch. Virol.**, v.88, p.189, 1986.

PESCH, S.; MEYER, C.; OHLINGER, V.F. New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). **Vet. Microbiol.**, v.107, p.31-48, 2005.

PIRTLE, E.C.; BERAN, G.W. Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the presence of fomites commonly found on farms. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, p.390-392, 1996.

PLANA DURAN, J. et al. PRRS ("Mystery Swine Disease")- summary of the work conducted by our group. **Am. Assoc. Swine. Pract. Newsl.**, v.4, p.16-18, 1992.

PORKWORLD. **Plantel suíno brasileiro ultrapassou os 34 milhões**. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.porkworld.la/busca/noticias>>. Acesso em: 22 dez. 2006.

PRIETO, C. et al. Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vet. Rec.**, v.138, p.536-539, 1996.

PRIETO, C. et al. Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Theriogenology**, v.47, p.647-654, 1997.

ROWLAND, R.R. et al. The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. **J. Virol.**, v.259, p.262-266, 1999.

SAYD, S. Interpretação de resultados sorológicos de suínos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUINA, 2., 2006, Campinas. **Anais...** Campinas, 2006. p.78-85.

SARUBBI, J. PRRS: **Síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos**: revisão. Disponível em: <www.suinopaulista.com.br>. Acesso em: 06 fev. 2006.

SCHEID, I.R. **Aspectos de biossegurança e de higiene associados à inseminação artificial em suínos** Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2000/5_Isabel.pdf>. Acesso em: 29 out. 2005.

SHIN, J.H. et al. Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. I. Detection of indirect fluorescent antibodies. **J. Agron. Sci.**, v.35, p.572-576, 1993.

SHIRAI, J. et al. Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.85-92, 2000.

SNIJDER, E.J.; MEULENBERG, J.M. Arteriviruses. In: KNIPE, D.M. (Eds.). **Fields virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p.1205-1220.

SOBESTIANSKY, J.; et al. **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: Art 3 impressos especiais, 464 p., 1999.

SORENSEN, K.J. et al. Blocking ELISA's for the distinction between antibodies against European and American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Vet. Microbiol.**, v.60, p.169-177, 1998.

STEFHANO, A. Diagnóstico de enfermidades de los cerdos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUINA, 2., 2006, Campinas. **Anais...** Campinas, 2006. p.86-90.

SWENSON, S.L. et al. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in semen after experimental infection in boars. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.204, p.1943-1948, 1994.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G.; POL, J.M.A. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. **Vet. Q.**, v.13, p.131-136, 1991.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1986. 280p.

TORREMORELL, M. et al. Evaluation of PRRSV outbreaks in negative herds. **Int. Pig. Vet. Soc.**, v.1, p.103-114, 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. Risk assessment guidance for superfund. Human health evaluation manual. Washington, 1989. v.1, pt.A.

VAN ALSTINE, W.G.; KANITZ, C.L.; STEVENSON, G.W. Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.5, p.621-622, 1993.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. Rio de Janeiro: Campus, 1980. 196p.

WEITZE, K.F. Trasmissible diseases by artificial insemination in pigs. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1996. p.45.

WENSVOORT, G. et al. Mystery swine disease in Netherlands: the isolation of Lelystad virus. **Vet. Q.**, v.13, p.121-130, 1991.

WILLSA, R.W. et al. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. **Vet. Microbiol.**, v.71, p.177-192, 2000.

WILLS, R.W.; OSORIO, F.A.; DOSTER, A.R. Susceptibility of selected non-swine species to infection with PRRS virus. **Proc. Am. Assoc. Swine Pract.**, p.411-413, 2000. Disponível em: <<http://www.pork.org>>. Acesso em: 29 Jan. 2007

YAEGER, M.J. et al. Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. **Swine Health Prod.**, v.1, n.5, p.7-9, 1993.

ZIMMERMAN, J. et al. Transmission of PRRS virus from convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions. **Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.**, v.4, n.4, p.25, 1992.

ZIMMERMAN, J.J. et al. Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. **Vet. Microbiol.**, v.55, p.329-336, 1997.

ZIMMERMAN, J. Epidemiologia da PRRS (Síndrome Respiratória e Reprodutiva dos Suínos). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUÍNA , 2., 2006, Campinas. **Anais...** Campinas, 2006a. p.20-33.

ZIMMERMAN, J. Pode o Brasil permanecer livre da PRRS? Análise dos fatores de riscos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUÍNA, 2., 2006, Campinas. **Anais...** Campinas, 2006b. p.43-50.

8. ANEXOS

ANEXO 1 - Instrução Normativa Nº 31, de 10 de maio de 2002, do MAPA

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 10 DE MAIO DE 2002

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art.83, inciso IV, do Regimento Interno aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998, tendo em vista o disposto na Portaria Ministerial nº 49, de 11 de março de 1987, considerando a necessidade de harmonizar Normas para importação de suínos para reprodução, procedentes de terceiros países, e o que consta do Processo nº 21000.008029/2001-07, resolve:

Art. 1º Os suínos importados deverão vir acompanhados de Certificado Zoossanitário, atestando as garantias requeridas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

§ 1º O Certificado Zoossanitário deverá ser elaborado na língua oficial do país exportador e também em português.

§ 2º O país exportador deverá submeter o modelo de certificado à aprovação prévia pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

§ 3º O Certificado Zoossanitário que acompanha os animais, por ocasião da importação, deverá estar assinado por médico veterinário oficial.

§ 4º O Certificado Zoossanitário deverá estar visado pelo consulado brasileiro, exceto quando houver dispensa desta exigência, expressa em acordo bilateral, estabelecido mediante decreto presidencial.

Art. 2º Para cada importação de suínos, é necessária a autorização prévia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. Parágrafo único. Os suínos importados poderão ser transportados somente pela rota indicada na referida autorização de importação.

Art. 3º Os suínos destinados à exportação para o Brasil serão submetidos a duas quarentenas: a primeira, no país de origem; e a segunda, no Brasil, por ocasião do ingresso.

§ 1º A quarentena no país de origem será realizada sob supervisão do Serviço Veterinário Oficial, em local aprovado por este Serviço e terá duração mínima de 28 (vinte e oito) dias.

§ 2º A quarentena no destino será realizada sob supervisão do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em local aprovado pelo mesmo e terá duração mínima de 28 (vinte e oito) dias. .

