



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO PARA O CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (PCV-2) EM  
MATRIZES SUÍNAS SUBCLINICAMENTE INFECTADAS”**

**RICARDO TESCHE LIPPKE**

**PORTO ALEGRE**

**2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“AVALIAÇÃO DA VACINAÇÃO PARA O CIRCOVÍRUS SUÍNO 2 (PCV-2) EM  
MATRIZES SUÍNAS SUBCLINICAMENTE INFECTADAS”**

**Autor: Ricardo Tesche Lippke**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutorem  
Ciências Veterinárias da Faculdade de  
Veterinária da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul**

**Orientador: Prof. Dr. David Emilio Santos  
Neves de Barcellos**

**Coorientadores: Karine Ludwig Takeuti  
Rafael da Rosa Ulguim**

**PORTO ALEGRE**

**2024**

## CIP - Catalogação na Publicação

Lippke, Ricardo T

Avaliação da vacinação para o circovírus suíno 2 (PCV-2) em matrizes suínas subclínicamente infectadas / Ricardo T Lippke. -- 2024.

63 f.

Orientador: David Emílio Santos Neves de Barcellos.

Coorientadores: Karine Ludwig Takeuti, Rafael da Rosa Ulguim.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. qPCR para o PCV-2 através de soro de cordão umbilical. 2. Sorologia de matrizes para o PCV-2. 3. Vacinação de matrizes para o PCV-2. I. Barcellos, David Emílio Santos Neves de, orient. II. Takeuti, Karine Ludwig, coorient. III. Ulguim, Rafael da Rosa, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Título:** “Avaliação da vacinação para o circovírus suíno 2 (PCV-2) em matrizes suínas subclínicamente infectadas”

**Executor:** Ricardo Tesche Lippke

**Orientador:** Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos

**Coorientadores:** Karine Ludwig Takeuti, Rafael da Rosa Ulguim

Defesa da tese defendida em 28 de março de 2024, em banca composta por:

---

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Roberto Maurício Carvalho Guedes  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. David Driemeier  
Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Ana Paula Mellagi  
Membro da Comissão

---

Dra. Laura Lopes Almeida  
Membro da Comissão

Porto Alegre, 28 de março de 2024

## AGRADECIMENTOS

Primeiro agradecer a Deus pela minha vida e ao meu orientador espiritual pelas oportunidades geradas que me dão a chance de ser uma pessoa cada dia melhor.

Aos meus pais por me fornecerem educação de qualidade, amor e ensinamentos sem nunca me cobrar ou reclamar de nenhum esforço. Amo muito vocês.

À minha esposa Deyse que me apoiou sempre em todas as coisas que eu decidi fazer e que algumas vezes passavam por sacrifícios dentro do casal. Sem todo esse apoio dificilmente eu teria chegado até aqui. Amo-te muito!!!

À Boehringer Ingelheim em nome do meu chefe Abílio Alessandri que quando eu disse que gostaria de fazer o doutorado me apoiou desde o início.

À todas as pessoas que me ajudaram e me fizeram persistir no doutorado, em especial à Elisa de Conti que sempre facilitou tudo, Rafael Ulguim que sempre me ajudou em assuntos complexos como a estatística e à Karine Takeuti pelas orientações e correções de artigos científicos.

Ao meu orientador e amigo David Barcellos que me inspirou muito em toda a minha trajetória profissional, além disso, é um exemplo de humildade a ser seguido.

À todas as pessoas que trabalham comigo que fizeram parte das publicações e da geração de todos os dados (Tati, Lu, Angélica, Fernando, Juliana e Elisa)

Às empresas BRF (Luciana Foppa e Ricardo Spielmann), Alibem (Daniel Schneider), Master (Mônica Santi) e Pamplona (Yuso Tutida) que autorizaram a realização das coletadas de material para geração dos dados do primeiro artigo.

À BRF regional Lucas do Rio Verde – MT em nome do Ricardo Spielmann e toda a sua equipe por me autorizar a rodar um experimento em uma granja de sua integração e por sempre oferecer ajudar, independente da complexidade que a operação dependesse.

À granja 6 amigos em Tapurah – MT em nome do amigo Rafael Otonelli que sempre me ajudaram na execução do segundo artigo, além de me fornecer moradia e todo apoio necessário.

## RESUMO

Após o lançamento de vacinas comerciais frente o Circovírus Suíno 2 (PCV-2) com o foco apenas em leitões, uma redução significativa na vacinação de matrizes nas granjas foi observada. Conseqüentemente, uma alteração na epidemiologia da doença causou um aumento do número de fêmeas soronegativas potencialmente susceptíveis à infecção viral, o que favorece a transmissão intra-uterina do PCV-2. Considerando a importância das matrizes na epidemiologia da infecção pelo PCV-2, esse projeto teve dois objetivos principais: o primeiro, avaliar a frequência de leitões virêmicos, recém-nascidos e do status imunitário das matrizes frente o PCV-2 e, o segundo, avaliar diferentes protocolos de vacinação para o PCV-2 em matrizes utilizando parâmetros reprodutivos, virológicos e sorológicos. O primeiro estudo utilizou *pool* de 3 – 4 amostras de soro de cordão umbilical (PUCS) por leitegada, para quantificar o DNA viral através da técnica de qPCR e o soro de matrizes para realização da sorologia para PCV-2 através da técnica de ELISA de 18 granjas comerciais sem sinal clínico de PCVAD. A maioria das granjas (94,4%) apresentou ao menos um PUCS positivo sendo que 17,29% de todas as amostras coletadas foram positivas para o PCV-2 com a carga viral média de  $10^{3,6}$  cópias genômicas/ml. Uma pequena porcentagem de todas as matrizes foi soronegativa (5,2%) distribuídas em 44,4% das granjas, comprovando uma subpopulação de animais soronegativos em granjas positivas. Uma maior porcentagem de matrizes soronegativas foi observada em granjas com mais de 10% dos PUCS positivos para PCV-2 ( $p < 0,05$ ). Em um segundo estudo, 161 matrizes pertencentes ao mesmo grupo de cobertura de uma granja de 4400 fêmeas foram selecionadas e divididas em 3 grupos: A – matrizes que foram vacinadas com 1 dose de vacina contra o circovírus suíno 2 entre 48 – 54 dias de gestação, B- matrizes que foram vacinadas com 2 doses da vacina entre 48 – 54 e 78 – 84 dias de gestação e C - matrizes não vacinadas frente o PCV-2. Amostras de soro foram coletadas de todas as matrizes na metade da gestação e ao parto além do PUCS de todas as leitegadas para realização de perfil sorológico através da técnica de ELISA e quantificação do DNA do PCV-2 através da técnica de qPCR, respectivamente. Todos os leitões foram pesados em até 12 horas após o parto e os índices reprodutivos (nascidos vivos, natimortos, mumificados e duração do parto) registrados. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) dos índices reprodutivos entre os grupos. Uma baixa frequência (4,9%) dos PUCS foi positiva, sem efeitos dos grupos de vacinação. A grande maioria (95,1% e 98,7%) das matrizes foram soropositivas na metade da gestação e ao parto, respectivamente. Apenas ao parto, o grupo B apresentou um valor de S/P (1,86) significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo A (1,68) e C (1,61). Os resultados dos índices reprodutivos e parâmetros virológicos e

sorológicos sugerem que a granja pode ser classificada como subclínicamente infectada e estável para o PCV-2, possivelmente subestimando os possíveis resultados da vacinação de matrizes para o PCV-2.

**Palavras chave** – PCV-2; qPCR; viremia; vacina.

## ABSTRACT

After the launch of commercial vaccines against PCV-2, using a vaccination protocol focused exclusively on piglets, a significant reduction in sow vaccination was observed on commercial farms. Consequently, a change occurred in the epidemiology of the disease characterized by an increase in the number of seronegative females potentially susceptible to viral infection, which indirectly caused an increase in intrauterine transmission of PCV-2. Considering the importance of sows in the epidemiology of PCV-2 infection, this project had two main objectives. The first one was to assess the frequency of viremic piglets, newborns, and the immune status of sows against PCV-2 in 18 commercial farms in Brazil. The second was to use the vaccination of sows with different protocols against PCV-2 to evaluate the effect on reproductive parameters and the virological and serological parameters. The first study used placental umbilical cord serum (PUCS) to quantify PCV-2 by qPCR and sow serum to perform the seroprofile by ELISA from 18 commercial farms with no clinical signs of PCVAD located in four Brazilian states that used PCV-2 vaccine only in piglets. A total of 94.4% of the farms had at least one positive PUCS, and 17.29% of all samples collected were positive for PCV-2, with an average viral load of  $10^{3.6}$  genomic copies/ml. A percentage of 5.2% of all sows were seronegative, distributed in 4.4% of the farms, indicating a subpopulation of seronegative animals in positive farms. A higher percentage of seronegative sows was observed in farms with more than 10% of PUCS positive for PCV-2 ( $p < 0.05$ ). In a second study, 161 dams belonging to the same breeding group of a farm of 4400 sows were selected and divided into three groups: A—sows that were vaccinated with one dose of PCV-2 vaccine between 48–54 days of gestation, B—sows that were vaccinated with two doses between 48–54 days and 78–84 days of gestation and C—sows that were not vaccinated against PCV-2. Serum samples were collected from all the sows in the mid-gestation and at farrowing for serology by ELISA. PUCS was also collected from all litters to quantify PCV-2DNA using the qPCR technique. All newborn piglets were weighed within 12 hours after farrowing, and reproductive parameters (total born liveborn, stillbirths, mummified, and farrowing duration) were recorded. The groups had no significant difference ( $p > 0.05$ ) in reproductive parameters. A total of 95.1% and 98.7% of the sows were seropositive in the mid-gestation and farrowing, respectively. Even though at farrowing, group B had a significantly higher S/P value (1.86) ( $p < 0.05$ ) when compared to group A (1.68) and group C (1.61). The results of all the parameters suggest that the farm can be classified as subclinically



infected for PCV-2, possibly underestimating the possible results of vaccination of sows for PCV-2.

**Keywords:** *PCV-2; qPCR; viremia; vaccine.*

## LISTA ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Figura 1:** Resultado da infecção causada *in utero* pelo PCV-2.....16

### CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

**Figure 1.** Frequency of PCV-2-PCR positive placental umbilical cord serum (PUCS) from litters of 18 breeding farms.....38

**Figure 2.** Average viral load of PCV-2-positive PUCS samples with standard deviation in all 18 breeding farms. The results are expressed as the log<sub>10</sub> viral copy number per milliliter of PUCS (copies/ml).....39

**Figure 3.** PCV-2 S/P values of farrowing sows (n = 538) in 18 farms. Sows were considered seropositive against PCV-2 when the S/P ratio was  $\geq 0.5$ .....40

### CAPÍTULO III – SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

**Figure 1.** Experimental study design, including sampling time points and PCV-2 vaccine/saline solution application timing; PCV-2 vaccine: 1 mlof PCV-2 Ingelvac Circoflex®.....53

**Figure 2.** PCV-2 ELISA S/P values from dams of the three experimental groups. Dams were considered seropositive against PCV-2 when the S/P value was  $\geq 0.5$ .....55

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1</b> – Doenças associadas ao Circovírus Suíno 2 (PCVAD) e suas manifestações clínicas.....	15
<b>Tabela 2</b> – Manifestação clínica da infecção intra-uterina causada pelo PCV-2 e diferentes fases de gestação.....	20
<b>Tabela 3</b> – Prevalência da doença reprodutiva associada ao PCV-2 (PCV-2 – RD) e infecção fetal pelo PCV-2 em diferentes países.....	22

### CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Table 1</b> –Description and distribution of the farms and number of sampled animals per farm.....	37
<b>Table 2</b> –Association of farms (n = 18) with litters positive for PCV-2 by porcine umbilical cord serum (PUCS) and PCV-2-seronegative sow.....	41

### CAPÍTULO III – SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Table1</b> – Reproductive parameters (mean $\pm$ SD) of the three experimental groups.....	54
---	----

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
2. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Introdução.....	15
2.2 Etiologia .....	17
2.3 Epidemiologia e Transmissão.....	17
2.4 Imunidade .....	19
2.5 Falhas reprodutivas.....	19
2.6 Diagnóstico.....	22
2.6.1 Diagnóstico da doença reprodutiva associada ao circovírus suíno 2 (PCV-2-RD).....	23
2.6.2 Diagnóstico da infecção subclínica do PCV-2 (PCV-2 –SI).....	24
2.7 Prevenção.....	24
3.CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO .....	27
2. Materials and methods.....	30
Figure 3. PCV-2 S/P values of farrowing sows (n = 538) in 18 farms. Sows were considered seropositive against PCV-2 when the S/P ratio was $\geq 0.5$ .....	41
4. CAPÍTULO III – SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO .....	43
5. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS .....	58

## INTRODUÇÃO

As falhas reprodutivas são consideradas como a principal causa de descarte nos plantéis produtivos podendo ser causadas por fatores infecciosos ou não infecciosos. Dentre estes se atribuem 30-40% relacionadas a agentes infecciosos e 60-70% relativos a fatores não infecciosos (MORES et al., 2011; LEFEBVRE et al., 2015). De acordo com Pieroni (2013), a mortalidade fetal é responsável pela perda de pelo menos um leitão desmamado/fêmea/ano. Sendo que tais falhas reprodutivas podem ser caracterizadas como retorno ao estro, aborto, mortalidade embrionária e fetal e são responsáveis pelo comprometimento do número de leitões nascidos vivos e desmamados fêmea/ano, logo estão diretamente ligadas ao fator econômico e sucesso da granja (ROCHA, ALBERTON & SANTOS, 2010).

Independente dos níveis tecnológicos empregados dentro do setor, tais falhas reprodutivas como mumificação e mortalidade fetal atingem 2.5% (ideal < 1.5%) (HERDT et al., 2019). Este índice tem se tornado cada vez mais importante devido à maior prolificidade das linhagens genéticas onde a menor disponibilidade de espaço uterino e contato dos embriões/fetos com a parede do útero podem prejudicar o desenvolvimento dos mesmos (PIERONI, 2013).

O Circovírus Suíno 2 (PCV-2) é reconhecido desde 1999 (WEST et al., 1999) como um agente infeccioso causador de falhas reprodutivas, a chamada doença reprodutiva associada ao PCV-2 (PCV-2-RD). As manifestações clínicas mais frequentes da PCV-2-RD incluem aumento do número de fetos natimortos, mumificados e nascimento de leitões fracos, além de morte embrionária causando aumento na taxa de retornos ao estro. Na maioria das vezes as matrizes infectadas não demonstram sinais clínicos. Uma baixa porcentagem de fêmeas pode abortar por apresentar uma doença sistêmica caracterizada clinicamente por aumento da temperatura corporal e anorexia.

O envolvimento do PCV-2 como causa de mortalidade fetal (natimortos e/ou mumificados) nas granjas é variado. No Brasil pouco são os estudos que investigaram o PCV-2 como agente etiológico do PCV-2-RD ou infecção subclínica pelo PCV-2 (PCV-2-SI). A detecção do PCV-2 em fetos natimortos e abortos foi de 5,74% (7/121) (PESCADOR et al., 2007), fetos mumificados e natimortos e 50,3% (74/146) (ROCHA, ALBERTON & SANTOS, 2010) e 87% (87/100) (HENDT et al., 2019), respectivamente.

Pleguezuelos et al. (2021) comentaram que a vacinação sistemática de leitões nas granjas causou uma redução na pressão de infecção do PCV-2. Com menos vírus circulantes, alguns animais chegam ao final do período de terminação soronegativos. Se considerarmos que esta situação pode ocorrer em leitoas de reposição, a porcentagem de animais suscetíveis na população está aumentando (SEGALES & SIBILA, 2021). Os fetos provenientes dessas fêmeas suscetíveis correm um risco maior de infecção por PCV-2 no útero ou próximo do parto, muitas vezes sem um aumento visível nos problemas reprodutivos, todavia com um aumento no nascimento de leitões virêmicos que impactam diretamente no desenvolvimento dos mesmos até o abate. Além disso, a proteção do colostro fornecida por essas fêmeas aos seus leitões é menor (ANDRAUD et al., 2009).

A presença de matrizes soronegativas no plantel que se infectam com o PCV-2 durante a gestação tem sido a hipótese mais aceitável para o aumento da prevalência do PCV-2 – SI em granjas produtoras de leitões (SEGALES & SIBILA, 2022).

A combinação desses dois fatores faz com que uma porcentagem dos leitões já esteja infectada em 3-4 semanas de vida, ou seja, na época que muitas granjas vacinam seus leitões contra o PCV-2. Nestes casos, a vacinação pode ser tardia e alguns animais desenvolvem doença clínica mais cedo (6-8 semanas de idade) ou mantêm a sua condição subclínica (PCV-2-SI) impactando no desempenho zootécnico (SEGALES, 2012).

Esses problemas não se limitam apenas aos leitões filhos de primíparas. Se coletarmos amostras de granjas de diferentes idades, veremos animais que vão de elevados títulos séricos contra o PCV-2 à completamente soronegativos, com variabilidade significativa. É o que passou a ser chamado de teoria das subpopulações, onde vemos animais suscetíveis e não suscetíveis na mesma população (FRAILE et al., 2012; OLIVER-FERRANDO et al., 2018). A vacinação de matrizes para o PCV-2 tem demonstrado ser a ferramenta mais eficaz para redução das perdas reprodutivas causadas por esse agente, apesar de poucas publicações descreverem esse benefício em condições de campo (CYBULSKI et al., 2020; PLEGUEZUELOS et al., 2021).

Dada a importância do PCV-2 na etiologia das falhas reprodutivas e do impacto da infecção subclínica no desempenho produtivo, a proposta do presente estudo foi medir o impacto de diferentes protocolos de vacinação em matrizes para o Circovírus Suíno 2 nos parâmetros reprodutivos, virológicos e sorológicos em granjas subclínicamente infectadas por esse agente (PCV-2-SI). Além disso, determinar a frequência do PCV-2-SI em granjas comerciais no Brasil.

## 2. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Introdução

A suinocultura brasileira está entre as maiores e mais importantes do mundo. Os resultados zootécnicos e custo de produção atingidos na atividade conferem ao Brasil posição de destaque. O investimento em melhorias na genética, nutrição, programas de vacinação, manejo, instalações e atualização técnica são fundamentais. Por outro lado, a globalização da atividade faz com que o Brasil corra o risco de enfrentar alguns desafios sanitários presentes na suinocultura mundial e ausentes no nosso país (ABCS, 2019).

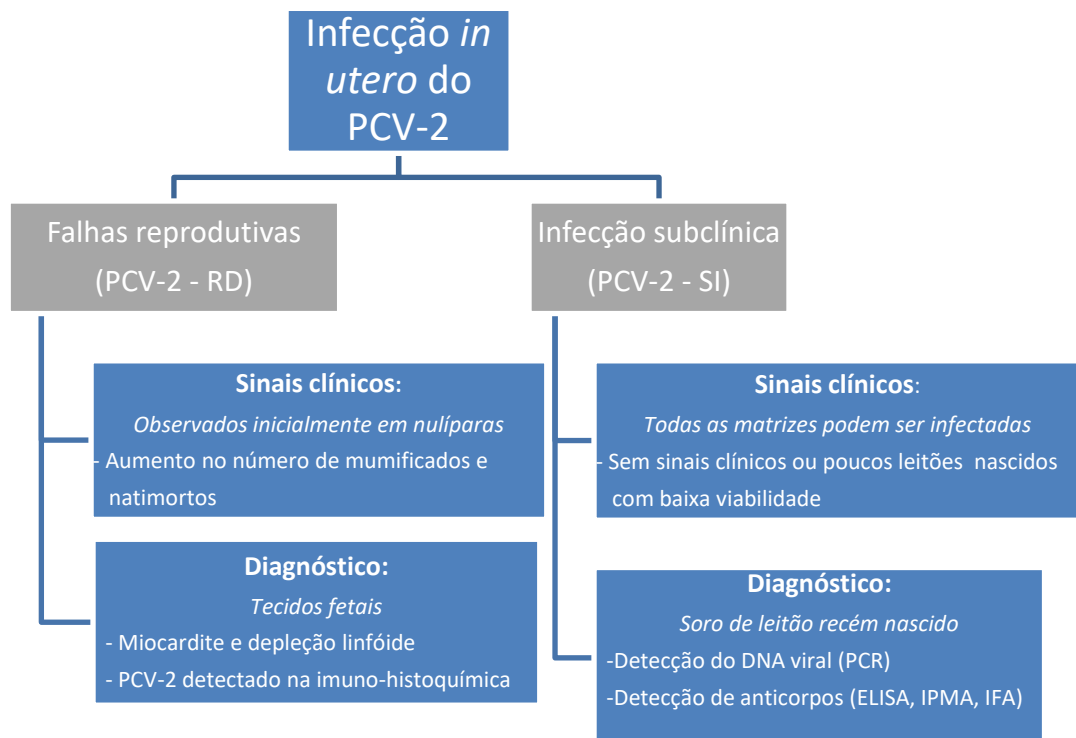
Entre os desafios já presentes no Brasil destacam-se as doenças associadas ao Circovírus Suíno 2(PCVAD) descritos na Tabela 1. Isso vem sendo complicado pelo crescente grau de variabilidade genética do agente, o que faz surgir novas variantes virais (PCV-2a,b,c,d,e,f,g,h, PCV3 e PCV4), os quais em sendo detectados progressivamente em vários países do mundo incluindo o Brasil e representam um grande desafio sanitário à produção de suínos (SEGALÉS et al., 2012). No Brasil o vírus teve seu primeiro relato no ano de 2000 no estado de Santa Catarina (ZANELLA, 2001).

**Tabela 1**–Doenças associadas ao Circovírus Suíno2 (PCVAD) e suas manifestações clínicas: Adaptado de SEGALÉS, 2012

<b>Doenças associadas ao PCV-2 (PCVD)</b>	<b>Manifestações das Doenças</b>
<b>PCV-2 - SD</b> Doença sistêmica	- Atraso no crescimento, perda de peso, palidez, sinais respiratórios ou digestivos. - Severa a moderada depleção linfocitária com inflamação.
<b>PCV-2 - LD</b> Doença Pulmonar	- Insuficiência respiratória, dispnéia. - Pneumonia linfocitocitária a granulosa ou bronco intersticial, fibroplasia peribronquilar, bronquiolite ulcerativa necrosante ou pneumonia proliferativa necrosante em ausência das lesões linfóides indicadas na doença sistêmica. - Moderada a elevada quantidade de vírus no pulmão. - Ausência de lesões nos tecidos linfóides.
<b>PCV-2 - RD</b> Doença Reprodutiva	- Abortos e fetos mumificados. - Falhas reprodutivas no final da gestação. - Miocardite fibrosa e necrosante em fetos. - Moderada a elevada quantidade de PCV-2no coração. - Retornos a estro regulares ou irregulares.
<b>PCV-2 - ED</b> Doença Entérica	- Diarreia. - Enterite granulomatosa e depleção linfocitária com inflamação granulomatosa em Placas de Peyer (mas não em outros tecidos linfóides). - Moderada a elevada quantidade de PCV-2na mucosa intestinal/ Placas de Peyer.
<b>PCV-2 - SI</b> Infecção Subclínica	- Menor ganho de peso diário (GPD) em ausência de sinais clínicos evidentes. - Lesões histológicas leves ou ausentes (principalmente em tecidos linfóides). - Baixa carga vírica em tecidos linfóides e soro.

<b>SDNP</b> Síndrome de dermatite e nefropatia suína	- Pápulas e máculas vermelhas escuras na pele, principalmente nas extremidades dos membros posteriores e região perineal - Vasculite necrosante sistêmica com glomerulonefrite necrosante ou fibrosa
--	---

O resultado da infecção *in utero* do PCV-2 em granjas produtoras de leitões foi dividida em duas manifestações denominadas falha reprodutiva (PCV-2 – RD) e infecção subclínica (PCV-2–SI) conforme está na Figura 1 (MADSON & OPRIESSNIG, 2011).



**Figura 1:** Resultado da infecção *in utero* causada pelo PCV-2: Adaptado de MADSON e OPRIESSNIG (2011)

A inclusão do PCV-2 como agente potencial em falhas reprodutivas foi iniciada após o isolamento deste agente em leitões natimortos de uma granja com histórico de baixa eficiência reprodutiva. A partir daí, diversos países diagnosticaram o PCV-2 como causador de problemas reprodutivos nas granjas (WEST et al., 1999).

No Brasil, estudos iniciais consideraram o PCV-2 como patógeno viral de pouca importância em casos de fetos natimortos, mumificados e abortados: 5,78% (7/121) (PESCADOR et al., 2007) e 0% (0/1042) (MORENO et al., 2007). Posteriormente estudos detectaram um aumento significativo na prevalência do PCV-2 em fetos mumificados e

natimortos: 50,3% (74/146) (ROCHA, ALBERTON e SANTOS, 2010) e 87% (87/100) (HERDT et al., 2019), todavia sem a comprovação que o vírus era o causador da morte fetal.

## 2.2 Etiologia

O Circovírus suíno2 faz parte da família Circoviridae. Esta família está dividida em dois gêneros: o gênero Circovírus, onde estão incluídos o Circovírus suíno1 (PCV-1), o Circovírus suíno 2 (PCV-2), o Circovírus suíno 3 (PCV-3) e o Circovírus suíno 4 (PCV-4) e o gênero Cyclovirus (TISCHER et al., 1982; ZHANG et al., 2019; ROSARIO et al., 2017).

O Circovírus suíno 2 (PCV-2) é um vírus pequeno (15-20nm), com um dos menores genomas que infectam vertebrados, icosaédrico, não-envelopado e contém fita circular simples de ácido desoxirribonucléico (TISCHER et al., 1982). O genoma do PCV-2 contém quatro genes principais, em regiões denominadas ORFs (*open reading frames* ou regiões abertas de leitura). A ORF2 codifica a proteína do capsídeo (Cap) que é responsável pela indução de anticorpos protetores (GOMES et al., 2007; JIANG et al., 2017). Recentemente, a classificação da genotipagem estendeu-se para oito genótipos, variando do PCV-2a – PCV-2h. (PARK e CHAE, 2021). No início dos anos 1990 o genótipo mais prevalente foi o PCV-2a, sendo substituído dez anos mais tarde pelo PCV-2b (SEGALES & SIBILA, 2022). No Brasil em um estudo realizado em 2019os genótipos mais importantes foram o PCV-2b e PCV-2d (NASCIMENTO et al., 2021) em concordância o que ocorre em outros países, onde esses dois genótipos são também os mais prevalentes (SIBILA et al., 2021).

Alguns trabalhos têm demonstrado sinergismo entre PCV-2 e outros agentes virais no desenvolvimento da PCV-2-SDe PCV-2 - LD, dentre os quais se destacam o parvovírus suíno, e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (ELLIS et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2000; QUINTANA et al., 2001; KIM et al., 2003; KAICHUANG et al., 2008; KRAKOWKA et al., 2008). Já no PCV-2- RD, as falhas reprodutivas associadas ao PCV-2podem ocorrer sem a participação de outros agentes infecciosos (WEST et al., 1999; SANCHEZ et al., 2001; PARK et al.,2005), entretanto, pode ser observado em alguns casos a coinfeção, principalmente com o parvovírus suíno (O’CONNOR et al., 2001; PESCADOR et al., 2004; HERDT et al., 2019).

## 2.3 Epidemiologia e Transmissão

Estudos têm demonstrado a disseminação mundial do PCV-2 na população de suínos (BARBOSA et al., 2005; GARKAVENKO et al., 2005; SEGALÉS et al., 2022). Entretanto,



vale ressaltar que o PCV-2 tem sido comum à população de suínos antes das manifestações clínicas se tornarem evidentes (MAGAR et al., 2000; ZANELLA et al., 2006).

Suínos domésticos e selvagens parecem ser os hospedeiros naturais, enquanto espécies não suídeas parecem não serem susceptíveis a infecção pelo PCV-2 (TISCHER et al., 1982; VICENTE et al., 2004). Entretanto, NAYAR et al. (1999) relataram a detecção de PCV-2 em pulmão de bovinos e fetos abortados de bovinos.

A transmissão do PCV-2 pode ocorrer de forma horizontal ou vertical (BALASCH et al., 1999; ELLIS et al., 1999; PENSAERT et al., 2004; PARK et al., 2005). A via oronasal tem sido utilizada em estudos de reprodução experimental do PCV-2-SD (BALASCH et al., 1999; ELLIS et al., 1999). O PCV-2 tem sido detectado em secreções nasais, saliva, fezes e soro de suínos, o que indica a disseminação horizontal (KRAKOWKA et al., 2000; SEGALÉS et al., 2005). MADOSN & OPRIESSNIG (2011) demonstraram que a transmissão do PCV-2 também pode ocorrer pelo leite e colostro da matriz para suas leitegadas. Entretanto, estudos têm demonstrado diferenças nas concentrações virais em animais com ou sem a manifestação clínica da PCV-2-SD. Neste sentido, SEGALÉS et al. (2012) demonstraram que a excreção viral foi significativamente maior em animais com a manifestação clínica da PCV-2 - SD. Estudos sugeriram que concentrações virais acima de  $10^7$  cópias de genoma/ml de soro são observadas em animais com a manifestação clínica do PCV-2-SD (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004). Por outro lado, animais sem manifestação clínica também podem eliminar o PCV-2 e servir como fonte de infecção para outros animais (KRAKOWKA et al., 2005; SEGALÉS et al., 2012), caracterizando a forma subclínica da doença (PCV-2-SI). É importante ressaltar que procedimentos inadequados de manejo tais como: densidade de alojamento elevada, baixa qualidade do ar, água e ração, mistura de lotes de origens diferentes podem predispor a manifestação da PCV-2 - SD e, conseqüentemente, maior excreção do PCV-2 (MADEC et al., 2000; PATTERSON et al., 2015).

A transmissão vertical também foi demonstrada, sendo que, a infecção transplacentária pode ocorrer em qualquer idade de gestação (PENSAERT et al., 2004; PARK et al., 2005). Os embriões suínos com a zona pelúcida intacta podem ser resistentes ao PCV-2, entretanto, tornam-se mais susceptíveis com o avanço dos estágios embrionários (MATEUSEN et al., 2004). O PCV-2 também foi detectado no sêmen e em oócitos de reprodutores soropositivos e clinicamente sadios (LAROCHELLE et al., 2000; BIELANSKI et al., 2004; SCHMOLL et al., 2008). GAVA et al. (2008) demonstraram que o PCV-2 pode ser transmitido pelo sêmen para matrizes e seus respectivos fetos durante a gestação.

## 2.4 Imunidade

O estudo da dinâmica da imunidade humoral passiva e ativa, bem como da imunidade celular, também é importante para compreender o potencial do PCV-2 em atravessar a barreira placentária e causar infecção em embriões e fetos. Pode haver diminuição no título de anticorpos para o PCV-2 em leitões próximo à idade de reprodução, bem como, haver viremia em leitões e matrizes soropositivas sem sinais clínicos de PCV-2 – SD (LAROCHELLE et al., 2003; CARASOVA et al., 2007; CALSAMIGLIA et al., 2007).

A imunidade passiva ao PCV-2, transmitida via colostro aos leitões, declina durante o período de lactação e de creche (LAROCHELLE et al., 2003; CARASOVA et al., 2007). Desta forma, a PCV-2 - SD não é usualmente observada em leitões com menos de quatro semanas de idade (SEGALÉS et al., 2005; CARASOVA et al., 2007). A soroconversão ativa foi observada em leitões entre oito e 15 semanas de idade (LAROCHELLE et al., 2003; CARASOVA et al., 2007). Em condições experimentais, a soroconversão ativa ocorreu entre 11 a 21 dias após a infecção (BALASCH et al., 1999; LAROCHELLE et al., 2000; CARASOVA et al., 2007).

Viremia em animais de terminação e matrizes, mesmo com altos títulos de anticorpos sem sinais clínicos de PCV-2 – SD também são observados (LAROCHELLE et al., 2003; MCINTOSH et al., 2006; CALSAMIGLIA et al., 2007).

A titulação de anticorpos anti-PCV-2, bem como a detecção de PCV-2 no soro, é variável entre matrizes num mesmo rebanho (OLIVER FERRANDO et al., 2018). A vacinação sistemática de leitões nas granjas causou uma redução na pressão de infecção do PCV-2. Com menos vírus circulantes, alguns animais chegam ao final do período de terminação soronegativos. Se considerarmos que esta situação pode ocorrer em leitões de reposição, a porcentagem de animais suscetíveis na população está aumentando (OLIVER – FERRANO et al., 2018).

Os fetos provenientes dessas fêmeas suscetíveis correm um risco maior de infecção por PCV-2 no útero. Como consequência ocorre um aumento na mortalidade fetal. Além disso, a proteção do colostro fornecida por essas fêmeas aos seus leitões é menor (PLEGUENZUELO et al., 2021).

## 2.5 Falhas reprodutivas

As falhas reprodutivas em suínos, tais como aborto, retorno ao cio, fetos natimortos e mumificados, podem ser de origem infecciosa ou não. Estas falhas de origem não infecciosa podem ser causadas, entre outras, por intoxicações e falhas nos procedimentos de manejo (HOLLER, 1994). O tamanho da leitegada e a ordem de parição da matriz também são exemplos de causas não infecciosas que podem influenciar a sobrevivência fetal (SCHNEIDER et al., 2001; VANDERHAEGE et al., 2013). Entre as causas infecciosas alguns agentes virais e bacterianos merecem destaque, como: parvovírus suíno (PPV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), vírus da doença de Aujeszky, vírus da peste suína clássica, *Leptospira* spp, *Erysipelothrix rhusiopathiae* o Circovírus suíno 3 (PCV3) (HOLLER, 1994; KIM et al., 2004; MORENO et al., 2007; SAPORITI et al., 2020). Com relação ao PCV-2, foi demonstrado que os genótipos PCV-2a, PCV-2b e PCV-2d podem ser letais aos fetos (LEFEBVRE et al. 2008; PLEGUEZUELOS et al., 2021).