§ 3º O importador ficará como depositário dos suínos durante o período de quarentena no Brasil, sujeitando-se aos termos do art. 1265 e seguintes do Código Civil.

§ 4º Os animais serão liberados da quarentena para a propriedade de destino somente após autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Art. 4º Os suínos destinados à exportação para o Brasil serão submetidos a testes de diagnóstico, requeridos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, durante a quarentena na origem e no destino.

§ 1º No caso de algum animal resultar positivo para os testes de diagnóstico requeridos durante a quarentena de origem, todo o lote quarentenado ficará impedido de ser exportado para o Brasil.

§ 2º No caso de algum animal resultar positivo para os testes de diagnóstico requeridos durante a quarentena de destino, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento atuará de acordo com o estabelecido no Regulamento de Defesa Sanitária Animal e legislação complementar.

Art. 5º A colheita de material para realização de testes de diagnóstico, durante a quarentena na origem, será supervisionada pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador e, no destino, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Art. 6º Os testes de diagnóstico requeridos durante a quarentena na origem serão realizados em laboratório oficial ou credenciado pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador e, no destino, em laboratório oficial, credenciado ou autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Art. 7º. A certificação de país, zona ou estabelecimento livre de determinada doença será realizada de acordo com o Código Zoossanitário Internacional do Escritório Internacional de Epizootias (OIE) ou com critérios estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Art. 8º Os meios de transporte utilizados para suínos deverão estar limpos, desinfetados com produtos aprovados pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador.

Art. 9º O modelo de Certificado Zoossanitário para Exportação para o Brasil de Suínos Destinados à Reprodução ,consta como Anexo I da presente Instrução Normativa.

Art 10. As Normas para Aprovação e Funcionamento de Quarentenário para Suínos no Brasil constam como Anexo II da presente Instrução Normativa.

Art. 11. O Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, quando necessário, baixará instruções complementares a esta Instrução Normativa.

Art. 12. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA

ANEXO I**CERTIFICADO ZOOSSANITÁRIO PARA EXPORTAÇÃO PARA O BRASIL DE SUÍNOS
DESTINADOS À REPRODUÇÃO****I IDENTIFICAÇÃO DOS SUÍNOS:**

Número do animal, raça, sexo e idade.

II ORIGEM:

Nome e endereço do estabelecimento de origem.
Nome e endereço do exportador.

III DESTINO:

Nome e endereço do estabelecimento de destino.
Nome e endereço do importador.

IV INFORMAÇÕES ZOOSSANITÁRIAS

O Veterinário Oficial do país exportador certifica que os suínos identificados acima:

1. Originam-se de estabelecimento registrado no Serviço Veterinário Oficial do país exportador, que funciona sob responsabilidade de médico veterinário credenciado por este serviço.

2. Originam-se de país livre de febre aftosa, doença vesicular do suíno, peste suína africana e peste bovina, de acordo com o estabelecido no Código Zoossanitário Internacional do Escritório Internacional de Epizootias (OIE).

*** No caso de febre aftosa, aceita-se também a certificação de Zona Livre, quando reconhecida pelo OIE ou pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

3. Originam-se de uma zona não-infectada por peste suína clássica, de acordo com o estabelecido no Código Zoossanitário Internacional do OIE e com reconhecimento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

4. Originam-se de estabelecimento livre de brucelose, tuberculose e doença de Aujeszky, de acordo com o estabelecido no Código Zoossanitário Internacional do OIE e com reconhecimento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

5. Originam-se de estabelecimento onde não foi registrada a ocorrência clínica de estomatite vesicular, encefalomielite por enterovirus, gastroenterite transmissível, influenza suína, coronavírus respiratório, diarreia epidêmica, rinite atrófica progressiva, pneumonia micoplásmica (*Mycoplasma hyopneumoniae*), pleuropneumonia contagiosa suína (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), disenteria suína (*Brachyspira hyodysenteriae*) e síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS), nos últimos 12 meses que antecederam o embarque.

*** Se o país exportador for livre de alguma das doenças relacionadas nos itens 3, 4, 5, 6 ou possuir zona livre para alguma das doenças relacionadas nos itens 4, 5 e 6, o mesmo deverá obter o reconhecimento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil para tal certificação.

6. Foram isolados sob supervisão oficial, em local aprovado pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador, por um período mínimo de 28 (vinte e oito) dias. Nessa ocasião, todos os animais foram submetidos a testes de diagnóstico com resultados negativos para as seguintes doenças:

6.1 Brucelose - BBAT, teste de ELISA ou teste de Fixação do Complemento;

6.2 Tuberculose - Prova intradérmica comparada com PPD bovina e aviária, com leitura de 48 horas após a inoculação;

6.3 Peste Suína Clássica - ELISA

6.4 Doença de Aujeszky - teste de vírus neutralização ou teste de ELISA;

6.5 Síndrome Respiratória e Reprodutiva do Suíno (PRRS) - dois testes de ELISA com intervalo mínimo de 21 dias;

6.6 Gastroenterite Transmissível - teste de Vírus Neutralização ou teste de ELISA;

6.7 Encefalomielite por Enterovírus - teste de Vírus Neutralização;

6.8 Leptospirose - microaglutinação a 1:100 para *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. wolfi*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. tarassovi*, *L. bratislava* e *L. ballum* Ou Os suínos foram submetidos a dois tratamentos com di-hidroestreptomicina (25 mg/kg de peso vivo), intervalados de 14 (quatorze) dias dentro dos 28 (vinte e oito) dias que antecederam o embarque.

*** A condição de país livre, zona livre ou de estabelecimento livre de determinada doença, dispensa a realização do teste para a referida doença durante a quarentena na origem. Neste caso, o país exportador deverá obter o reconhecimento desta condição junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

7. Foram submetidos a tratamentos contra parasitas internos e externos, com produtos aprovados pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador, dentro dos últimos 5 (cinco) dias que antecederam o embarque.

***Indicar o nome do produto e a data do tratamento.

8. Não apresentaram nenhum sinal clínico de doenças transmissíveis por ocasião do embarque e estavam livres de parasitas externos.

9. Foram transportados diretamente do estabelecimento de procedência ao local de embarque, em veículo limpo e desinfetado com produtos aprovados pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador, sem manter contato com animais de condições sanitárias adversas.