A ampla disseminação do PCV-2 no mundo (SEGALÉS et al., 2005), levantou a discussão se este agente seria importante em quadros clínicos de falhas reprodutivas, uma vez que boa parte das matrizes são soropositivas (SANCHEZ et al., 2001). Dependendo da fase gestacional em que a infecção transplacentária ocorre, diferentes manifestações clínicas podem ser observadas (MADSON & OPRIESSNIG, 2011), como demonstrado no Tabela 2.

**Tabela 2.** Manifestação clínica da infecção intrauterina causada pelo PCV-2 e diferentes fases de gestação: Adaptado de MADSON & OPRIESSNIG (2011)

Fase da gestação	Manifestação clínica	Referência
Precoce (1–35 dias)	Morte embrionária	Kim <i>et al.</i> (2004)
	Retorno ao estro irregular	Mateusen <i>et al.</i> (2007)
	Pseudogestação	Josephson and Charbonneau (2001)
	Leitegadas com tamanho reduzido	West <i>et al.</i> (1999)
Intermediária (35–70 dias)	Fetos mumificados	Kim <i>et al.</i> (2004)
	Abortos	Kim <i>et al.</i> (2004)
Tardia (70–115 dias)	Fetos mumificados	Johnson <i>et al.</i> (2002)
	Fetos natimortos	O'Connor <i>et al.</i> (2001)
	Leitões nascidos com baixa viabilidade	Nielsen <i>et al.</i> (2004)
	Aumento do tempo de gestação	Ladekjær-Mikkelsen <i>et al.</i> (2001)
	Leitegadas normais	Madson <i>et al.</i> (2009a)
	Abortos	Cariolet <i>et al.</i> (2002)

Neste sentido, PENSAERT et al. (2004) demonstraram que o PCV-2 pode atravessar a barreira placentária e causar infecção em embriões ou fetos mesmo em matrizes soropositivas. Neste estudo, os autores demonstraram que o PCV-2 pode causar viremia de forma livre no plasma ou associada à célula. Os vírus que circulam livremente pelo plasma são eficientemente controlados por anticorpos maternos, enquanto na viremia de forma associada à célula, os vírus podem atravessar a placenta sem o contato com anticorpos maternos. As

chances de infecção transplacentária aumentam com a maior concentração viral, duração da viremia e virulência da amostra (PENSAERT et al., 2004).

Alguns estudos reproduziram de forma experimental a transmissão vertical e observaram abortamento (SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005). Autores relataram que o PCV-2 pode atravessar a barreira placentária em qualquer idade de gestação (KIM et al., 2004; PARK et al., 2005). MATEUSEN et al. (2007) relataram que o PCV-2 pode causar retorno ao cio, inclusive regular, quando infecções transplacentárias ocorrerem em estágios iniciais de gestação. Entretanto, Sanchez et al. (2001) não observaram interrupção da gestação após inoculação intra-fetal com o PCV-2. Estas diferenças observadas no curso da gestação podem estar relacionadas, entre outras, com a via de inoculação e a virulência das amostras.

Estudos também demonstraram o potencial do PCV-2 em causar morte fetal (SANCHEZ et al., 2001; JOHNSON et al., 2002; MATEUSEN et al., 2004; SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005). A mumificação ou natimortalidade fetal depende do período gestacional nas quais os fetos foram expostos ao PCV-2. Fetos infectados antes de 75 dias de gestação apresentaram maiores chances de mumificação fetal enquanto fetos infectados após esta idade se apresentaram natimortos ou fracos ao nascimento (SANCHEZ et al., 2001). Alguns fetos infectados durante a gestação podem nascer vivos e indicam um potencial carreador do vírus para a vida pós-natal, além de ser o disseminador do vírus na granja (SANCHEZ et al., 2001; JOHNSON et al., 2002; SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005). Entretanto, o desenvolvimento da PCV-2-SD nestes leitões fracos ao nascimento não estão determinados. Sanchez et al. (2001) relataram congestão hepática, hipertrofia cardíaca como as principais lesões macroscópicas em fetos inoculados com o PCV-2. LEFEBVRE et al. (2008), em estudo de inoculação experimental de fetos relataram diferentes lesões macroscópicas de acordo com as doses infectantes. As principais lesões histológicas em fetos infectados com o PCV-2 foram miocardite fibrosante e/ou necrosante (WEST et al., 1999; O'CONNOR et al., 2001; BRUNBORG et al., 2007) e pneumonia discreta, caracterizada por infiltrado de células mononucleares no espaço alveolar (PARK et al., 2005). Entretanto, no estudo de PARK et al. (2005), apenas 30% dos fetos natimortos de matrizes inoculadas com PCV-2 apresentaram lesões histológicas discretas no pulmão.

Segundo ALBANES (1998) exames histopatológicos em quadros de infecção viral no tecido cardíaco podem apresentar baixa sensibilidade. Os vírus podem causar insuficiência do miocárdio por dois mecanismos, efeito citotóxico direto ou de forma indireta como consequência de resposta imunológica. A gravidade da lesão cardíaca depende, entre outros, da localização e extensão. A lesão focal é bem tolerada, porém se o processo inflamatório

ocorrer nas proximidades do tecido de condução poderá ocorrer graves consequências. O autor ainda ressalta que a persistência de material genético viral tem sido demonstrada, por meio de técnicas como PCR ou hibridização “*in situ*”, na ausência de processo inflamatório e tem sido associada à evolução desfavorável da insuficiência miocárdica.

O envolvimento do PCV-2 como causa de mortalidade fetal (natimortos e/ou mumificados) nas granjas é variado como demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Prevalência da doença reprodutiva associada ao PCV-2 (PCV-2 – RD) e infecção fetal pelo PCV-2 em diferentes países. Adaptado de MADSON & OPRIESSNIG

País	Ano	Fetos (n)	Granjas	Prevalência	Referência
Brasil	2000 - 2007	1042	285	0/1042 (0%)	Moreno <i>et al.</i> (2007)
	2005–2007	121	9	7/121 (5,7%)	Pescador (2007)
	??	169	21	29/169 (17%)	Ritterbusch <i>et al.</i> (2010a)
	2006 - 2008	147	39	74/147 (50,3%)	Rocha <i>et al.</i> (2010)
	2018	100	87	87/100 (87%)	Herdt <i>et al.</i> (2019)
Canadá	1995–1998	36	29	0/36 (0%)	Bogdan <i>et al.</i> (2001)
República Tcheca	2005–2007	232	??	2005=21.7%	Zizlavsky <i>et al.</i> (2008)
				2006=42%	
				2007=54%	
Alemanha	??	210	87	57/210 (27%)	Ritzmann <i>et al.</i> (2005)
	2006–2009	788	??	128/788 (16%)	Nathues <i>et al.</i> (2010)
Coréia do Sul	2000–2002	350	321	35/350 (10%)	Kim <i>et al.</i> (2004)
México	2006–2008	269	??	100/269 (37%)	Quintero <i>et al.</i> (2010)
	??	107	??	55/107 (51%)	Enriquez <i>et al.</i> (2010)
	2015	303	9	99/303 (32,6%)	Palacios (2016)
Espanha	2002	100	100	1/100 (1%)	Maldonado <i>et al.</i> (2005)
	1999–2001	195	125	1/125 (0.8%)	Segalés <i>et al.</i> (2002)
U.S.A.	1999–2000	171	3	28/171 (16%)	Farnham <i>et al.</i> (2003)
	2009	499	5	199/499 (40%)	Shen <i>et al.</i> (2010)

No Brasil poucos são os estudos que detectaram a frequência do PCV-2 em fetos mumificados e natimortos. MORENO *et al.* (2007) realizaram estudo por meio de PCR com 1042 fetos mumificados, natimortos e abortados, sendo todas as amostras negativas para o PCV-2. Neste estudo, os agentes mais detectados foram o Parvovírus suíno (17%) seguido pela *Leptospira spp* (13%). PESCADOR *et al.* (2007) relataram 5,7% das amostras positivas ao PCV-2 do total de 121 fetos. ROCHA, ALBERTON & SANTOS (2010) detectaram 50,3% dos fetos natimortos e mumificados por meio de PCR positivos para o PCV-2 (74/146) e, finalmente, HERDT *et al.* (2019) através da PCR, detectou 87% dos fetos mumificados e natimortos positivos para o PCV-2 (87/100).

## 2.6 Diagnóstico

As falhas reprodutivas são consideradas como a principal causa de descarte nos plantéis produtivos podendo ser causadas por fatores infecciosos ou não. Dentre estes se

atribuem 30-40% relacionadas a agentes infecciosos e 60-70% relativos a fatores não infecciosos (EMBRAPA, 2011; LEFEBVRE, 2015). De acordo com Pieroni (2013) a mortalidade fetal é responsável pela perda de pelo menos um leitão desmamado/fêmea/ano.

Tais falhas reprodutivas podem ser caracterizadas como retorno ao estro, aborto, mortalidade embrionária e fetal responsáveis pelo comprometimento do número de leitões nascidos vivos e desmamados fêmea/ano, estando diretamente ligadas ao fator econômico e do sucesso da granja (ROCHA, ALBERTON & SANTOS, 2010).

Segundo MADSON et al. (2012) existe a necessidade da diferenciação entre o PCV-2 – RD e a infecção subclínica do PCV-2 – SI. Semelhante à diferenciação entre o PCV-2 – SI e o PCV-2- SD em suínos em crescimento e terminação.

### **2.6.1 Diagnóstico da doença reprodutiva associada ao circovírus suíno 2 (PCV-2-RD)**

O diagnóstico definitivo do PCV-2 – RD segue 3 critérios bem definidos: 1) sinais clínicos como aumento de fetos mumificados e/ou natimortos e/ou aumento do nascimento de leitões com baixa viabilidade, 2) Lesões microscópicas em tecidos fetais (principalmente no coração e linfonodos), e 3) Detecção do DNA do PCV-2 nos tecidos fetais através da técnica de PCR (MADSON et al. 2012; SEGALES, 2012).

A detecção do PCV-2 pela imuno-histoquímica no coração fetal é de grande valia no diagnóstico da fase aguda da PCV-2– RD; todavia a qPCR tem se mostrado um método mais sensível (HANSEN et al., 2010). Valores naqPCR acima de  $10^7$  cópias de DNA viral/500ng de tecido fetal são considerados como forte indicador de PCV-2 – RD (BRUNBORG et al., 2007; HANSEN et al., 2010) e valores acima de  $10^5$  cópias de DNA viral/500ng de tecido fetal foram encontrados em fetos com miocardite (BRUNBORG et al., 2007).

O exame histopatológico pode ser realizado em tecidos de fetos abortados e natimortos (PARK et al., 2005), desde que não apresentem estágio avançado de autólise. Entretanto, as lesões histopatológicas descritas (WEST et al, 1999; O’CONNOR et al., 2001) não são patognomônicas do PCV-2, sendo necessária a utilização de outras técnicas para confirmação. Não há um consenso na literatura sobre o órgão ou órgãos de eleição para detecção do PCV-2 em fetos, entretanto, a maioria dos estudos demonstraram o coração de fetos como o órgão de maior título viral, independente do período gestacional (SANCHEZ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2003; LEFEBVRE et al., 2008). Outros autores destacaram a miocardite como a principal lesão histopatológica em fetos (WEST et al, 1999; O’CONNOR et al., 2001; BRUNBORG et al., 2007).

Outro ponto importante no processo de diagnóstico de agentes infecciosos associados a falhas reprodutivas é o número de amostras ou fetos a serem enviados ao laboratório. É interessante enviar o maior número de fetos possíveis (abortos, natimortos ou mumificados) por leitegada e de diferentes leitegadas. A disseminação do PCV-2 no ambiente uterino pode ser lenta e nem todos os fetos de uma leitegada podem estar infectados (SANCHEZ et al., 2001; PARK et al., 2005). Fetos inferiores a 16 centímetros (medida entre a nuca e a garupa), antes da fase de imuno competência, tendem a apresentar maior título viral (SANCHEZ et al., 2001). Por outro lado, estudos comprovam a presença de DNA do PCV-2 associado a anticorpos durante a fase de imuno competência (SANCHEZ et al., 2001).

### **2.6.2 Diagnóstico da infecção subclínica do PCV-2 (PCV-2 –SI)**

A infecção subclínica do PCV-2 é diagnosticada através da detecção do DNA viral em diversos tipos de amostras: tecido fetal, preferencialmente no miocárdio, soro de leitões recém-nascidos, fluído torácico fetal, colostro, soro das matrizes e, mais recentemente, no soro de cordão umbilical (PUCS) sem a presença de lesões microscópicas ou indicativos de sinais clínicos de falha (MADSON & OPRIESSNIG, 2011; RUSTON et al. 2017; PLEGUEZUELO et al., 2021; SEGALES & SIBILA 2022).

A utilização do PUCS como amostra na detecção do DNA do PCV-2 demonstrou ter uma alta sensibilidade, semelhante ao colostro e soro de leitões recém-nascidos antes de mamar o colostro e superior ao soro das matrizes e fluídos de processamento (RUSTON et al., 2017; OCHOA et al., 2018; PERKINS et al., 2019; PLEGUEZUELO et al., 2021).

### **2.7 Prevenção**

A vacinação frente o PCV-2 é a ferramenta mais eficaz no controle da infecção por esse vírus. Todas as vacinas comerciais para o PCV-2 reduzem a viremia, infecção dos tecidos linfóides e a excreção viral (SCHEN et al., 2010; PLEGUEZUELOS et al., 2021)

A vacinação de matrizes foi proposta originalmente com o objetivo de promover a proteção do leitão através da imunidade passiva fornecida pelo colostro. Essa vacinação aumenta o nível de anticorpos séricos reduzindo a viremia pelo PCV-2 em leitões filhos de matrizes vacinadas (CYBULSKI et al., 2020).

Todavia com o passar dos anos os protocolos de imunização frente o PCV-2 focaram quase que exclusivamente na vacinação de leitões, realizada normalmente no período do desmame, resultando na redução significativa das manifestações clínicas do PCVAD e melhoria dos índices zootécnicos, além da redução da mortalidade (CYBULSKI et al., 2020).

Após o lançamento de diversas vacinas comerciais frente o PCV-2 com o protocolo de vacinação focado apenas em leitões ao desmame, uma redução significativa na vacinação de matrizes e leitoas nas granjas comerciais foi observada. A vacinação sistemática de leitões no período de desmame reduziu significativamente a pressão de infecção nas granjas, a ponto de alguns lotes de animais se tornarem soronegativos ao abate ou com um número baixo de animais soropositivos. Se a granja em questão for uma fonte de produção de leitoas de reposição para outras granjas, reprodutoras com diferente status sanitário podem ser alojadas na granja de destino causando um desequilíbrio no status imunitário dessas granjas. Esse desequilíbrio pode levar a um aumento da pressão de infecção e, conseqüentemente, a alterações de caráter reprodutivo e/ou produtivo (SEGALES & SIBILA 2022). Observações de campo indicam que a vacinação de matrizes pode apresentar um impacto positivo nos parâmetros reprodutivos mesmo em granjas endemicamente infectadas pelo PCV-2 que apresentam uma viremia baixa ou abaixo do limite de detecção pela técnica de PCR (CYBULSKI et al., 2020; PLEGUEZUELOS et al., 2021)

Todavia, a literatura é escassa ao descrever o impacto da vacinação de matrizes nos parâmetros reprodutivos e produtivos em granjas que apresentam PCV-2- RD ou PCV-2 - SI. Atualmente apenas seis publicações *peer reviewed* descreveram esse impacto utilizando diferentes vacinas e protocolos vacinais.

No primeiro estudo, matrizes foram vacinadas para o PCV-2, 4 e 2 semanas antes da inseminação artificial e 4 semanas antes do parto por um período de 14 meses. Não foi observada diferença na taxa de parto, tamanho da leitegada, taxa de mumificados e taxa de abortos quando comparada a matrizes não vacinadas. A explicação para a negatividade de efeito sugerida pelos autores foi que a granja apresentava baixa circulação de PCV-2 no seu plantel, confirmado através do qPCR no soro das matrizes ( $< 5 \times 10^5$  cópias/ml) e pelo fato de que problemas reprodutivos causados pelo PCV-2 sejam infrequentes (KURMANN et al., 2011).

No segundo estudo, a vacinação sistemática frente o PCV-2 foi realizada em matrizes por um período de três anos. A vacinação era realizada com seis e três semanas antes do parto para nulíparas e com três semanas antes do parto para fêmeas múltíparas. A granja apresentava PCV-2-RD que impactava principalmente na taxa de parto (65%). Dois anos após a implantação do protocolo de vacinação, a granja apresentou como resposta ao protocolo vacinal, 93% de taxa de parto. O número de leitões desmamado por fêmea por ano aumentou de 10,31 para 11,74 após um ano de vacinação e os leitões nascidos com menos de 1,0 kg



diminuíram significativamente. Os autores também comentaram que os índices reprodutivos se tornavam melhores a cada ciclo das fêmeas (PEJSAK et al., 2012).