ANEXO 2 - Instrução Normativa Nº 54, de 17 de junho de 2002 do MAPA**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA****INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 54, DE 17 DE DEZEMBRO DE 2002**

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 38, inciso IV, do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998, considerando o que consta do Processo nº 21000.008028/2001-54, resolve:

Art. 1º - Aprovar os requisitos zoossanitários para importação de sêmen suíno, que consta do Anexo e faz parte da presente Instrução Normativa.

Parágrafo Único. Esta Instrução Normativa não se aplica aos Estados Partes do MERCOSUL.

Art. 2º - O Departamento de Defesa Animal, quando necessário, baixará normas complementares a esta Instrução Normativa.

Art. 3º - Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA

ANEXO**REQUISITOS ZOOSSANITÁRIOS DO BRASIL PARA IMPORTAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO DE
PAÍSES QUE NÃO SEJAM PARTES DO MERCOSUL****I. CONDIÇÕES GERAIS**

1. As condições estabelecidas na presente Instrução Normativa serão requeridas para países reconhecidos pelo MAPA como livres de peste suína africana, doença vesicular do suíno, peste bovina e de febre aftosa.

2. O sêmen destinado à exportação para o Brasil deverá ser coletado em um Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) que:

2.1. esteja registrado junto ao Serviço Veterinário do país exportador;

2.2. opere sob supervisão do Serviço Veterinário Oficial do País exportador, que controle periodicamente o estado de saúde e o bem-estar dos animais, assim como os métodos utilizados para a coleta, processamento e armazenamento do sêmen, os registros efetuados e os controles sanitários realizados no CCPS;

2.3. possua equipe técnica, incluindo pelo menos um médico veterinário credenciado pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador;

2.4. possua somente animais relacionados à produção de sêmen;

2.5. esteja isolado de estabelecimentos que criam ou que abatem suínos;

2.6. possua controle rigoroso de visitantes;

2.7. forneça roupa de proteção e botas para os funcionários que trabalham na coleta, processamento e armazenamento do sêmen;

2.8. possua instalações adequadas para alojar os doadores de sêmen por ocasião da coleta;

2.9. possua instalações separadas para realizar a coleta, processamento e armazenamento do sêmen.

3. Toda importação de sêmen suíno deverá ser previamente autorizada pelo MAPA.

4. Toda importação de sêmen suíno deverá vir acompanhada de Certificado Zoossanitário, conforme especificado a seguir:

4.1. O certificado deverá ser emitido na língua oficial do país exportador e em português;

4.2. O certificado deverá ser assinado ou endossado pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador;

4.3. O certificado deverá ser numerado e carimbado em cada página, com carimbo do Serviço Veterinário Oficial;

4.4. O modelo de certificado do país exportador deverá ser submetido previamente à aprovação do DDA/MAPA.

5. Toda colheita de material dos doadores para realização dos exames laboratoriais requeridos pelo MAPA deverá ser supervisionada pelo veterinário oficial do país exportador ou pelo veterinário responsável pelo centro de coleta.

6. Os exames laboratoriais requeridos pelo MAPA deverão ser realizados somente em laboratório aprovado pelo Serviço Veterinário Oficial do país exportador.

7. As palhetas ou ampolas de sêmen deverão ser identificadas com o número de registro, raça do doador, data de coleta e nome do CCPS.

II. CERTIFICADO ZOOSSANITÁRIO

O certificado zoossanitário que acompanha as importações brasileiras deverá estar de acordo com o modelo recomendado no Código Zoossanitário Internacional do OIE, acrescido das seguintes informações sanitárias:

A - DO PAÍS

1. Durante o período da coleta até o momento do embarque do sêmen, o país exportador encontrava-se livre de peste suína africana, doença vesicular do suíno, peste bovina e de febre aftosa, de acordo com as recomendações do Código Zoossanitário Internacional do OIE.

B - DO CENTRO DE COLETA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN (CCPS)

2. O CCPS, onde o sêmen exportado foi coletado,.

3. O CCPS, onde o sêmen exportado foi coletado, está localizado em uma zona livre de peste suína clássica, reconhecida pelo MAPA.

C- Dos doadores de Sêmen

4. Os doadores permaneceram no país exportador por um período mínimo de 60 (sessenta) dias, antes da colheita do sêmen.

5. Os doadores originam-se de estabelecimento localizado em uma zona não-infectada de peste suína clássica, de acordo com estabelecido no Código Zoossanitário Internacional do OIE.

6. Os doadores originam-se de estabelecimento livre de brucelose, tuberculose e da doença de Aujeszky, de acordo com o estabelecido no Código Zoossanitário Internacional do OIE.

7. Os doadores originam-se de estabelecimento onde a presença de estomatite vesicular, gastroenterite transmissível (TGE) ou de encefalomielite por enterovirus não foi registrada durante os 90 (noventa) dias que antecederam a coleta do sêmen.

8. Os doadores originam-se de estabelecimento livre de síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS).

9. Os doadores e os demais animais residentes no centro de coleta não apresentaram nenhum sinal clínico de doença transmissível durante os 30 (trinta) dias anteriores à coleta, na ocasião da coleta e durante os 30 (trinta) dias após a coleta do sêmen.

D - DOS TESTES DE DIAGNÓSTICO

10. Os doadores foram submetidos a testes de diagnóstico com resultados negativos para as seguintes doenças:

10.1. Brucelose - BBAT ou teste de ELISA ou teste de Fixação do Complemento, por ocasião do ingresso no CCPS e a cada 6 (seis) meses enquanto residentes.

10.2. Doença de Aujeszky - Vírus Neutralização ou ELISA, por ocasião do ingresso no CCPS e a cada 6 (seis) meses enquanto residentes.

10.3. Síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (PRRS) - teste de ELISA, no mínimo 30 (trinta) dias que antecederam a coleta do sêmen e, novamente, 15 (quinze) a 60 (sessenta) dias após a coleta.

E - DO SÊMEN

11. O sêmen foi coletado, processado e armazenado de acordo com as recomendações do Código Zoossanitário Internacional.

12. Na diluição do sêmen, foram incluídas misturas de antibióticos (penicilina, estreptomicina e polimixina), em concentrações suficientes para prevenir a presença de contaminação por agentes bacterianos.

13. O sêmen foi acondicionado em botijão limpo e desinfetado, que foi mantido por um período mínimo de 30 (trinta) dias antes do embarque, em local seguro e sob controle do veterinário responsável pelo centro de coleta.