No terceiro estudo as matrizes eram imunizadas com seis e três semanas antes do parto no primeiro ciclo e com duas semanas antes do parto no segundo ciclo. As matrizes vacinadas apresentaram 1,3 leitões nascidos a mais quando comparadas a fêmeas não vacinadas no segundo parto; além disso, o índice de vitalidade foi 12,7% maior nos leitões provenientes de fêmeas vacinadas. A granja utilizada não apresentava PCV-2-RD, apenas PCV-2-SI (CYBULSKI et al., 2020).

No quarto estudo, dois grupos de matrizes foram vacinadas 1 dia e 28 dias após o desmame, respectivamente, e um terceiro grupo não foi vacinado. A granja apresentava um alto status sanitário e apenas infecção subclínica para o PCV-2, sem a presença de PCV-2-RD. Os autores não encontraram diferença significativa no número de leitões nascidos vivos, taxa de natimortos e leitões nascidos com baixa viabilidade entre os grupos de matrizes vacinadas e não vacinadas (OLIVER-FERRANDO et al., 2018).

No quinto estudo, três grupos de matrizes foram vacinadas em diferentes momentos do ciclo reprodutivo e um grupo não foi vacinado. A granja apresentava apenas PCV-2– SI sem a presença de PCV-2-RD. Os grupos de fêmeas vacinadas apresentaram seus leitões com maior peso ao nascer e, ao desmame, redução da excreção viral e da viremia utilizando como amostra coletiva de PUCS para detecção de DNA viral e maiores níveis de anticorpos nas matrizes quando comparadas à fêmeas não vacinadas. A porcentagem de fetos mumificados foi significativamente ( $p < 0,05$ ) menor em matrizes vacinadas no período de lactação (1,1%) quando comparada a matrizes não vacinadas (2,2%) (PLEGUENZUELOS et al., 2021)

No sexto estudo, o principal objetivo foi avaliar o efeito nos índices produtivos, viremia e soroconversão em leitões provenientes de matrizes vacinadas comparados com matrizes não vacinadas. Leitões filhos de fêmeas vacinadas apresentaram maior peso às 25 semanas de vida ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos filhos de fêmeas não vacinadas. A granja apresentava apenas PCV-2 – SI (FRAILE et al., 2012).

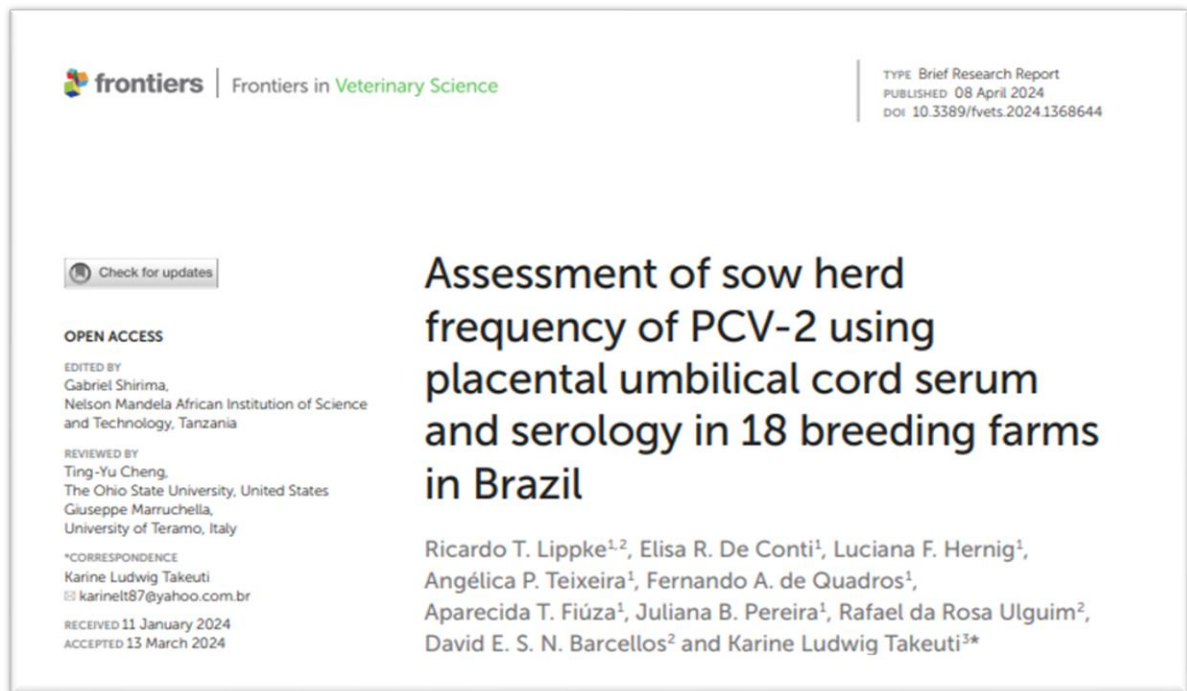
Assim, apesar de poucas publicações terem descrito o benefício da vacinação de matrizes frente o PCV-2 na melhoria de índices reprodutivos e produtivos em condições de campo, nos estudos já realizados esse protocolo tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para redução das perdas reprodutivas causadas pelo agente, além de diminuir a viremia, excreção viral pelo animal e uniformizar a imunidade do plantel, tanto em granjas com PCV-2-RD quanto naquelas com PCV-2-SI.

### **3.CAPÍTULO II – PRIMEIRO ARTIGO CIENTÍFICO**

#### **Assessment of sow herd frequency of PCV-2 using placental umbilical cord serum and serology in 18 breeding farms in Brazil**

Artigo aceito para publicação em março 2024 pela revista FRONTIERS IN VETERINARY  
MEDICINE

(abaixo a versão final aceita e escrita de acordo com as normas da revista)



## **Assessment of sow herd frequency of PCV-2 using placental umbilical cord serum and serology in 18 breeding farms in Brazil**

**Ricardo T. Lippke<sup>1,2</sup>, Elisa R. De Conti<sup>1</sup>, Luciana F. Hernig<sup>1</sup>, Angélica P. Teixeira<sup>1</sup>, Fernando A. de Quadros<sup>1</sup>, Aparecida T. Fiúza<sup>1</sup>, Juliana B. Pereira<sup>1</sup>, Rafael da Rosa Ulguim<sup>2</sup>, David E. S. N. Barcellos<sup>2</sup>, Karine Ludwig Takeuti<sup>3\*</sup>**

1 Boehringer-Ingelheim Animal Health do Brasil, São Paulo, Brazil

2 Setor de Suínos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil

### **\* Correspondence:**

Karine Ludwig Takeuti

[karinelt87@yahoo.com.br](mailto:karinelt87@yahoo.com.br)

**Keywords: PCV-2, PCR, piglet viremia, serology, swine**

## **Abstract**

Porcine circovirus 2 (PCV-2) is the agent of one of the most important diseases in the swine industry. Although it has been controlled through vaccination, viremic piglets at birth may represent a risk by reducing vaccination efficacy. Since there are few reports on the viremic status of pre-suckling piglets regarding PCV-2 infection, we assessed the PCV-2 frequency in sows housed in 18 breeding farms with no history of clinical PCVAD in Brazil, using placental umbilical cord serum (PUCS). The selection criteria were breeding farms with more than 1,000 sows; sows not vaccinated for PCV-2 at least for 2 years prior to the study; farms with no history of PCV-2 clinical disease in the last 12 months; and production systems with a maximum of two sites. Blood from the umbilical cords in sow placenta or directly from piglet's immediately after birth was collected from 30 litters on each farm for PCR. In addition, blood from 538 sows was collected for PCV-2 antibody detection. A total of 17.29% of the PUCS tested positive. The PCV-2 DNA was detected in PUCS from 94.4% of all farms. A total of 94.8% of the sow's was positive for PCV-2 antibodies. However, seronegative sows were detected in 44.4% of farms. All 18 farms had at least 46.9% seropositive dams. A higher percentage of seronegative sows was observed for farms with more than 10% of PCV-2-positive litters compared to those with  $\leq 10\%$  of PCV-2 positive litters (8.9  $\pm$  1.7% vs 1.5  $\pm$  0.7%,  $P < 0.01$ , respectively).

## **1. Introduction**

Porcine circovirus 2 (PCV-2) is one of the most economically important pathogens in the swine industry worldwide (1). This virus is endemic in pig farms and causes several clinical syndromes unified as "porcine circovirus-associated diseases" (PCVAD), encompassing porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS); PCV-2 lung disease (PCV-2-LD); PCV-2 enteric disease (PCV-2-ED); PCV-2 systemic disease (PCV-2-SD); PCV-2 reproductive disease (PCV-2-RD), and PCV-2 subclinical infection (PCV-2-SI) (1–4). The major differences between subclinical and clinical infections are the presence of clinical signs, losses in production, and the severity of lesions (5). Whilst subclinical PCV-2 infections are usually correlated with no gross findings and the absence or presence of mild microscopic lesions, clinical infections are characterized by moderate to severe lesions in the affected tissues (6).

The PCV-2-SD is one of the most common syndromes reported in the literature and has frequently been observed in the field since 2002 (2). However, the epidemiology of PCV-2 has been modified substantially, and nowadays, PCV-2-SI is the most prevalent form of manifestation due to the massive use of efficient commercial vaccines worldwide (5). According to the vaccination protocol adopted (piglets and gilts, gilts/sows only, gilts/sows and their litter vaccination, or piglets only), the PCV-2 infection dynamics probably changed in the mid–long term (5). The vaccination of gilts and sows prior to insemination is justified by evidence that piglets may become infected with PCV-2 in the uterus via transplacental infection (7–9). The progression for clinical signs of the disease in sows is dependent on a high viral replication or protracted viremia and the timing of viral infection, which can also determine the occurrence of clinical reproductive failure (10).

Additionally, piglets are frequently vaccinated at weaning to improve performance and reduce viremia, which is achieved even in the presence of maternally delivered antibodies. However, several pigs may reach the end of the finishing phase seronegative for PCV-2 if vaccination

has been performed only at weaning (11,12). In the case of multiplier farms, the absence of later vaccination could increase the chances of the emergence of subpopulations of replacement gilts with low antibody titers against PCV-2 (5). This situation can increase the prevalence of infected newborn piglets (13–16), and colostrum protection from sows to their offspring might be weak (17). A high number of pre-suckling infected piglets has been associated with a higher chance of horizontal transmission of PCV-2 among littermates, increasing the number of infected piglets at weaning. Consequently, a decrease in vaccination efficacy may be observed since the piglets would already be infected with PCV-2 at the time of vaccination. Some of them may develop the clinical disease earlier (6–8 weeks of age) or maintain a subclinical condition (PCV-2-SI), with impacts on their zootechnical performance (18–20). However, these problems are not limited to piglets born to primiparous sows.

The detection of high titers of PCV-2 antibodies or the presence of seronegative sows have been reported in sows from different parity orders (13,21). Blood sampling soon after farrowing has been used to assess PCV-2 serology in sows (10). Additionally, placental umbilical cord serum (PUCS), pre-suckling piglet serum, umbilical cord tissue, colostrum, and fetal tissues have been used to determine sow herd PCV-2 prevalence through the measure of PCV-2 viremia (8,15,22–24). The use of PUCS as a sample to detect PCV-2 has a high sensitivity, similar to that of colostrum and pre-suckling serum and higher to that of sow serum and processing fluids (23,25). PUCS was used to determine prevalence of PCV-2 infection as a diagnostic specimen in some studies (16,24) and also to evaluate the effects of sow vaccination against PCV-2 in different stages of the production cycle (22). Therefore, the aim of this study was to assess the frequency of viremic newborn piglets for PCV-2 using qPCR based on PUCS and to determine immune status of sows using serology (ELISA). Also, the relationship between seronegative sows and positive PUCS for PCV-2 in 18 breeding farms with no history of clinical PCVAD in Brazil was assessed.

## **2. Materials and methods**

The Research Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the use of animals in this study (#44611).

### **2.1 Farm selection**

A total of 18 farms (abbreviated from A-R) from four pig companies (X, Y, Z and W), located in the main Brazilian pork-producing states (26), were randomly selected for the study (5 in Mato Grosso- MT, 1 in Paraná - PR, 5 in Santa Catarina – SC, and 7 in Rio Grande do Sul - RS). All farms were selected according to the following criteria: size (> 1,000 sows); farms which had not vaccinated sows for PCV-2 for at least 2 years (except prepubertal gilts); farms with no history of clinical PCVAD in the last 12 months; farms with a maximum of two sites (sow farm or sow farm with nurseries) (Table 1). These farms represent the commonest piglet production models in Brazil. All farms presented a regular parity order distribution (PO – 1 to 12), except farm C, which had only primiparous sows, and farms A and B, which had no primiparous sows (PO from 2–12). The average weaning age varied from  $21 \pm 4$  (Company X) to  $23 \pm 4$  days (Companies Y, Z, and W). All farms were historically negative for PRRSv.

### **2.2 Sow blood collection and placental umbilical cord serum sampling**

Placental umbilical cord serum was collected directly from the placenta within 12 hours post-farrowing or directly from the umbilical cord of piglets immediately after birth and before colostrum intake. Convenience sampling was performed, in which the litters from the sows that were farrowing during the time that the farms were visited were selected. A total of three to four umbilical cords per litter (29–32/farm) were stored inside sterile tubes with clot activator to reach a volume of least 3 ml. Each tube was considered one PUCS sample. To minimize sample contamination with environmental PCV-2 DNA, all utensils (e.g., scissors) were cleaned mechanically with disposable paper, washed with water and disinfected with 70% ethanol, and gloves were changed for each PUCS sampling according to Pleguezuelos et al. (2021)(22). Additionally, blood samples were collected from 29–32 sows per farm up to 4 days after farrowing, being the sows not the same as the ones from the PUCS litters. All samples (PUCS and blood from sows) were stored at 4°C for 24 hours. Subsequently, the samples were centrifuged (3,000 rpm for 15 minutes) to obtain the serum, which was placed in 1.5-ml sterile microtubes and stored at -20°C to be tested within 30 days. A total of 1,076 samples from piglets and sows (PUCS and blood, respectively) were collected (Table 1).

## **2.3 Diagnostic test methods**

### **2.3.1 Serology**

All serum samples from sows were tested for the presence of anti-PCV-2 antibodies using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) kit (Porcine Circovirus 2 Antibody Test, BioChek B.V., Reeuwijk, Holland) according to the manufacturer's instructions. Serum samples were considered positive for the presence of PCV-2 antibodies when the S/P ratio was  $\geq 0.5$ .

### **2.3.2 PCR detection for PCV-2**

The DNA was extracted from PUCS using commercial kits (NewGenePrepAmp, SimbiosBiotecnologia, Cachoeirinha, Brazil). The PCV-2 quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using the NewGenePCVAmp kit (SimbiosBiotecnologia, Cachoeirinha, Brazil) and specific primers (32). The standard curve was generated using references with high (10,000,000 genomes/ml), low (10,000 genomes/ml), and intermediate (10,000–1,000,000 genomes/ml) load, considering a linear regression coefficient ( $R^2$ ) above 0.9. The qPCR was considered positive with a Ct value  $< 37$ . Viral titers inferred from the PCR results were expressed as the viral copy number per milliliter (copies/ml).

## **2.4 Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System – SAS® 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Descriptive analyses were carried out to present the means  $\pm$  standard error, quartiles, and frequencies of PCV-2 genome sequence and S/P values, considering all samples or by farm. The Pearson correlation (PROC CORR procedure) was applied using the farm as observational unit to associate the percentage of positive PUCS with the average S/P value of sows and the percentage of seronegative sows. Based on the median of the percentage of PUCS positive for PCV-2, the farms were classified in those with  $\leq$  or  $>$  10% of samples positive. These two classes of farms were included as fixed effect in the model (PROC GLIMMIX) to identify as outcome the percentage of sows seronegative for PCV-2 in each farm (binomial distribution) and the percentage of farms with seronegative sows for PCV-2. In the last outcome variable, the farms were classified as those with the

presence of at least one seronegative sow for PCV-2 ( $\geq 1$  sow) and those with no seronegative sow (absence) and analyzed using binary distribution.

### 3 Results

A total of 17.29% (93/538) of the PUCS showed positive ( $Ct < 37$ ) for PCV-2 by qPCR (Fig. 1). The average PCV-2 viral load was  $10^{3.6}$  (lower quartile –  $10^{3.3}$ ; upper quartile –  $10^{3.7}$ ), and the farms O ( $10^{5.9} \pm 7.3$ ), L ( $10^{5.2}$ ), and H ( $10^{4.9} \pm 1.1$ ) had the highest PCV-2 viral load (Fig. 2). The PCV-2 was detected in at least one PUCS in 94.4% of the sampled farms (17/18), with a frequency by farm ranging from 3.3% to 86.7% (Fig. 1).

A total of 94.8% (510/538) sow serum samples showed positive antibodies for PCV-2. All 18 farms had at least 46.9% of PCV-2-seropositive sows. The average S/P value was  $1.79 \pm 0.03$  (lower quartile -1.45; upper quartile -2.26), and farms P ( $2.23 \pm 0.11$ ) and F ( $2.27 \pm 0.06$ ) had the highest average serological values (Fig. 3). Seronegative sows were detected in 8 out of the 18 farms (A – 1/31; B – 2/30; D – 2/30; E – 17/32; J – 1/30; M – 3/30, N – 1/30, and Q – 1/29).

There was no correlation ( $P \geq 0.51$ ) between the percentage of litters positive for PCV-2 by PUCS with the S/P value and the percentage of sows seronegative for PCV-2 in each farm (Table 2). However, a higher percentage of seronegative sows ( $P < 0.01$ ) was observed in those farms with more than 10% of litters positive for PCV-2 by PCR ( $8.9 \pm 1.7\%$ ) compared to those with  $\leq 10\%$  of PUCS-positive litters ( $1.5 \pm 0.7\%$ ). In contrast, the frequency distribution of farms with at least one seronegative sow was not associated ( $P = 0.36$ ) with the frequency of positive PUCS ( $\leq$  or  $> 10\%$ , Table 2).

### 4 Discussion

The aim of this study was to assess the frequency of viremic newborn piglets for PCV-2 using qPCR from PUCS and to determine immune status of sows using serology (ELISA). Also, the relationship between seronegative sows and positive PUCS for PCV-2 in 18 breeding farms with no history of clinical PCVAD in Brazil was assessed.

To the best of the authors' knowledge, this is the first study regarding PCV-2 detection in PUCS in Brazil.

Based on the results, 94.8% of the sows showed PCV-2 seropositivity at sampling, and high levels of PCV-2 antibodies were detected. Since the sows enrolled in this study were vaccinated only when they were around 21 days of age, the serological response detected by ELISA could have occurred just due infection because the duration of immunity of such vaccines are considered to last around 6 months (5). Despite the high frequency of seropositive samples (94.8%), seronegative sows were detected in 8 out of the 18 farms (44%). It was demonstrated that in multiplier farms, where only piglet vaccination is used, a part of these animals may be seronegative at the end of the fattening period (12). If some of these animals eventually become replacement stock, a percentage of seronegative gilts potentially becomes susceptible to infection, generating seronegative subpopulations (13). Taking this subpopulation of seronegative sows into consideration, sow vaccination should be considered to increase immunity and decrease virus circulation since the subclinical status can easily lead to a clinical PCVAD (22,28).

Although a high proportion of sows presented antibodies against PCV-2, 94.4% of the farms presented at least one positive PUCS by PCR, with a frequency of 17.29%, reaching up to 86.67% in one of the farms. These data suggest the maintenance of the virus even in clinically stable farms (without a history of PCVAD in the last 12 months) with a high proportion of serologically positive sows. Studies performed in the USA with pre-suckling piglets showed a PCV-2 prevalence ranging from less than 10% (28) to up to 82% (15) by PCR, similar to our findings. In contrast, European studies reported no PCV-2 DNA detection in any of the pre-suckling piglets (14,16). In one of these studies (14), only sow farms with less than 1,000 sows were selected. In our study, we selected farms with more than 1,000 sows, and farm size may have contributed to our results since the larger number of animals could have increased the odds of virus survival and circulation among pigs.

The presence of pre-suckling viremic piglets has been associated with a higher chance of horizontal transmission of PCV-2 among littermates, increasing the number of infected piglets at weaning, which also increases the risk of low vaccine efficacy (10). The higher risk of reducing vaccine efficacy occurs because piglets might already be infected with PCV-2 at the time of vaccination, and some of them may develop the clinical disease earlier or maintain a subclinical condition (PCV-2-SI), which can impact the zootechnical performance (18–20). Some risk factors can also potentiate viral replication, facilitating the shift from a subclinical to a clinical condition. Some studies demonstrated that a nonspecific stimulation of the immune system, such as vaccination, combined with a preexistent subclinical and endemic PCV-2 infection, may favor the development of PCVAD (28,29). Moreover, piglets are more likely to exhibit PMWS after early infection by PCV-2 and when weaned before 21 days (19). These risk factors are common in Brazilian farms, and the association of them with the presence of pre-suckling infected piglets may reduce the efficacy of PCV-2 piglet vaccination. We did not assess the piglets of this study during the nursery and/or finishing phases and could therefore not evaluate the impact of PCV-2 detection by PUCS on performance or clinical condition in the downstream flow. However, our results suggest that this should be investigated in future studies.

A higher percentage of seronegative sows ( $P < 0.01$ ) was observed in those farms with more than 10% of litters positive for PCV-2 ( $8.9 \pm 1.7\%$ ) compared to those with  $\leq 10\%$  of PUCS-positive litters ( $1.5 \pm 0.7\%$ ). Most likely, the seronegative sows increase the frequency of infected newborn piglets (13–16), and colostrum protection from these sows to their offspring might be weakened (17).

Finally, the combined results of PUCS and serology suggest a heterogeneous immune situation of sow farms in Brazil. In this scenario, the assessment of PCV-2 infection in the early life of piglets would be important to clarify the infection dynamics in farms since the presence of pre-suckling infected piglets suggests a higher chance of the horizontal transmission of PCV-2 and/or an increased risk of low vaccine efficacy (10). The reduction in vaccination efficacy associated with risk factors can easily trigger PCVAD (19,31,32). In future studies, a longitudinal approach can be used to define the infection dynamic within the farms. Also, a more embracive study can be done with the correlation of reproductive data and PCV-2 infection dynamic. Another important pattern that could be analyzed is the impact of the prevalence within the sow farm and the impact of it in the following production stages. In conclusion, the results of our study indicate a high proportion of infected pigs showing no clinical signs on Brazilian farms, with newborn piglets detected positive for PCV-2, highlighting the need for preventive measures on these farms and on the downstream flow.

## 5 Author contributions



RL: Investigation, Methodology, Writing – original draft. EDC: Investigation, Methodology, Writing – original draft. LH: Investigation. AT: Investigation. FQ: Investigation. AF: Investigation. RU: Data curation, Statistics, Methodology, Supervision, Writing – original draft. DB: Supervision. KLT: Writing – review & editing.

## 6 Funding

The authors have received funding from Boehringer Ingelheim Animal Health Brazil.

## 7 Competing interests

The authors have declared no competing interests.

## 8 Acknowledgments

This study was supported by Setor de Suínos from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

## 9 References

- Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG. Emergence of a novel mutant PCV-2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet Microbiol* (2013) 163:177–183. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.019
- Segalés J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* (2012) 164:10–19. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007
- Rosario K, Breitbart M, Harrach B, Segalés J, Delwart E, Biagini P, Varsani A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Arch Virol* (2017) 162:1447–1463. doi: 10.1007/s00705-017-3247-y
- Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Blanchard P, Badiella L, Le Dimma M, Jestin A, Domingo M. Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res* (2004) 65:88–92. doi: 10.2460/ajvr.2004.65.88
- Segalés J, Sibila M. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. *Vet Sci* (2022) 9: doi: 10.3390/vetsci9030110
- Correa-Fiz F, Franzo G, Llorens A, Huerta E, Sibila M, Kekarainen T, Segalés J. Porcine circovirus 2 (PCV-2) population study in experimentally infected pigs developing PCV-2-systemic disease or a subclinical infection. *Sci Rep* (2020) 10:1–9. doi: 10.1038/s41598-020-74627-3
- Andraud M, Rose N, Grasland B, Pierre JS, Jestin A, Madec F. Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: A modelling approach. *Prev Vet Med* (2009) 92:38–51. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.07.009

8. Dvorak CMT, Lilla MP, Baker SR, Murtaugh MP. Multiple routes of porcine circovirus type 2 transmission to piglets in the presence of maternal immunity. *Vet Microbiol* (2013) 166:365–374. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.011
9. Rose N, Opriessnig T, Grasland B, Jestin A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2). *Virus Res* (2012) 164:78–89. doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.002
10. Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV-2) vaccination of the dam on PCV-2 replication in utero. *Clin Vaccine Immunol* (2009) 16:830–834. doi: 10.1128/CVI.00455-08
11. Feng H, Blanco G, Segalés J, Sibila M. Can Porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol* (2014) 172:92–99. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.003
12. Kristensen CS, Hjulsgaard CK, Larsen LE. A two-year follow-up study of the PCV-2 status of a Danish pig herd that was initially assumed to be PCV-2-free. *Porc Health Manag* (2015) 1:1–5. doi: 10.1186/2055-5660-1-5
13. Oliver-Ferrando S, Segalés J, Sibila M, Díaz I. Comparison of cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells between piglets born from Porcine circovirus 2 vaccinated and non-vaccinated sows. *Vet Microbiol* (2018) 214:148–153. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.12.011
14. Eddicks M, Koeppen M, Willi S, Fux R, Reese S, Sutter G, Stadler J, Ritzmann M. Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. *Vet Microbiol* (2016) 187:70–74. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.03.010
15. Shen H, Wang C, Madson DM, Opriessnig T. High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. *Prev Vet Med* (2010) 97:228–236. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.09.020
16. Dieste-Pérez L, van Nes A, van Maanen K, Duinhof T, Tobias T. The prevalence of PCV-2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. *Prev Vet Med* (2018) 153:42–46. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.03.001
17. Kurmann J, Sydler T, Brugnera E, Buergi E, Haessig M, Suter M, Sidler X. Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clin Vaccine Immunol* (2011) 18:1644–1649. doi: 10.1128/CVI.05183-11
18. Andraud M, Grasland B, Durand B, Cariolet R, Jestin A, Madec F, Pierre JS, Rose N. Modelling the time-dependent transmission rate for porcine circovirus type 2 (PCV-2) in pigs using data from serial transmission experiments. *J R Soc Interface* (2009) 6:39–50. doi: 10.1098/rsif.2008.0210
19. Rose N, Eveno E, Grasland B, Nignol AC, Oger A, Jestin A, Madec F. Individual risk factors for Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs: A hierarchical Bayesian survival analysis. *Prev Vet Med* (2009) 90:168–179. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.04.010

20. Yu S, Opriessnig T, Kitikoon P, Nilubol D, Halbur PG, Thacker E. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. *Vet Immunol Immunopathol* (2007) 115:261–272. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.11.006
21. Fraile L, Sibila M, Nofrariás M, López-Jimenez R, Huerta E, Llorens A, López-Soria S, Pérez D, Segalés J. Effect of sow and piglet porcine circovirus type 2 (PCV-2) vaccination on piglet mortality, viraemia, antibody titre and production parameters. *Vet Microbiol* (2012) 161:229–234. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.021
22. Pleguezuelos P, Sibila M, Cuadrado R, López-Jiménez R, Pérez D, Huerta E, Llorens AM, Núñez JI, Segalés J, López-Soria S. Exploratory field study on the effects of porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination at different physiological stages mimicking blanket vaccination. *Porc Heal Manag* (2021) 7:1–12. doi: 10.1186/s40813-021-00213-2
23. Ruston C, Pittman JS. Evaluation of methods for determining the porcine circovirus type 2 status of sow herds. *Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*. (2017). p. 77–78
24. Fan M, Bian L, Tian X, Hu Z, Wu W, Sun L, Yuan G, Li S, Yue L, Wang Y, et al. Infection characteristics of porcine circovirus type 2 in different herds from intensive farms in China, 2022. *Front Vet Sci* (2023) 10: doi: 10.3389/fvets.2023.1187753
25. Baumert D, Fangman T, Rustvold J. Comparing Placenta and Presuckle piglet PCV-2 status between two breeding sites. *Allen D. Leman Swine Conference*. (2013). p. 8290
26. ABPA. *Relatório Anual 2022*. (2022). 144 p.
27. Knox A, Ochoa L, Greiner L. Correlating sampling methods to porcine circovirus type 2 (PCV-2) viremia status of sows and piglets in a sow herd with or without PCV-2 revaccination during gestation. *Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*. (2017). p. 69–71
28. Ochoa L, Greiner L, Connor J, Waddell J, Fano E. Short summary on the low prevalence of PCV-2 on pigs at birth. *Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*. (2018). p. 2017–2018
29. Opriessnig T, Yu S, Gallup JM, Evans RB, Fenaux M, Pallares F, Thacker EL, Brockus CW, Ackermann MR, Thomas P, et al. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet Pathol* (2003) 40:521–529. doi: 10.1354/vp.40-5-521
30. Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV 2). *Vet Pathol* (2001) 38:31–42. doi: 10.1354/vp.38-1-31
31. Hoogland MJ, Opriessnig T, Halbur PG. Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *J Swine Heal Prod* (2006) 14:133–139.
32. Kyriakis SC, Saoulidis K, Lekkas S, Miliotis CC, Papoutsis PA, Kennedy S. The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning

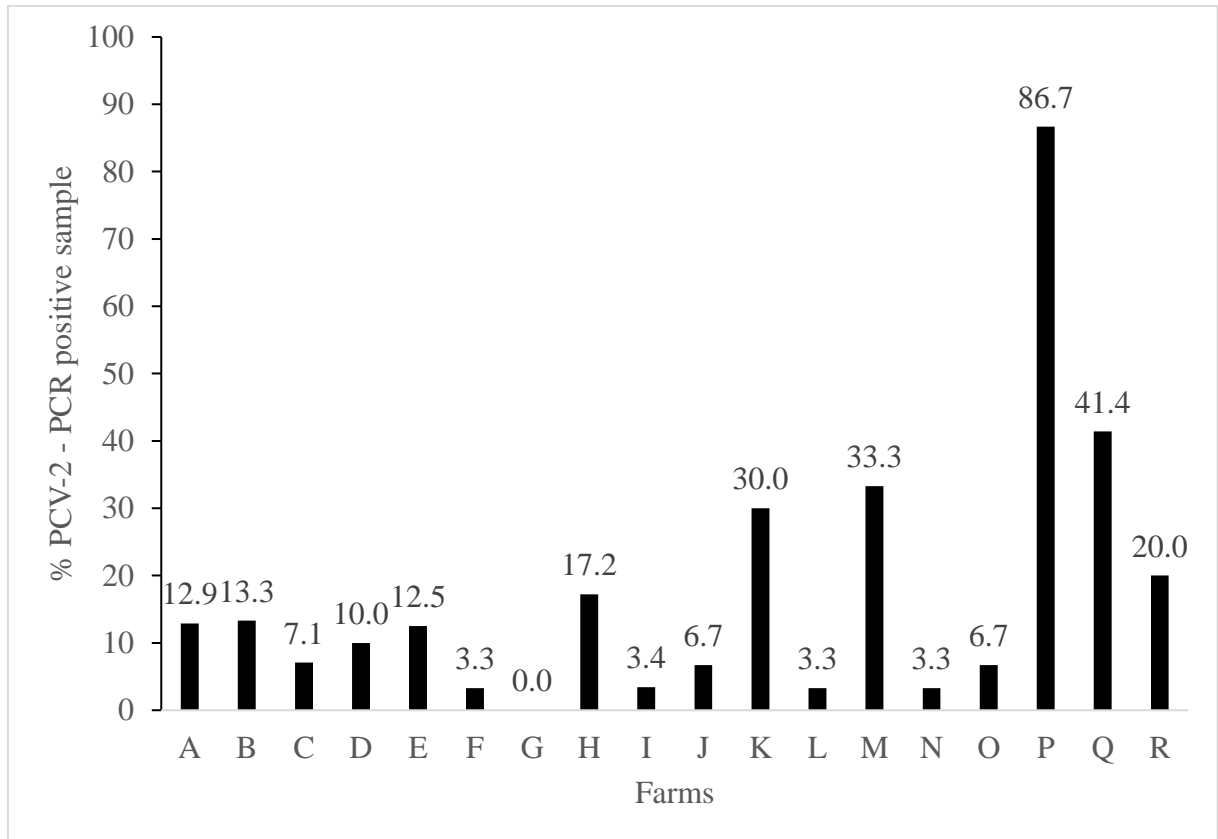
multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* (2002) 126:38–46. doi: 10.1053/jcpa.2001.0520