Nota: A condição de país livre para qualquer uma das doenças relacionadas no item D.10 dispensa a necessidade da realização de testes para a respectiva doença. Nesse caso, o país exportador deverá obter o reconhecimento junto ao MAPA para tal certificação.

TRABALHO ENVIADO Á REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

ANÁLISE DO RISCO DA OCORRÊNCIA DA SÍNDROME REPRODUTIVA E RESPIRATÓRIA DOS SUÍNOS (PRRS) EM GRANJAS DE SUÍNOS TECNIFICADAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. ESTUDO DO PERFIL DESCRITIVO DA SITUAÇÃO ATUAL

SILVIO ROBERTO THIMOTEO BORGES¹

LUIZ CARLOS DE SOUZA²

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi de analisar o risco da possível ocorrência de PRRS, nos rebanhos de granjas tecnificadas de suínos do Estado de São Paulo nos anos 2005 à 2006. Estudados a totalidade de 07 (sete) granjas de suínos, as quais importaram reprodutores neste período ou que possuíam em seus plantéis reprodutores descendentes de importados de países endêmicos para PRRS. A avaliação consistiu na detecção da possível presença de anticorpos para o vírus da PRRS através de prova sorológica de ELISA, exame de PCR para confirmar ou negatizar os positivos, pesquisa da presença do vírus da PRRS pela análise por microscopia eletrônica do sêmen dos machos reprodutores destas mesmas granjas. Foram realizadas 434 provas sorológicas por meio do teste de ELISA indireto para PRRS em 228 animais, PCR das amostras positivas no ELISA INDIRETO e paralelamente Microscopia eletrônica (Contrastação Negativa) em amostras de sêmen de 53 suínos reprodutores machos. Relativamente aos resultados de provas e testes de diagnóstico, apenas 1 granja apresentou testes positivos para PRRS no ELISA indireto. Quanto as amostras de sêmen submetidas à microscopia eletrônica todas as 53 amostras resultaram como negativas para a PRRS. O resultado do teste sorológico (ELISA-PRRS em suínos reprodutores, revelaram frequência de ocorrência da PRRS igual a 0,0%. Os resultados da prova de PCR em amostras de tecidos de suínos positivos ao teste de ELISA, foram negativos indicando ausência de vírus em animais soropositivos. A técnica de microscopia eletrônica usada neste trabalho pode se tornar um instrumento valioso para o monitoramento do rebanho de suínos reprodutores importados ou material biológico importado(sêmen) para a detecção precoce da PRRS. A Vigilância Epidemiológica da VIGIAGRO somada a sorologia e microscopia eletrônica mostrou-se suficiente para prevenir o risco da ocorrência da PRRS no Estado de São Paulo.

¹ Médico Veterinário doutorando, área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, UNESP Campus de Botucatu. Médico veterinário da Coordenadoria de Defesa Agropecuária Av. Brasil, 2.340, CEP 13073-001 Campinas, SP – Brasil Fone: (19) 3241-4700 - Fax: (19) 3243-4644
silvioborgesvet@terra.com.br, sborges@cda.sp.gov.br

² Professor doutor adjunto, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, UNESP Campus de Botucatu Distrito de Rubião Júnior 18618-000 - Botucatu, SP-Brasil-Caixa-Postal: 513 Telefone: (14) 38116273 Fax: (14) 38156024: souza@fmvz.unesp.br

Termos de Indexação: risco, Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos; suínos.

ABSTRACT

The aim The objective of the present work was to analyze the risk of the possible occurrence of porcine respiratory and reproductive disease – PRRS - in the animals of most technical farms of swine, in the State of São Paulo from 2005 to 2006, the total of 07 (seven) swine farms were studied which had imported reproducers in this period or that had descending reproducers of imported breeding from countries where PRRS was endemic. The evaluation consisted of the detection of possible presence of antibodies for the PRRS virus through ELISA serologic test, PCR examination to confirm or to deny the positives, searches of PRRS virus presence using electronic microscopy analysis of semen from the reproductive males from these same farms. 434 type indirect ELISA serological tests for PRRS were done in 228 animals, PCR for Positive samples in INDIRECT ELISA and parallel electronic Microscopy (Negative Contrasting) in semen samples of 53 male reproductive swines. One farm showed positive tests for PRRS in indirect ELISA, being the positive animals had been put down and samples of their tissues were submitted to PCR test showing a negative result. Related to the semen samples all the 53 samples resulted as negative for the PRRS. The result of the serologic test(ELISA-PRRS in reproductive swines, showed occurrence frequency PRRS equals to 0.0%. The results of PCR test in swine tissue samples, which had been positive to the ELISA test had been negative indicating absence of virus in serum positive animals. The results for electronic semen microscopy in imported reproducers or their descendants from endemic countries for PRSS had been negative. The results indicate the absence of viral circulation in the studied farms. The electronic microscopy technique can become valuable for monitoring imported reproductive swine or imported biological material (semen) for early detection of the PRRS. The Epidemiologic Surveillance of VIGIAGRO along with the serologic and electronic microscopy showed to be enough to prevent the risk of the PRRS occurrence in the State of São Paulo.

Key-words: risk, porcine respiratory and reproductive disease; swines

INTRODUÇÃO

Entre as inúmeras doenças que acometem os suínos, a PRRS (Síndrome Respiratória Reprodutiva dos Suínos) é uma das mais temidas pelos criadores de suínos em face do

comprometimento da produtividade, causando elevados prejuízos econômicos à atividade suinícola de um estado ou país (Hill&Platt 1992). Caracteriza-se por alterações respiratórias (pneumonia) e reprodutivas em fêmeas reprodutoras (abortamento, repetição de cio, nascimento de fetos mumificados, natimortos, nascimento de leitões debilitados e com problemas respiratórios) causa alta mortalidade em leitões (Wensvoort et al 1991). O Agente etiológico é um vírus RNA, pertencente à família Arteriviridae e gênero Arterivirus (Beer 1999). (Figura 1) A doença foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos em 1987 e posteriormente no Canadá e Europa em 1990 (Christianson 1992).

Frequentemente, o vírus é introduzido em uma criação através de suínos infectados em decorrência da movimentação comercial desses animais entre as granjas e, na granja, dissemina-se por contágio direto. No Brasil, a PRRS não foi relatada ou descrita oficialmente a despeito dos animais geneticamente melhorados terem sido oriundos da maioria dos países europeus onde a PRRS é endêmica, com prevalência estimada da ordem de 50% em rebanhos suinícolas (Osório 2002).