**Table 1:** Description and distribution of the farms and number of sampled animals per farm.

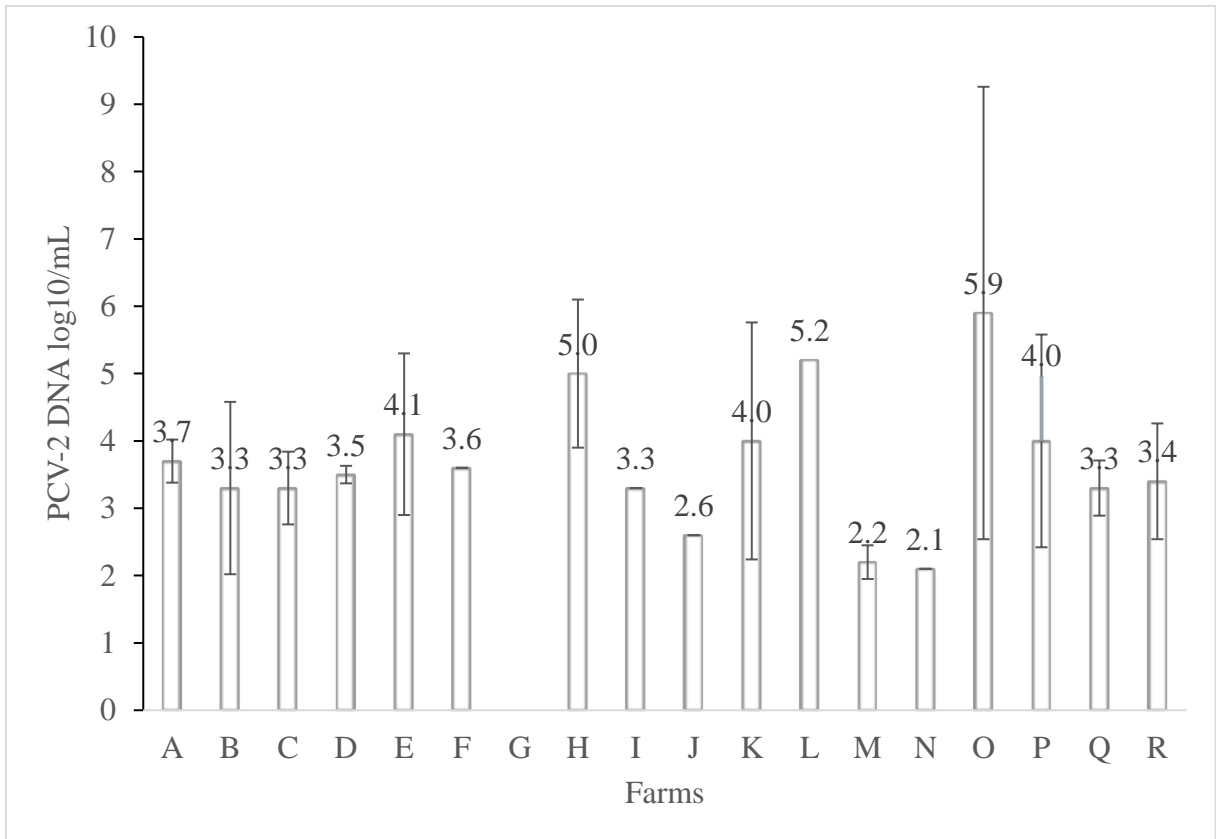
Farm	Company	Location	Sites	Sows/farm	Number of sow samples	Number of PUCS samples
A	X	SC	W/N	6,000	31	31
B	X	SC	W/N	4,000	30	30
C	X	SC	W	2,000	28	28
D	Y	SC	W	3,770	30	30
E	Y	SC	W	3,200	32	32
F	Z	RS	W	1,500	30	30
G	Z	RS	W	1,000	30	30
H	Z	RS	W	7,500	29	29

I	Z	RS	W	2,330	29	29
J	Z	RS	W	2,880	30	30
K	Z	RS	W/N	2,150	30	30
L	W	MT	W	3,250	30	30
M	W	MT	W	4,400	30	30
N	W	MT	W	4,400	30	30
O	W	MT	W	4,400	30	30
P	W	MT	W	4,400	30	30
Q	W	MT	W	4,400	29	29
R	W	PR	W	5,000	30	30
Total				66,580	538	538

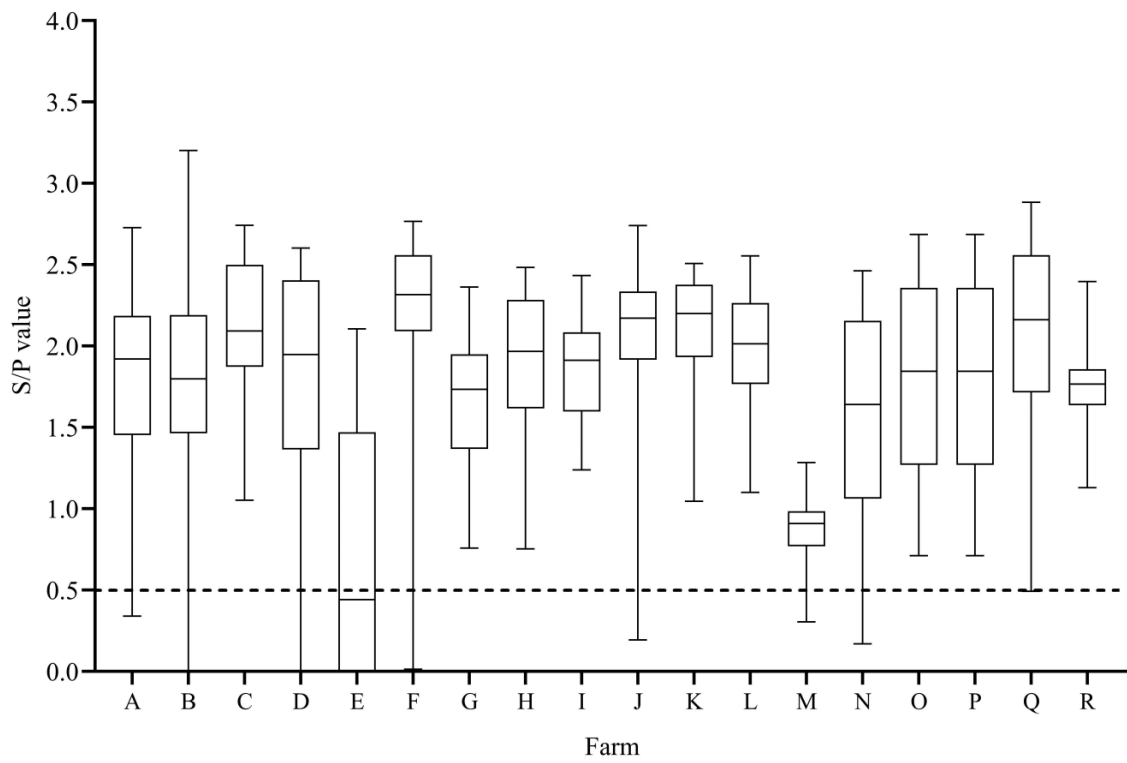
W = breeding farms with piglets up to weaning; W/N = breeding farms with nurseries  
 SC - Santa Catarina; RS - Rio Grande do Sul; MT - Mato Grosso; PR – Paraná - PR



**Figure 1.** Frequency of PCV-2-PCR positive placental umbilical cord serum (PUCS) from litters of 18 breeding farms.



**Figure 2.** Average viral load of PCV-2-positive PUCS samples with standard deviation in all 18 breeding farms. The results are expressed as the log<sub>10</sub> viral copy number per milliliter of PUCS (copies/ml).



**Figure 3.** PCV-2 S/P values of farrowing sows (n = 538) in 18 farms. Sows were considered seropositive against PCV-2 when the S/P ratio was  $\geq 0.5$ .



**Table 2.** Association of farms (n = 18) with litters positive for PCV-2 by porcine umbilical cord serum (PUCS) and PCV-2-seronegative sows.

Correlation	r	P-value	
Positive PUCS (%) vs Sows S/P value	-0.17	0.51	
Positive PUCS (%) vs Seronegative sows (%)	-0.04	0.87	
Frequencies	Positive PUCS (%) <sup>†</sup>		
	≤10	>10	
n	9	9	
Seronegative sows, %	1.5 ± 0.7	8.9 ± 1.7	<0.01
Farms with seronegative sows, %	33.3 ± 15.7	55.6 ± 16.6	0.36

S/P value – average of S/P value in each farm.

Positive PUCS – percentage of litters positive for PCV-2 by PCR on each farm.

Seronegative sows – percentage of sows seronegative for PCV-2 by ELISA on each farm.

Farms with seronegative sows – farms with at least one sow seronegative for PCV-2.

<sup>†</sup>Farms with less or more than 10% of litters positive for PCV-2 by PCR, classified based on the median of the farms included in the study.

#### **4. CAPÍTULO III – SEGUNDO ARTIGO CIENTÍFICO**

**Effect of different protocols of porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination on serological, virological and reproductive parameters in a PCV-2 subclinically infected breeding herd in Brazil.**

Artigo em revisão para ser submetido à revista científica

## **Effect of different protocols of porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination on serological, virological and reproductive parameters in a PCV-2 subclinically infected breeding herd in Brazil.**

### **Abstract**

Studies under field conditions measuring the impact of PCV-2 vaccination of dams on reproductive parameters and litter performance are scarce and have contradictory results. Because of this, this study aimed to evaluate the effect of different protocols of sow vaccination against PCV-2 on reproductive parameters as well as on virological and serological parameters in sows and their progeny. A farm with 4400 dams was selected for the study, and a total of 161 dams were selected for this trial. The farms were divided into three groups. Dams in group A (n=54) were vaccinated intramuscularly in mid-gestation (48 – 54 gestation days) with one dose of 1 ml of the vaccine Ingelvac CircoFLEX® and one dose of 1ml of saline solution 0.9% 30 days after, Group B (n=55) was vaccinated intramuscularly with a first dose in mid-gestation (48 – 54 days) and a second dose 30 days after with 1ml of the vaccine Ingelvac CircoFLEX® and Group C was unvaccinated. Blood was collected from all the dams at mid-gestation, farrowing, and from three to four umbilical cords (PUCS) per litter. All the piglets born were weighed within 12 hours after the end of the farrowing process. Additionally, the number of stillborn, mummies, and piglets born alive and the duration of parturition were recorded. There was no significant difference in results of dam's serology, qPCR from PUCS, and reproductive parameters between vaccinated and not vaccinated dams. The virological, serologic, and clinical patterns suggest that the herd was already stable for PCV-2, underestimating the possible results of sow vaccination for PCV-2.

Keywords: PCV-2, PCR, PUCS, reproductive parameters, serology, swine

### **1. Introduction**

Porcine circovirus 2 (PCV-2) is a small, circular, non-enveloped, single-stranded DNA virus of 20 nm in diameter approximately, belonging to the genus *Circovirus*, family *Circoviridae* (OPRIESSNIG et al., 2012). In pig farms, PCV-2 is endemic and causes several clinical syndromes unified as "porcine circovirus-associated diseases" (PCVAD). The PCVAD embrace porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS); PCV-2 lung disease (PCV-2-LD); PCV-2 enteric disease (PCV-2-ED); PCV-2 systemic disease (PCV-2-SD); PCV-2 reproductive disease (PCV-2-RD), and PCV-2 subclinical infection (PCV-2-SI)

(SEGALES, 2011). PCV-2 infections occurring within the uterus at various stages of pregnancy can result in a range of reproductive disorders influenced by the immunological status of the fetus and dams. Clinical signs of PCV-2 infection in the dam are typically absent or inapparent. The most consistent clinical presentation of PCV-2 RD is increased stillborn and mummified fetuses (O'CONNOR et al., 2001). Moreover, there is also a risk that piglets are born viremic with PCV-2 due to transplacental infection. Seronegative dams in the breeding batches might potentially increase the prevalence of viremic newborn piglets (DIESTE-PEREZ et al., 2018; EDDICKS et al., 2016; OLIVER-FERRANDO et al., 2018; SHEN et al., 2010; FAN et al., 2023), and colostrum protection from dams to their offspring might be weakened (KURMMAN et al., 2011).

Pre-suckling infected piglets have been associated with a higher chance of horizontal transmission of PCV-2 between littermates, increasing the number of infected piglets at weaning. This has been reported in the field and experimental studies, increasing the risk of low vaccine efficacy (MADSON et al., 2009; ANDRAUD et al., 2008; ROSE et al., 2012; YU et al., 2007). The higher risk of reduced vaccination efficacy occurs because piglets might be already infected with PCV-2 at the time of vaccination, and some of them may develop the clinical disease earlier or maintain a subclinical condition (PCV-2-SI), having an impact on the zootechnical performance (ANDRAUD et al., 2009; ROSE et al., 2012).

Several samples have been used to determine the prevalence of PCV-2 viremic newborn piglets. These include pre-suckling piglet serum, umbilical cord tissue, processing fluids, and placental umbilical cord serum (PUCS) (DIESTE-PEREZ et al., 2018; EDDICKS et al., 2016; SHEN et al., 2010; RUSTON et al., 2017; KNOX et al., 2017; BAUMERT et al., 2013). PUCS was shown to have a high specificity and sensibility compared to pre-suckling piglet serum (BAUMERT et al., 2013). Also, PUCS was used as a diagnostic sample in some studies to find out how frequently in newborn piglets was PCV-2 infection and to evaluate vaccination against PCV-2 in the production cycle (DIESTE-PEREZ et al., 2018; FAN et al., 2023; PLEGUEZUELOS et al., 2021). Studies performed in the USA with pre-suckling piglets showed a PCV-2 prevalence ranging from less than 10% (KNOX et al., 2017) to up to 82% (SHEN et al., 2010) by PCR. Similar results were found in Brazil, which detected a frequency of newborn viremic piglets ranging from 0% to 86% between 18 farms investigated by qPCR in PUCS (LIPPKE et al., 2024).

PCV-2 vaccination of dams represents the better approach to mitigate the transmission of PCV-2 to their offspring, thereby reducing the risk of PCV-2-related reproductive failure and viremic newborn piglets (OLIVER-FERRANDO et al., 2018; PLEGUEZUELOS et al.,

2021; PEJSAK et al., 2012). However, other studies have demonstrated that sow vaccination does not entirely prevent PCV-2 vertical transmission (MADSON et al., 2009). Studies under field conditions measuring the impact of dam vaccination on reproductive parameters and litter performance are scarce and have shown contradictory results. One study showed that piglets from vaccinated sows demonstrated a significantly higher average birth weight when compared to unvaccinated dams. However, no statistical differences were observed regarding stillborn, mummies, and liveborn piglets (PLEGUEZUELOS et al., 2021). Also, in the other two studies, there was an improvement in the number of liveborn piglets with no difference in stillborn and mummies from vaccinated dams (OLIVER-FERRANDO et al., 2018; PEJSAK et al., 2012). On the other hand, some published data did not find a significant impact on reproductive performance when a PCV-2 vaccine was used in dams (KURMMAN et al., 2011; CYBULSKI et al., 2020).

Studies also demonstrated that dam vaccination reduced the number of newborn viremic piglets (SHEN et al., 2010; O'NEILL et al., 2012). In one of these studies, a reduction of 44% ( $p < 0.001$ ) in PCV-2 viremic piglets and a decrease of 31,5% ( $p = 0.036$ ) in the prevalence of litters with PCV-2 viremia when piglets born from PCV-2 vaccinated were compared with unvaccinated dams (O'NEILL et al., 2012). The reasons for that could be the hiding of intrauterine infection or the decrease of infection via colostrum shortly after birth (MADSON et al., 2009). This study aimed to evaluate the effect of different protocols of sow vaccination against PCV-2 on reproductive parameters and virological and serological parameters in sows and their progeny.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Herd Description**

The study was conducted in a two-site commercial farm located in west-center Brazil. The farm had around 4400 dams and had a weekly farrowing batch system. Piglets were weaned around 23 days of age. The herd was negative for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and three genetic lines (A, B and C) were used to produce commercial pigs. However, in the last two years, only one herd from one genetic line (HS) was the source of replacement gilts multiplied at a different location and periodically transported (respecting quarantine rules) from the nucleus farm belonging to the same company and having the same health status. The vaccination protocol included gilts and sows immunization pre-farrowing against porcine parvovirus, *Erysipelothrix rhusiopathiae*,

*Leptospira* spp., *Salmonella* Typhimurium and Choleraesuis, *Glaesserella parasuis*, *Pasteurella multocida* type A and D, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* type C. Piglets were vaccinated 1 – 3 days before weaning against PCV-2, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Glaesserella parasuis*, *Pasteurella multocida* type A, *Salmonella* Typhimurium and Choleraesuis and *Lawsonia intracellularis*. Inclusion criteria for dam selection were a) healthy animals, b) from all genetic lines, and c) of all parties (gilts, primiparous, and multiparous).

Four months before the start of the study, PCV-2 DNA was detected in placental umbilical cord serum (PUCS – pools of 3-4 samples) from 26 out of 30 litters (86.6%, viral load range was  $10^{2.38}$  and  $10^{8.72}$  genome copies/ml), indicating a PCV-2-SI scenario with no clinical PCVAD. Also, serology for PCV-2 using a commercial ELISA kit to assess dams during the lactation period revealed 100% positive results with an average of 2.23 ELISA S/P value.

## 2.2. Study design

Dams were randomly allocated into three treatment groups blocked by parity (from 0 to 9) and genetic lines (DB, TOPIGS, or HS). A total of 161 dams were selected for this trial. One breeding batch that had an expected birth for October 2023 was divided into three sub-groups, to which different PCV-2 vaccination protocols were applied. Dams in Group A (n=54) were vaccinated intramuscularly in mid-gestation (48 – 54 gestation days) with one shot of 1 ml of the vaccine Ingelvac CircoFLEX®, and one shot of 1ml of saline solution 0.9% with 78 – 84 days. Group B (n=55) was vaccinated intramuscularly with a first shot in mid-gestation (48 – 54 gestation days) and a second dose 30 days apart (78 – 84 gestation days) of 1ml of the vaccine Ingelvac CircoFLEX®. Group C (n=52) remained unvaccinated; however, they received two shots of 1ml of saline solution, 0.9%, with 48 – 54 gestation days and 78 – 84 gestation days. Dams from all treatment groups were housed in the same barn, individualized, and transferred to the farrowing rooms with 111 days of gestation. The study design is summarized in Fig. 1.

All piglets from the 161 dams were weighed within 12 hours after the farrow end. The number of stillborn, mummies, born alive and farrowing duration were also recorded.