Para fins de aperfeiçoamento genético dos plantéis, suinocultores brasileiros têm realizado importações de animais e/ou sêmen de suínos oriundos de países de intensa tecnologia genética, como aqueles da América do Norte e da Europa. Esse procedimento comercial pode acarretar problemas graves para a sanidade dos plantéis de suínos do Brasil que são indenes para PRRS(Zimmerman 2006).

As perdas econômicas da PRRS são decorrentes da elevada mortalidade, baixo desempenho reprodutivo, agravamento da manifestação clínica de outras doenças intercorrentes, elevados gastos financeiros com vacinas e medicamentos, diagnósticos laboratoriais e monitorias sorológicas. As perdas financeiras têm sido estimadas entre US\$ 250 a 300 por fêmea do plantel reprodutor (Ciacci-Zanella et al 2004). Objetivou-se no trabalho ,analisar o risco da ocorrência da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos em granjas de suínos tecnificadas do Estado de São Paulo que importaram reprodutores (machos e fêmeas) nos anos de 2005 e 2006 e em outras ,que possuíam em seus plantéis animais descendentes de importados. A avaliação de risco consistiu no diagnóstico de possível presença de PRRS , pela determinação da presença de anticorpos para o vírus da PRRS através de prova sorológica de ELISA e pesquisa da presença do vírus da PRRS pela análise do sêmen dos reprodutores através de microscopia eletrônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Granjas amostradas: Foram estudadas 03 granjas tecnificadas de reprodução existentes no Estado de São Paulo no período entre 2005 e 2006, as quais apresentavam risco para a PRRS identificadas por G1, G2 e G3, constituídas por reprodutores rotineiramente submetidas à monitoria sorológica para PRRS, com as seguintes características:

Granja G1*: Plantel de 570 matrizes e 6 reprodutores, repõe seu rebanho com reprodutores filhos e descendentes de importados e no período estudado adquiriu 22 reprodutores considerados como risco de terem sido expostos ao vírus da PRRS pelo fato dos ascendentes terem sido oriundos de países endêmicos para esta doença..

Granja G2*: Plantel 600 matrizes e 6 reprodutores, importadora de suínos e que adquiriu 145 animais do Canadá em 2005.

Granja G3*: Plantel de 1.800 matrizes e 12 reprodutores, adquiriu 61 reprodutores com risco de terem sido expostos ao vírus da PRRS por seus ascendentes terem sido oriundos de países endêmicos para esta doença.

*Granja GRSC (Granja Reprodutora de Suínos Certificada)

O número de animais amostrados em sorologia encontra-se na Tabela 1 e o número de reprodutores machos, amostrados em colheita de sêmen, encontra-se na Tabela 2

Granjas com centrais de inseminação artificial com reprodutores para exame de sêmen

Examinadas (07) sete Granjas com Centrais de Inseminação Artificial (CIA) localizados no Estado de São Paulo, que alojavam suínos reprodutores filhos ou descendentes de animais importados que poderiam ter apresentado risco de exposição a PRRS. (incluindo as centrais das Granjas G1;G2;G3, já mencionadas). Foram identificadas por G4; G5; G6; G7 (todas pertencentes à categoria GRSC) e com as seguintes características:

G4: Plantel de 1.000 matrizes e 16 reprodutores sendo apenas 2 (dois) descendentes de animais importados;

G5(CIA): Plantel de 32 reprodutores.

G6(CIA): Plantel de 15 reprodutores.

G7(CIA): Plantel de 28 reprodutores.

Reprodutores recém adquiridos foram mantidos em quarentena na própria granja e para a colheita de amostras de sêmen foram selecionados reprodutores ao acaso.

Amostragem de matrizes: Das 3 (três) granjas de reprodutoras foram examinadas amostras de 228 animais, tamanho estatisticamente significativo, estabelecido por critérios de amostragem segundo Thrusfield (1986) para detecção de pelo menos 1 caso de doença exótica para 95% de confiança e reprodutoras selecionadas ao acaso.

Amostragem de Reprodutores: Das 7 (sete) Centrais de Inseminação Artificial foram examinadas amostras de 53 reprodutores, estatisticamente significativo, tamanho estabelecido por critérios de amostragem segundo Thrusfield (1986).

Amostras de sangue: foram colhidas 434 amostras de sangue (9ml) por punção na veia cava cranial direita do animal, segundo Moreno et al., (1997), centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos, os soros sanguíneo (2ml), obtidos acondicionados em caixas isotérmicas sob refrigeração à temperatura de 2 a 5°C, foram enviados para os laboratórios CEPPA-SP e CEDISA-SC. Na 1ª granja foi realizada uma única colheita de 22 animais. Na 2ª granja foram realizadas 4 colheitas de sangue sendo 2 colheitas de 70 animais e 2 colheitas de 75 animais. Na 3ª granja foram realizadas 2 colheitas de 61 animais.

Amostras de sêmen: Foram colhidas 53 amostras de sêmen durante os procedimentos de rotina de obtenção de sêmen, observando as normas de manejo da Central de Inseminação segundo metodologia preconizada por Corrêa et al. (2001).

As colheitas foram realizadas em horas mais frescas do dia; respeitando-se fisiologicamente um intervalo entre colheitas dos machos.

Procedimentos: Coleta de sêmen pelo método da mão enluvada, em sala de colheita, limpa e isolada das baias normais, evitando-se assim contaminações. O sêmen foi envasado, em bisnagas plasticas de 100ml, e colocadas diretamente em geladeira equipada com termostato, com temperatura mantida entre 15 a 18 ° C.

As amostras de sêmen dos 53 reprodutores foram acondicionadas em frascos apropriados. (bisnagas plásticas com capacidade para 100 ML) e enviados em caixa de isopor ao Instituto Biológico para realização da prova de triagem por microscopia eletrônica de transmissão. Dados referentes às variáveis selecionadas para o estudo estão reunidos na Tabela 1.

O número de amostras de soros de matrizes e de sêmen nas amostras está reunido na Tabela 2.

AMOSTRAS DE TECIDOS: Foram colhidas amostras de tecido de amídalas, pulmões e linfonodos mediastínicos dos animais positivos (2) pelo teste de ELISA. As amostras de tecido (cerca de 10 gramas) foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em gelo seco. Foram colhidas 3 fragmentos, em duplicata, de cada órgão dos 2 animais soropositivos. Uma parte da amostra foi colocada em tubos contendo Trizol® (GibcoBRL) e a outra foi enviada ao laboratório congelada, embalada em sacos plásticos tipo ziploc e enviada em gelo seco. As amostras foram imediatamente enviadas ao laboratório para a realização do teste de RT-PCR para fins de averiguação dos 2 animais soropositivos para PRRS.

SOROLOGIA: para detecção de anticorpos anti-vírus da PRRS foi realizada a técnica de ELISA INDIRETO: utilizando-se o kit importado da empresa IDEXX® Laboratories ELISA HerdCheck para anticorpos para o vírus de PRRS., calculando os resultados e interpretando-os baseados na sensibilidade, especificidade e valor preditivo do teste.

ELISA INDIRETO: Teste imunoenzimático, que utiliza anti-anticorpos marcados com uma enzima para detectar anticorpos no soro teste.

Para o kit de ELISA PRRS, a nota de corte, ou seja, um ponto a partir do qual se distinguem os resultados positivos dos negativos é 0.4 e, portanto, soros com valores da razão maior que 0,400 é positivo e igual ou abaixo de 0.399 é negativo.(Sayd 2006)

PCR das Amostras Positivas no teste ELISA INDIRETO:

O RT-PCR: o RNA viral total foi preparado de amostras de animais soropositivos no teste de ELISA para PRRSV (fragmentos de órgãos). O RNA foi isolado das amostras soropositivas para anticorpos de PRRS usando o reagente Trizol® (GibcoBRL). O RNA dos órgãos dos suínos (pulmão, tonsilas, linfonodos,) mantidos previamente congelados a - 80°C (negativos) foi isolado usando métodos da extração de Chomczynski & Sacchi (1987) usando-se o thiocyanate do guanidine (Promega). A reação da transcriptase reversa e o PCR foram realizados como descritos por ALLENDE et al (2000). O RNA positivo do controle usado nestes testes era RNA extraído de PRRSV cultivado nas pilhas MARC-145 (Ciacci-Zanella et al 2004)

As reações de transcriptase reversa (RT) e de PCR utilizaram primers para a região da ORF7 (Christopher-Hennings 1995), que codifica uma proteína de nucleocapsídeo viral conservada em diferentes isolados do PRRSV.

A reação da PCR foi realizada segundo protocolo descrito por Kim et al. (2001), em ciclos de temperatura de desnaturação (95°C), de anelamento (65°C) e de extensão (72°C), por um minuto cada, com o prolongamento, por 10 minutos, da temperatura de extensão no último ciclo. A reação externa teve 35 ciclos; a interna, 30. Tanto a reação externa quanto a interna foram realizadas nas mesmas condições. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% sob luz ultravioleta. Os primeiros para a RT-PCR foram tais como os constante no Quadro 2.

Todas as amostras de RNA de amostras de tecidos suínos soropositivas, pelo teste de ELISA, foram testados individualmente. Todas as amostras resultaram negativas.

ANALISE DO SÊMEN POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

No laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Biológico as amostras foram processadas pela técnica de contrastação negativa.

Técnica de Contrastação Negativa: Esta técnica foi realizada segundo a metodologia descrita por Brenner & Horne (1959), Almeida (1980), Hayat & Miller (1990), Madeley (1997). O sêmen diluído a 1:10. (gotas de sêmen)suspenso em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0, foi colocado em contato com grades metálicas de cobre, previamente cobertas com filme de colódio e carbono, drenadas com papel filtro e contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%, pH 5,0. e finalmente analisadas ao microscópio de transmissão. Se as amostras

resultassem em suspeitas ou positivas, seriam processadas por imunomicroscopia e imunocitoquímica por imunomarcção com ouro coloidal. Pelo método da imunomarcção com ouro é possível detectar e identificar antígenos, localizar nas células infectadas estruturas induzidas por vírus, sorotipar cepas virais (Kjeldsberg, 1986) Usamos em nosso trabalho para análise da amostras de sêmen de suínos, um microscópio eletrônico da marca Philips EM-208.

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Estatística Descritiva representada pelo cálculo da proporção de reagentes com correção para a sensibilidade e especificidade da prova sorológica Thrusfield (1986), Martin et al (1987). e teste de uma proporção com aproximação normal segundo Vieira (1980).

RESULTADOS

Resultado de sorologia: Foram considerados positivos todos os soros que apresentaram relação S/P igual ou superior a 0,04 como estabelecido para o kit de ELISA PRRS, o ponto de corte é 0.4.

As amostras de soros oriundos das Granjas G1 e G2 apresentaram - se sem dificuldades de discriminação entre resultados positivos e negativos, porém a granja G3, apresentou 2 amostras soropositivas (1º teste, realizado em laboratório particular). A decisão de repetir o teste nos mesmos animais em laboratório oficial resultou em 2 soropositivos .Os resultados do diagnóstico sorológico por ELISA encontram-se resumidos nas Tabelas 3 e 4, sendo que e na Tabela 3 foram considerados para o cálculo do total, os resultados observados nos 2 testes da granja G3. Considerando tão somente os resultados positivos observados na granja G3, foi realizada correção do valor das frequências para a prova de ELISA utilizada que apresentou Sensibilidade e Especificidades iguais, respectivamente a 98% e 96% e esses valores corrigidos estão reunidos na Tabela 4.

Resultado da prova de PCR: Todas as amostras de tecidos (amídalas, pulmões e linfonodos mediastínicos) dos suínos que foram positivos à prova de Elisa apresentaram resultados negativos ao PCR.

Resultados de exames de sêmen

Todas as 53 amostras de sêmen colhidas nas diversas granjas, apresentaram resultados negativos à microscopia eletrônica de contrastação negativa (Tabela 5).