### 2.2.1 Sow blood collection and placental umbilical cord serum sampling

Blood from three to four umbilical cords per litter from all 161 dams was milked out inside a sterile tube with a clot activator to reach a volume of at least 3 ml. Each tube was

considered one PUCS sample. Placental umbilical cord blood was collected directly from the placenta within 12 hours post-farrowing or directly from the umbilical cord of piglets immediately after birth and before colostrum intake. To minimize sample contamination with environmental PCV-2 DNA, gloves were changed, and all utensils (e.g., scissors) were cleaned mechanically with disposable paper, washed with water, and disinfected with ethanol 70% for each PUCS sampling according to Pleguezuelos et al. (2021). Additionally, blood samples from all (n=161) dams were collected twice, at mid-gestation (48 – 54 gestation days) and farrowing (0 - 3 days after farrowing), being the dams the same ones from the PUCS litters. All samples (PUCS and blood from dams) were stored at 4 °C for 24 hours. Subsequently, the samples were centrifuged (3000 rpm for 15 minutes) to obtain the serum, which was placed in 1.5-ml sterile microtubes and stored at -20°C to be tested within 30 days.

## **2.3 Diagnostic test methods**

### **2.3.1 Serology**

All serum samples from dams were tested for the presence of anti-PCV-2 antibodies using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Porcine Circovirus 2 Antibody Test, BioChek B.V., Reeuwijk, Holland) according to the manufacturer's instructions. Serum samples were considered positive for PCV-2 antibodies when the S/P value was  $\geq 0.5$ .

### **2.3.2 PCR detection for PCV-2**

The DNA was extracted from PUCS using commercial kits (NewGenePrepAmp, Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Brazil). The PCV-2 quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using the NewGenePCVAmp kit (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Brazil) and specific primers (BALESTRIN et al., 2022). The standard curve was generated using references with high (10,000,000 genomes/ml), low (10,000 genomes/ml), and intermediate (10,000–1,000,000 genomes/ml) load, considering a linear regression coefficient (R<sup>2</sup>) above 0.9. The qPCR was considered positive with a Ct value < 37. Viral titers inferred from the qPCR results were expressed as the viral copy number per milliliter (copies/ml).

### **2.3.3 Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System - SAS<sup>®</sup> 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The GLIMMIX procedure included the treatments as

fixed effect. Frequency variables were analyzed using binomial distribution and continuous variables by Gaussian distribution. Comparisons were performed using the Tukey–Kramer test.

### **3. Results**

#### **3.1. Reproductive parameters**

Reproductive parameters were obtained from 161 dams of first–ninth parity from 3 genetic lines and 2.450 piglets from the same farrowing batch. The comparison of these parameters among each treatment group is detailed in Table 1. In Group B (dams vaccinated twice for PCV-2 during gestation), the highest total born (15.94), and liveborn (13.98) were observed. However, there was no statistical difference in any of reproductive parameters between treatments.

#### **3.2. PCV-2 antibody values in serum samples of dams**

The dynamic of IgG antibodies against PCV-2 are shown in Fig.2. In the mid-gestation, Group A, B, and C had 1.5, 1.36, and 1.39 S/P values, respectively, with a standard deviation of 0.28, 0.41 and 0.42. However, there was no statistical difference between the groups. At farrowing, group B showed significantly higher average S/P values (1.86) than group A (1.68) and C (1.61). Vaccinated groups (A and B) had a lower standard deviation (A = 0.29; B = 0.23) when compared to the non-vaccinated group (0.35).

#### **3.3 PCV-2 DNA detection in serum samples from placental umbilical cord pools**

Only eight PUCS were positive for PCV-2 DNA throughout the study. Two from group A (both with  $10^{2.3}$  PCV-2 copies/ml), four from group B (ranging from  $10^{2.25}$  –  $10^{5.85}$  PCV-2 copies/ml), and two from group C ( $10^{2.58}$  and  $10^{2.62}$  PCV-2 copies/ml).

### **4. Discussion**

The present study evaluated the impact of different protocols in sow vaccination for PCV-2 on serological, virological, and reproductive parameters in a subclinically infected herd of 4.400 sows. The comparison of the number of total born, liveborn, stillborn, mummies, duration of farrowing, and newborn piglets' weight between vaccinated and non-vaccinated dams did not show any statistical difference independently. This agrees with two studies that reported no difference in reproduction parameters between vaccinated and non-



vaccinated dams (KURMANN et al., 2011; CYBULSKI et al., 2020). In the first study, the dam's vaccination for PCV-2 at 4 and 2 weeks before insemination and four weeks prepartum during 14 months in two farms with no apparent reproductive problems did not determine better reproductive parameters. The second study was conducted in a high-health status herd with a highly prolific genetic and with no problem with PCV-2 RD. It was carried out using three groups of dams vaccinated against PCV2 1 day after weaning, 28 days after weaning, and non-vaccinated. The herd used in our study was a PCV-2 subclinically infected herd with no history of PCV-2 RD. This is probably why we did not find a significant difference in reproductive parameters between vaccinated and non-vaccinated groups.

This finding differs from other works where higher birth weights in piglets from vaccinated dams for PCV-2 were reported (PLEGUEZUELOS et al., 2021; PEJSAK et al., 2012). Pleguezuelo et al. (2021) found a significant increase in 600 grams in piglets born from vaccinated dams (1.64 Kg) compared to non-vaccinated (1.58 Kg) dams in a herd with PCV-2 SI. Furthermore, Pejsak et al. (2012) reported a significant increase in the birth weight of newborn piglets born from non-vaccinated (1.25Kg) from vaccinated dams in the first cycle (1.37 Kg) and in the first year (1.46 Kg) (PEJSAK et al., 2012). The only numerical difference found in our study could be due to a shallow challenge with PCV-2 in our assessed herd, as only 4.9% (8/161) of PUCS were positive.

The low challenge for PCV-2 in the current herd was shown by the deficient number of positive PUCS (4.9%) detected considering all groups. These results were in significant contrast with those obtained in the screening from the same herd four months prior to the start of the study, where PCV-2 genome was detected in 86% of all PUCS collected (with 100% seropositive dams with 2.23 average ELISA S/P value). Over time, the dams had improved their immune status to PCV-2 due to the previous high circulation and reduced the subsequent PCV-2 infection pressure in the herd.

Based on the results, 97.5% of the dams demonstrated seropositivity with high levels (1.42 average S/P value from all groups) and high heterogeneity (ranging from 0.2 to 2.29 S/P value) of PCV-2 antibodies at sampling time in the mid-gestation with no significant difference in the average S/P value between vaccinated and non-vaccinated groups. It must be considered that the dams in this study were vaccinated only at around 21 days of age. The serological ELISA response was probably due to infection, as the vaccine protection is known to last roughly six months (SEGALES & SIBILA, 2022). Similar results in prevalence (89%) and heterogeneity (ranging from 0.2 to 1.49 in S/P value) were observed by Oliver-Ferrando et al. (2018) in a herd that did not vaccinate dams for PCV-2. Even though all groups had an

increase in S/P value at farrowing, the "two doses" vaccinated group (group B) showed higher ( $p < 0.05$ ) antibody levels (1.88 S/P value) and the lower standard deviation (0.23) when compared to group A (0.29) and group C (0.35). This finding is consistent with prior research, which indicated that vaccinating dams before farrowing resulted in a strong antibody response (SIBILA et al., 2013), including neutralizing antibodies in the serum (GERBER et al., 2011). The increase in antibody levels detected by ELISA is linked to PCV-2 neutralizing antibody titers (OLIVER-FERRANDO et al., 2016), even though these values were not directly assessed in this investigation. The booster vaccination in group B led to increased antibody levels compared to group A, indicating a possible increase in protection for both dams and piglets.

## 5. Conclusion

Vaccination of the breeding herd against PCV-2 (sows and gilts) improved the immune status of dams. However, there was no difference in reproductive and PCR detection of PCV-2 between vaccinated and non-vaccinated dams. The virological, serologic, and clinical patterns suggest that the herd was already stable for PCV-2, possibly underestimating the results of sow vaccination for PCV-2.

## 6. References

- OPRIESSNIG, T. *et al.* Emergence of a novel mutant PCV-2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. **Vet Microbiol**, v. 163, p. 177–183, 2019.
- SEGALÉS J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Res.** 164, p.10–19, 2012
- ROSARIO, K. *et al.* Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Arch Virol**, v. 162, p. 1447–1463, 2017.
- SIBILA, M. *et al.* Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Am J Vet Res**, v. 65, p. 88–92, 2004.
- O'CONNOR, B. et al. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Can Vet J**, v. 42, p. 551–553, 2001.
- DIESTE-PÉREZ, L. *et al.* The prevalence of PCV-2 viremia in newborn piglets on four endemically infected Dutch sow farms is very low. **Prev Vet Med**, v.153, p. 42–46, 2018.
- EDDICKS, M. *et al.* Low prevalence of porcine circovirus type 2 infections in farrowing sows and corresponding pre-suckling piglets in southern German pig farms. **Vet Microbiol**, v. 187,

p. 70–74, 2016.

OLIVER-FERRANDO, S. *et al.* Exploratory field study on the effect of Porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination on serological, virological and reproductive parameters in a PCV-2 subclinically infected sow herd. **BMC Vet Res**, v. 14, p. 1–10, 2018.

SHEN, H. *et al.* High prevalence of porcine circovirus viremia in newborn piglets in five clinically normal swine breeding herds in North America. **Prev Vet Med**, v. 97, p. 228–236, 2010.

FAN, M. *et al.* Infection characteristics of porcine circovirus type 2 in different herds from intensive farms in China, 2022. **Front Vet Sci**, v. 10, p. 113 - 118, 2022.

KURMANN, J. *et al.* Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, p. 1644–1649, 2011.

MADSON, D. M. *et al.* Effect of porcine circovirus type 2 (PCV-2) vaccination of the dam on PCV-2 replication in utero. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, p. 830–834, 2009

ANDRAUD, M. *et al.* Modelling the time-dependent transmission rate for porcine circovirus type 2 (PCV-2) in pigs using data from serial transmission experiments. **J R Soc Interface**, v. 6, p. 39–50, 2009.

ROSE, N. *et al.* Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV-2). **Virus Res**, v. 164, p. 78–89, 2012.

YU, S. *et al.* Porcine circovirus type 2 (PCV-2) distribution and replication in tissues and immune cells in early infected pigs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 115, p. 261–272, 2007.

RUSTON, C., PITTMAN, J.S. Evaluation of methods for determining the porcine circovirus type 2 status of sow herds. *In: Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 48., 2017, Denver - Colorado, p. 77–78.

KNOX, A., OCHOA, L. GREINER, L. Correlating sampling methods to porcine circovirus type 2 (PCV-2) viremia status of sows and piglets in a sow herd with or without PCV-2 revaccination during gestation. *In: Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians*, 48., 2017, Denver - Colorado, p. 69–71.

BAUMERT, D., FANGMAN, T., RUSTVOLD, J. Comparing Placenta and Presuckle piglet PCV-2 status between two breeding sites, *In: Allen D. Leman Swine Conference*, 39., 2013, Minneapolis, p. 8290.

PLEGUEZUELOS, P. *et al.* Exploratory field study on the effects of porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination at different physiological stages mimicking blanket vaccination. **Porc Heal Manag**, v. 7, p. 1–12, 2021.

PEJSAK, Z. *et al.* Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV-2 on reproductive parameters. **Pol J Vet Sci**, v. 15, p. 37–42, 2012.

CYBULSKI, P. *et al.* Vaccination of sows against porcine circovirus type 2 (PCV-2) in a subclinically infected herd does not impact reproductive performance. **Agric**, v. 10, p. 1–8,

2020.

O'NEILL, K.C. *et al.* Vaccination of sows reduces the prevalence of PCV-2 viraemia in their piglets under field conditions. **Vet Rec**, v.27, p. 115 - 118, 2012

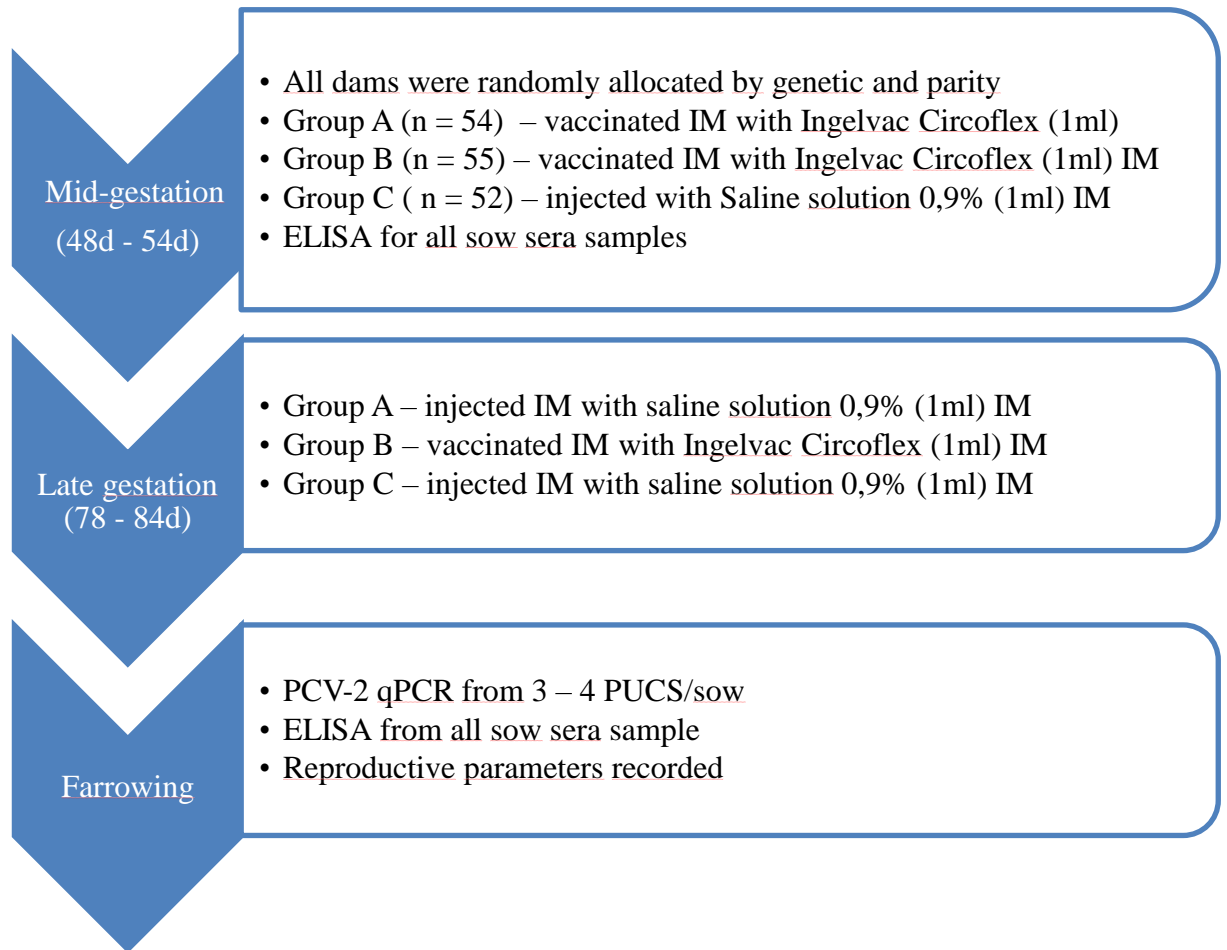
BALESTRIN, E. *et al.* Molecular detection of respiratory coinfections in pig herds with enzootic pneumonia: a survey in Brazil. **J Vet Diagnostic Investig**, v. 34, p. 310–313, 2022.

SEGALÉS, J., SIBILA, M. Revisiting Porcine Circovirus Disease Diagnostic Criteria in the Current Porcine Circovirus 2 Epidemiological Context. **Vet Sci**, v. 9, p. 01 - 10, 2022.

SIBILA, M. *et al.* Humoral response and colostral antibody transfer following “one-dose” pre-mating vaccination of sows against porcine circovirus type-2. **Vet J**, v.197, p. 881–883, 2013.

GERBER, P.F. Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. **Vet J**, v. 188 p. 240–242, 2011.

OLIVER-FERRANDO, S. *et al.* Evaluation of natural porcine circovirus type 2 (PCV-2) subclinical infection and seroconversion dynamics in piglets vaccinated at different ages. **Vet Res**, v. 47, p. 1–11, 2016.