DISCUSSÃO

Algumas empresas do Brasil importam suínos reprodutores e comercializam seus descendentes para granjas localizadas em estados de maior produção suína para fins de melhoramento do material genético brasileiro. Países exportadores são, na sua maioria, da América do Norte e Europa, que apresentam alta endemicidade para PRRS (Hill & Plat 1992, Wensvoort 1991 E Christianson 1992) e o Brasil é indene para esta doença (Osorio 2002). Apesar do Brasil adotar rigorosas medidas de Vigilância Epidemiológica para prevenir o ingresso de doenças exóticas em nosso território, análise do risco se faz necessária para monitorar a situação de livre da doença. Este mesmo princípio norteou a realização da análise do risco da ocorrência da PRRS em granjas tecnificadas de suínos e em centrais de inseminação artificial do Estado de São Paulo que importaram reprodutores de ambos os sexos no ano de 2005 e naquelas que adquiriram filhos ou descendentes de importados em 2005 e 2006. Este estudo foi conduzido com base em 3 procedimentos laboratoriais representados pelo diagnóstico laboratorial indireto pela prova de ELISA-PRRS, prova de PCR em fragmentos de tecidos e Microscopia Eletrônica em amostras de sêmen. Pela observação dos resultados de sorologia reunidos na Tabela 3, poderia - se inferir que a PRRS se encontrasse presente na granja G3, comprovada por 2 repetições com frequências de positivos iguais a 0,9%. Este valor encontrado é igual ao observado por Ciacci-Zanella et al (2004) que foi de 0,9% (positivos e suspeitos), indicando ser improvável a presença do vírus da PRRS em face das características epidemiológicas da doença.

Nesta pesquisa, aprofundou-se na avaliação destas frequências percentuais obtidas introduzindo a correção para a prevalência (Thrusfield, 1986, Martin Et Al 1987) para as sensibilidades e especificidades da prova de ELISA empregada. Assim, os valores corrigidos reunidos na Tabela 4 revelam, para a granja G3, que os verdadeiros valores das estimativas do rebanho considerando separadamente as duas repetições, foi igual a 0,0%.

Pela aplicação de uma prova sorológica que apresenta sensibilidade de 98% e especificidade de 96% é esperado encontrar-se 4% de falsos positivos. O valor encontrado na 2ª repetição

deste experimento (1,6%) que é estatisticamente inferior ao valor esperado de 4%. Pode-se, inferir que a PRRS está ausente nos rebanhos estudados para o nível de rejeição estabelecido de 5%. Esta observação estatística encontra amparo nos conhecimentos da Epidemiologia da doença que revela que o vírus apresenta alta infectividade e imunogenicidade que se refletiriam em termos de elevada prevalência de animais reagentes em ausência de sintomas em se tratando de vírus de alta patogenicidade ou elevadas frequências de reagentes e de doentes em se tratando de vírus de alta patogenicidade (Torremorell 2004).

Estimadas as prevalências corrigidas das 3 granjas estudadas e considerando as 3 situações em função das duas repetições realizadas na granja G3, como apresentadas nas Tabelas 3 e 4 é lícito inferir que a PRRS encontra-se ausente nas granjas tecnificadas monitoradas/ Finalmente, em relação à sorologia empregando a prova de ELISA, pode-se inferir que não é recomendável para o diagnóstico sorológico individual, mas recomendável como prova de triagem e de aplicação em populações animais requerendo cautela em sua aplicação e interpretação. Poder-se-ia eventualmente aventar a hipótese do Serviço Oficial interpretar os resultados globais a cada momento e não interferir quando de ocorrência de situações de conflito quando um Médico Veterinário Responsável se depara com resultados de interpretação que exige conhecimento de Epidemiologia e de Validação de Métodos de Diagnóstico.

Os resultados negativos pela prova de PCR comprovam a ausência do PRRSV, nas amostras soropositivas no teste ELISA indireto.

A técnica de contrastação negativa para microscopia eletrônica de transmissão usada neste trabalho (microscopia do sêmen de suíno) visando a detecção da morfologia viral, é um dos métodos mais usuais para o diagnóstico de viroses, quando o número de partículas víricas em uma amostra é muito baixo, (Almeida 1987, Doane & Anderson 1987, Miller 1988) .Os resultados negativos pela prova microscopia eletrônica de sêmen dos reprodutores suínos, não somente confirmam a ausência de atividade viral em rebanhos de suínos de granjas tecnificadas monitoradas,mas comprova ser um método de diagnóstico (triagem) eficaz para detectar a presença de vírus,quando estiverem presentes, em materiais como o sêmen.

CONCLUSÕES

A prova de Elisa indica não ser recomendada para o diagnóstico individual da PRRS. Este resultado revela também que a Vigilância Epidemiológica da VIGIAGRO tem sido suficiente para prevenir a entrada do vírus da PRRS em nosso território. A vigilância periódica da PRRS indica ser um instrumento valioso, para o monitoramento do rebanho de suínos reprodutores importados, para a detecção precoce da doença caso seja introduzida. O uso da microscopia eletrônica na análise do sêmen de reprodutores importados de países endêmicos para PRRS pode ser um instrumento muito útil para a verificação da presença de vírus (vírus da PRRS) nesse tipo de material. Os resultados negativos obtidos neste experimento frente aos testes de PCR e microscopia eletrônica obtidos neste experimento confirmaram que a correção da prevalência é um procedimento epidemiológico indicado para a interpretação final de vigilância de doenças em populações. A análise do risco da ocorrência da PRRS no estado de São Paulo realizada neste estudo por iniciativa não governamental, poderá servir como um exemplo aos órgãos de defesa agropecuária, objetivando como finalidade de realizarem testes laboratoriais de diagnóstico periodicamente para a comprovação do status de livre da presença do PRRS.

REFERÊNCIAS

- Allende, R. et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J. Gen. Virol.*, v.80, p.307-315, 1999.
- Allende, R. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in Individual pigs upon experimental infection. *J. Virol.*, v.74, n.22, p.10834-10837, 2000.
- Almeida, J.D. Practical aspects of diagnostic electron microscopy. *Yale J. Biol. Med.*, v.53, p.5-18, 1980.
- Almeida, J.D. Uses and abuses of diagnostic electron microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v.104, p.147-158, 1983.
- Beer, J. Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: Roca, 1999. 837p.
- Boom, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.3, p.495-503, 1990.
-

-
- Brenner, S.; HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, v.34, p.103, 1959.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, v.162, p.156-159, 1987.
- Christianson, W.T. et al. Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.485-488, 1992.
- Christopher-Hennings, J. et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.7, p.456-464, 1995.
- Ciacchi-Zanella, J.R. et al. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. *Ciênc. Rural*, v.34, n.2, p.449-455, 2004.
- Corrêa, N.M. et al. Inseminação artificial em suínos. Pelotas: Printpar, 2001. 124p.
- Doane, F.W.; Anderson, M. Electron microscopy in diagnostic virology: a practical guide and atlas. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 178 p.
- Gilbert, S.A. et al. Typing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses by a multiplex PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.35, p.264-267, 1997.
- Hayat, M.A.; Miller, S.E. Negative staining. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990. 253p.
- Hill, H.T.; Platt, K.B. P.R.R.S. In: DUNNE, H.W.; LEMAN, A.D. Diseases of swine. 7.ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. p.312-323.
- Kim, J. et al. Differentiation of porcine Circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested Polymerase Chain reaction. *J. Virol. Methods*, v.98, p.25-31, 2001.
- Kjeldsberg, E. Use of gold IgG complexes and human antisera for electron microscopy identification of hepatitis A virus and polioviruses. *J. Virol. Methods*, v.13, p.207, 1986.
- Madeley, C.R. Electron microscopy and virus diagnosis. *J. Clin. Pathol.*, v.50, p.454-456, 1997.
- Martin, S.W. et al. Veterinary epidemiology—principles and methods. Iowa State University Press. Ames, IA. p.22–47 1987.
- Miller, S.E. Diagnostic virology by electron microscopy. *ASM J.*, v.54, p.475-481, 1988.
- Moreno, A.M. et al. Colheita e processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico. Concórdia: EMBRAPA-CNPSA, 1997. 30p.
-

Osório, F. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 17., 2002, Iowa. Proceedings... Iowa: International Pig Veterinary Society, 2002. p.105-112.

Sayd, S. Interpretação de resultados sorológicos de suínos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUINA, 2., 2006, Campinas. Anais... Campinas, 2006. p.78-85.

Thrusfield, M. Veterinary epidemiology. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1986. 280p.

Torremorell, M. et al. Evaluation of PRRSV outbreaks in negative herds. Int. Pig. Vet. Soc., v.1, p.103-114, 2004.

Vieira, S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro: Campus, 1980. 196p.

Wensvoort, G. et al. Mystery swine disease in Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Q., v.13, p.121-130, 1991.

Zimmerman, J. Pode o Brasil permanecer livre da PRRS? Análise dos fatores de riscos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO SUINA, 2., 2006, Campinas. Anais... Campinas, 2006. p.43-50.

Abreviaturas e Siglas

MAPA = Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

SDA = Serviço de Defesa Agropecuária

OIE = Escritório Internacional de Epizootias(Organização Mundial de Saúde Animal)

CCPS= Centro de Coleta e Processamento de Sêmen

SAA = Secretaria da Agricultura e Abastecimento

GRSC = Granja de Reprodutores Suídeos Certificada

PCR = Reação em Cadeia de Polimerase

ELISA = Enzime Linked Imuno Sorbent Assay

PRRSV = Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos

IN = Instrução Normativa

RPM = rotações por minuto

CIA = Central de Inseminação Artificial

CIAs = Centrais de Inseminação Artificial

VIGIAGRO= Serviço de Gestão da Vigilância Agropecuária. - Trânsito Internacional de Animais e de Produtos Agropecuários

Tabela 1 – Freqüências segundo a variável e ano. São Paulo, 2007.

Variável	ANO		Total
	2005	2006	
Nº granjas importadoras	01	-	01
Nº granjas c/ filhos ou descendentes de importados	01	06	07
Nº animais examinados	145	83	228
Nº amostras examinadas	290	144	434
Nº animais importados	145	-	145
Nº granjas importadoras	01	-	01

Tabela 2 – Nº de amostras de soro e de sêmen segundo a granja ou Central de Inseminação. São Paulo, 2007.

	Identificação	Nº animais amostrados sorologia	Nº amostras sêmen	Nº amostras soro
Granja	G1	22	2	22
	G2*	145**	16	290
	G3	61	8	122
Granja-CIA	G4	-	2	
	G5	-	6	
	G6	-	15	
	G7	-	4	
	7	228	53	434

* 2 importações

** 2 sorologias

Tabela 3 – Resultados de sorologia para PRRS em reprodutoras suínas importadas e filhos ou descendentes de importados segundo a granja e número de animais examinados. São Paulo, 2007.

Granja	Colheita sangue	Nº de animais na amostra	Resultado					
			Positivo		Suspeito		Pos. + Susp	
			Freq.	%	Freq.	%	Freq.	%
G1	Única	22	0	0,0	0	0,0	0	0,0
G2	2 importações	145	0	0,0	0	0,0	0	0,0
G3*	1ª repetição	61	1	1,6	1	1,6	2	3,3
	2ª repetição	61	2	3,3	0	0,0	2	3,3
Total**	4	228	2	0,9	1	0,4	2	0,9

* granja submetida a 2 testes sucessivos em razão do 1º resultado

** foram considerados os resultados da segunda repetição da G3

Tabela 4 – Resultados de frequências corrigidas (THRUSFIELD, 1986) de positivos à sorologia para a Sensibilidade (98%) e Especificidade (96%) do teste de ELISA para granja G3 e número de animais examinados. São Paulo, 2007.

Granja	Colheita sangue	Nº de animais na amostra	Resultado Positivo		
			Freq.	% Observada	% Corrigida
G1	Única	22	0	0,0	-
G2	2 importações	145	0	0,0	-
G3	1ª repetição	61	1	1,6	0,0
	2ª repetição	61	2	3,3	0,0
Total	4	228	2	0,9	0,0

Tabela 5 - Resultados de Microscopia eletrônica (Contrastação Negativa) para o vírus da PRRS em sêmen de suínos doadores descendentes de animais importados, segundo a granja e número de amostras examinadas. São Paulo, 2007.

GRANJA	Nº de amostras de sêmen examinadas	% de amostras positivas PRRSV nas diversas Granjas
G1	2	0 %
G2	16	0%
G3	8	0%
G4	2	0%
G5	6	0%
G6	15	0%
G7	4	0%
TOTAL	53	0%

Quadro 2 - Sequência de “primers” descritos para detecção de Vírus da PRRS

Adaptado de Gilbert et al. 1997,São Paulo 2007.

Tipos de Primers -	Posição no Genoma	Sequências - vírus PRRS
EU (Amostra americana)	8628-8645	CTCCTGTATGAACTTGC
ED (Amostra Européia)	8863-8882	CAGCTCAAGTTCGAGGACCT