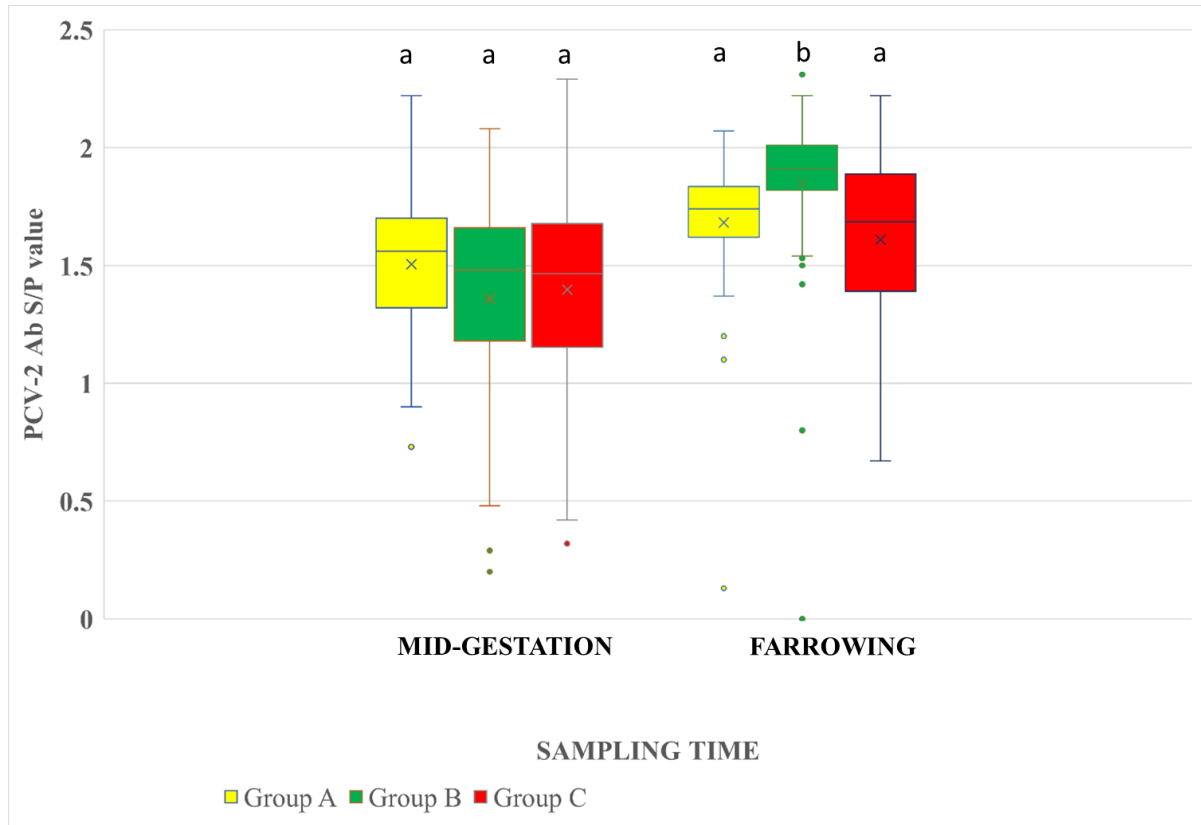
IM = intramuscularly

**Figure 1:** Experimental study design, including sampling time points and PCV-2 vaccine/saline solution application timing; PCV-2 vaccine: 1 ml of PCV-2 Ingelvac Circoflex®.

**Table 1.** Reproductive parameters (mean  $\pm$  SE) of sows treated with different vaccination protocols for PCV-2 during gestation.

Variables	Groups*		
	A	B	C
<i>n</i>	54	55	52
Total born piglets/ sow	14.63 $\pm$ 3.01	15.94 $\pm$ 3.19	15.23 $\pm$ 3.14
Live born piglets/sow	12.96 $\pm$ 2,65	13.98 $\pm$ 2.36	13.77 $\pm$ 3.38
Stillbirth (%)	1.94 $\pm$ 1.22	2.06 $\pm$ 1.23	1.85 $\pm$ 1.84
Mummies (%)	1.44 $\pm$ 0.7	1.60 $\pm$ 0.84	1.5 $\pm$ 0.73
Piglets birth weight (Kg)	1.40 $\pm$ 0.22	1.37 $\pm$ 0.20	1.35 $\pm$ 0.19
Parity	3.33 $\pm$ 1.5	3.63 $\pm$ 2.12	3.8 $\pm$ 1.95

\***A** - Vaccinated with one shot of 1 ml of Ingelvac CircoFLEX® in mid gestation (48 – 54 days post-insemination) with one shot of 1ml of saline solution 0,9% in late gestation (78 – 84 days post-insemination); **B** - vaccinated with a first shot in mid-gestation (48 – 54 days post-insemination) and a second dose 30 days apart (78 – 84 days post-insemination) of 1ml of Ingelvac CircoFLEX®; **C** - remained unvaccinated, however received 2 shots of 1ml of saline solution 0,9% with 48 – 54 days and 78 – 84 days post-insemination.



**Figure 2.** PCV-2 ELISA S/P values from dams of the three experimental groups. Dams were considered seropositive against PCV-2 when the S/P value was  $\geq 0.5$ .

Different letters in superscript in a row indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between groups A, B and C.

**Group A** - Vaccinated with one shot of 1 ml of IngelvacCircoFLEX® in mid gestation (48 – 54 days post-insemination) with one shot of 1ml of saline solution 0,9% in late gestation (78 – 84 days post-insemination); **Group B** - vaccinated with a first shot in mid-gestation (48 – 54 days post-insemination) and a second dose 30 days apart (78 – 84 days post-insemination) of 1ml of IngelvacCircoFLEX®; **Group C** - remained unvaccinated, however received 2 shots of 1ml of saline solution 0,9% with 48 – 54 days and 78 – 84 days post-insemination.

## 5. CONCLUSÃO

A epidemiologia do PCV-2 tem sido substancialmente modificada desde o advento das vacinas e seu uso massivo em todo o mundo. Apesar do vírus ainda ser onipresente nos rebanhos, o padrão de infecção, a carga viral, a porcentagem de animais infectados com infecção natural e a apresentação da doença mudaram a ponto de, eventualmente, se poder gerar lotes de animais com exposição mínima ou nenhuma ao vírus desde o desmame até o abatedouro. Esse fenômeno gera subpopulações de matrizes soronegativas que apresentam maior chance de transmitir pela rotintrauterina o PCV-2, causando morte fetal e/ou o nascimento de leitões virêmicos. Considerando a importância das matrizes na epidemiologia da infecção pelo PCV-2, essa tese teve dois objetivos principais: **o primeiro**, o de acessar a frequência de leitões virêmicos e do status imunitário das matrizes frente o PCV-2 em granjas comerciais do Brasil e **o segundo**, utilizar diferentes protocolos de vacinação de matrizes frente o PCV-2 com o objetivo de avaliar o efeito em parâmetros reprodutivos assim como em parâmetros virológicos e sorológicos das matrizes e suas leitegadas.

No primeiro estudo, encontramos uma alta prevalência de rebanhos com viremia por PCV-2 em leitões recém-nascidos em rebanhos comerciais no Brasil, sem história de doença clínica associada ao PCV-2. Além disso, o status imunológico das matrizes teve grande heterogenicidade com uma frequência importante de fêmeas soronegativas detectadas em quase metade das granjas avaliadas. Neste cenário, a valiação da infecção por PCV-2 no início da vida de leitões utilizando o PUCS e o status imunológico das matrizes ao parto podem ser utilizados como ferramenta de monitoria ativa para esclarecer a dinâmica da infecção por PCV-2 em granjas de suínos.

No segundo estudo o protocolo de vacinação de matrizes com duas doses contra o PCV-2 melhora o estado imunológico das matrizes pelo aumento da quantidade de anticorpos no soro, porém sem diferença no desempenho reprodutivo, e detecção do PCV-2 em leitões recém-nascidos. Os padrões virológicos, sorológicos e clínicos sugerem que a granja utilizada no experimento apresentava-se estável para o PCV-2, subestimando os possíveis resultados da vacinação de porcas para PCV-2.



## REFERÊNCIAS

- ALBANES, M.F. Cardiomiopatia viral. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.71,n.2, 1998.
- BALASCH, M. *et al.* Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p.139-148,1999.
- BARBOSA, C.N.*et al.* Estudo do perfil sorológico para o circovírus suíno tipo 2 em granjas tecnificadas para a produção comercial de suínos. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DEVETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, XII. 2005, Fortaleza. Anais...Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005, p.7-8.*
- BIELANSKI, A.*et al.* Distribution of PCV-2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV-2 antibody positive pigs. **Veterinary Record**, v.155, n.19, p.597-598, 2004.
- BRUNBORG, I.*et al.* Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from sera/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real time PCR. **Journal of Virological Methods**, v.122, p. 171-178, 2004.
- BRUNBORG, I.*et al.* Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p. 368-375, 2007.
- CALSAMIGLIA, M.*et al.* Sow porcine circovirus type 2 status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Science**, v. 82, p. 299-304, 2007.
- CARASOVA, P. *et al.* The levels of PCV-2 specific antibodies and viremia in pigs. **Veterinary Science**, v.83, p.274-278, 2007
- CYBULSKI, P. *et al.* Vaccination of sows against Porcine Circovirus Type 2 (PCV-2) in a subclinically infected herd does not impact reproductive performance. **Agriculture**, v.10, p.01-08, 2020.
- ELLIS, J.*et al.* Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.3-14, 1999
- GARKAVENKO, O.*et al.* Identification of pig circovirus type 2 in New Zealand pigs. **Transplantation Proceedings**, v.37, p.506-509, 2005.
- GAVA, D. *et al.* Transmission of porcine circovirus 2 (PCV-2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.70-76, 2008.
- GOMES, M. *et al.* Genetic diversity of Brazilian strains of porcine circovirus type 2 (PCV-2) revealed by analysis of the cap gene (ORF-2). **Archives of Virology**, v.152, p.1435-1445, 2007.
- HA, Y.*et al.* Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. **Research in Veterinary Science**, v. 18, p. 115 – 118, 2008.

- HERDT, G. *et al.* High prevalence of porcine circovirus 2, porcine parvovirus, and pathogenic leptospire in mummified swine fetuses in Southern Brazil. **Ciência Rural**, v.49, n.04, p. 01-06, 2019.
- HOLLER, L.D. Diagnosis of swine abortions. **Journal of Swine Health and Production**, v.2, p.29-31, 1994.
- JIANG, C. *et al.* Genetic analysis of porcine circovirus type 2 in China. **Archive of Virology**, v.162, p.2715 - 2726, 2017.
- JOHNSON, C. *et al.* Experimental in utero inoculation on late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.507-512, 2002.
- KAICHUANG, S. *et al.* Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets coinfecting experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.367-377, 2008
- KIM, J.; CHUNG, H.K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **Veterinary Journal**, v.166, p.251-256, 2003
- KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record**, v.155, p.489-492, 2004.
- KRAKOWKA, S. *et al.* Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 254-263, 2000
- KRAKOWKA, S. *et al.* Features of porcine circovirus-2 disease: correlation between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.213-222, 2005.
- KRIDLI, R. T. *et al.* Placentation, maternal-fetal interface, and conceptus loss in swine. **Theriogenology**, v. 85, p. 135-144, 2016.
- KURMMAN, J. *et al.* Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.18, p. 1644 – 1649, 2011.
- LAROCHELLE, R. *et al.* PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p. 4629-4632, 2000
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.67, p.114-120, 2003
- LEFEBVRE, D. *et al.* Inoculation of porcine fetuses with different genotypes and doses of PCV-2. *In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008 Durban, África do Sul, Proceedings...* International Pig Veterinary Society, 2008, p. 38.
- LEFEBVRE, R. C.; Fetal mummification in the major domestic species: current perspectives on causes and management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 6, p. 233-244, 2015.

MADEC, F.*et al.* Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v.63, p.223-233, 2000.

MADON, D.; OPRIESSNIG, T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV-2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. **Animal Health Research Reviews**, v.12, n.01, p. 47 – 65, 2011.

MADSON, D.PCV-2 infection/disease in the breeding herd: An update. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE VETERINARIANS CONGRESS, **Proceedings...**, 2012, p.445 – 448.

MAGAR, R.; MULLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.64, p. 184-186, 2000.

MATEUSEN, B.*et al* Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. **Theriogenology**, v.61, p.91-101, 2004

MATEUSEN, B.*et al.* Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. **Theriogenology**, v.68, p.896-901, 2007

McINTOSH, K.*et al.* Detection of porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p. 58-61, 2006

MORENO, A. *et al.* Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento em suínos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, XIII. 2007. Florianópolis. **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, p.249-250.

MORES, N. *et al.* Causas infecciosas de problemas reprodutivos na produção de suínos. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.498, p. 01-09, 2011.

NASCIMENTO, H. *et al.* Genotipagem de circovírus suíno tipo 2 (PCV-2) em granjas comerciais brasileiras vacinadas, de amostras coletadas no ano de 2019. In: XII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, **Anais...**2021, p.30 – 31.

NAYAR, G. *et al.* Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. **The Canadian Veterinary Journal**, v.40, p.277-278, 1999.

O'CONNOR, B. *et al.* Multiple porcine circovirus 2 associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.42, p.551-553, 2001

OCHOA, L. *et al.* Short summary on the low prevalence of PCV-2 on pigs at birth. Annual Meeting Of American Swine Veterinarian Association, 49, **Proceedings**, . 2018, p. 361-362.

OLIVER-FERRANDO, S. *et al.* Exploratory field study on the effect of Porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination on serological, virological and reproductive parameters in a PCV-2 subclinically infected sow herd. **BMC Veterinary Research**, v.14, n.130, p. 01 – 10, 2018.

- OLVERA, A. *et al.* Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **Journal of Virological Methods**, v.117, p.75-80, 2004.
- PARK, J.S. *et al.* Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.130-144, 2005
- PARK, G; CHAE, C. The prevalence of porcine circovirus type 2e (PCV-2e) in Korean slaughter pig lymph nodes when compared with other PCV-2 genotypes. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.01, p. 01-05, 2021.
- PATTERSON, R. *et al.* Exposure to environmental stressors result in increased viral load and further reduction of production parameters in pigs experimentally infected with PCV-2b. **Veterinary Microbiology**, v.177, n.3-4, p.261 –269, 2015.
- PENSAERT, M.B. *et al.* Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.175-183, 2004
- PERJSAK, Z. *et al.* Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV-2 on reproductive parameters. **Polish Journal of Veterinary Science**, v.15, n.01, p.37-42, 2012.
- PERKINS, S. *et al.* Comparison of processing fluids and placental umbilical cord serum to detect porcine circovirus type 2 in sow farms. ANNUAL MEETING OF AMERICAN SWINE VETERINARIAN ASSOCIATION, 50., Proceedings... 2019, p. 263-264.
- PESCADOR, C. *et al.* Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 27, p. 425-429, 2007.
- PIERONI, P. M. R. L. Estimativa do peso de fetos suínos por meio do exame ultrassonográfico. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Lavras – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, p. 1-52, 2013.
- PLEGUEZUELOS, P. *et al.* Exploratory field study on the effects of porcine circovirus 2 (PCV-2) sow vaccination at different physiological stages mimicking blanket vaccination. **Porcine Health Management**, v.7, n.21, p. 01 – 12, 2021.
- QUINTANA, J. *et al.* Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**, v.149, p.357-361, 2001
- ROSA, L. S. *et al.* Fatores que afetam as características produtivas e reprodutivas das fêmeas suínas. **B. Indústria Animal**, v. 71, p. 381-395, 2014.
- ROCHA, D. L.; ALBERTON, G. C.; SANTOS, J. L.; Identificação do circovírus suíno tipo 2 e do parvovírus suíno em fetos suínos natimortos e mumificados provenientes de granjas no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 600-606, 2010.
- RUSTON, C. *et al.* Evaluation of methods to determining the porcine circovirus type 2 status on swine herd. ANNUAL MEETING OF AMERICAN SWINE VETERINARIAN ASSOCIATION, 48., Proceedings... 2017, p. 77-78.

SANCHEZ, R.E.*et al.* Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.15-25, 2003

SANCHEZ, R.E.*et al.* Characteristics of porcine circovirus 2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.175-185, 2004

SANCHEZ, R.E.*et al.* Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. **Veterinary Microbiology**, v.83, p.169-176, 2001.

SCHNEIDER, L.G. *etal.* Avaliação da mumificação fetal e natimortalidade de acordo com o tamanho da leitegada e a ordem de parto. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS DE SUINOS, X.* 2001, Porto Alegre, **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, p.33-34.

SAPORITI, V. *et al.* Frequency of detection and phylogenetic analysis of Porcine circovirus 3 (PCV-3) in healthy primiparous and multiparous sows and their mummified fetuses and stillborns. **Pathogens**, v.9, n.533, p. 01 - 12, 2020.

SEGALES, J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v.164, p.10 – 19, 2012.

SCHMOLL, F. *etal.* Prevalence of PCV-2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. **Theriogenology**, v.69, p.814-821, 2008.

TISCHER, I. *et al.* A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v.295, p.64-66, 1982.

VANDERHAGHE, C. *et al.* Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: a review. **Animal Reproductive Science**, v.139, p.76 – 88, 2013.

VICENTE, J. *et al.* Epidemiological study on porcine circovirus type2 (PCV-2)infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Research**,v.35, p.243-253, 2004.

WEST, K.H. *et al.* Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p. 530-532, 1999.

ZANELLA, J. Doenças emergentes na suinocultura: circovirose suína. *In: Congresso Brasileiro De Veterinários Especialistas Em Suínos, X.* 2001. Porto Alegre, **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, p.122-127.

ZANELLA, J. *et al.* Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunohistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, 2006

ZHANG, H. *et al.* Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.67, n.3, p.1057-1061, 2020.

ZIZLAVSKY, M. *et al.* Significant role of PCV-2 in reproductive disorders of sows. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008. Durban, África do Sul, International PigVeterinary Society, 2008, **Proceedings**, p.110.