

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS):
Perfil sorológico da descendência numa exploração
intensiva de suínos

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Jorge Eduardo Morgado da Silva

Orientador

Professor Doutor João Carlos Caetano Simões

Coorientador

Dr.^a Dora Margarida Claro da Silva Rocha



Vila Real, 2015

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS):
Perfil sorológico da descendência numa exploração
intensiva de suínos

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Jorge Eduardo Morgado da Silva

Orientador

Professor Doutor João Carlos Caetano Simões

Coorientador

Dr.^a Dora Margarida Claro da Silva Rocha

Composição do Júri:

Presidente: Prof. Doutora Adelina Maria Gaspar Gama Quaresma

Vogais: Prof. Doutor Nuno Francisco Fonte Santa Alegria

Prof. Doutor João Carlos Caetano Simões

Vila Real, 2015

O conteúdo do presente trabalho é da inteira responsabilidade do autor.

*"I am fond of pigs. Dogs look up to us. Cats look down on us.
Pigs treat us as equals."*

Winston S. Churchill

Agradecimentos

Ao Professor Doutor João Carlos Caetano Simões por ter aceite colaborar neste trabalho, pelo tempo e paciência dispensada comigo, pela ajuda e por todos os conselhos. Fico-lhe muito agradecido por realizar este trabalho sob a sua tutoria.

À minha coorientadora, Doutora Dora Margarida Claro da Silva Rocha, por todos os conhecimentos, pela oportunidade e paciência e por toda a ajuda e amizade que demonstrou ao longo do meu estágio e ao longo deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio e conselhos dados ao longo de todos estes anos (e que continuam a dar). Também pela paciência que tiveram comigo até a finalização deste trabalho. Ambos são uma motivação para mim.

À minha irmã Dora Silva e ao Daniel Rodrigues por todos os momentos em que me apoiaram e aconselharam e por todos os outros momentos ao longo da vida.

Também aos meus avós, em especial ao meu avô José Morgado, pelo carinho e pelo apoio que sempre me deram.

À minha namorada Sara Silva pela motivação para completar este trabalho. Agradeço-te também pela paciência, nos bons e nos maus momentos, e pela compreensão e carinho que tiveste para comigo durante esta última fase.

À Agrupalto, especialmente ao Dr. Rui Sales Luís e à Dr.^a Isabel Cunha pela oportunidade e por todos os conhecimentos que me deram. Também à Eng.^a Carla Rodrigues e Dona Filomena pela paciência e todo o conhecimento dado durante o meu estágio.

Ao Dr. Francisco Fagundes pela ajuda prestada a este trabalho, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Professor Daniel Linhares e ao professor Jeffrey Zimmerman pela ajuda e disponibilidade dada a este trabalho

Aos meus amigos e companheiros da UTAD, por todos estes anos inesquecíveis em Vila Real. Um grande obrigado pela amizade, pela ajuda e pelo carinho que tornou esta cidade tão especial e única. O meu sincero obrigado a todos vós.

Por último, à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, assim como a todos os docentes que fizeram parte do meu ensino. Um obrigado a todos vós.

Resumo

A PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) é uma doença de suínos que surgiu quase simultaneamente no Norte da América (no final dos anos 80) e na Europa (no início dos anos 90), sendo uma das principais enfermidades atuais que afetam a indústria suinícola globalmente, responsável pela perda anual de 664 milhões de dólares nos E.U.A. A PRRS é causada pelo vírus PRRSV, o qual é dividido em dois genótipos principais: o Tipo 1 (Europeu) e tipo 2 (Norte Americano), diferindo a nível antigénico, genético ou sintomatológico. Caracteriza-se por manifestações a nível respiratório, como tosse e dispneia nos animais em crescimento, e a nível reprodutor em porcas, com abortos tardios, partos prematuros ou elevada mortalidade dos leitões nas maternidades. O diagnóstico é obtido por isolamento do vírus ou através da identificação de anticorpos, antígenos ou ácido nucleico. As serologias para o PRRSV normalmente detetam os anticorpos 14-21 dias pós-infecção mas não permitem a distinção entre o vírus de campo e o vacinal. Os principais objetivos deste trabalho foram a avaliação dos perfis serológicos da descendência relativamente aos anticorpos contra o PRRSV numa exploração intensiva e a determinação da melhor idade para obter as amostras usando os porcos como sentinelas, usando um total de 66 amostras provenientes de suínos de diferentes idades. A proporção de animais seropositivos foi 75,0% na maternidade, 33,3% no desmame e 95,8% na engorda, sendo 46 vezes mais provável de encontrar-se animais seropositivos na engorda comparativamente com o desmame ($P < 0,01$). Estimou-se ($P < 0,001$) uma rápida diminuição dos anticorpos de origem materna até à sexta semana de idade, seguindo um aumento progressivo da imunidade humoral até 21 semanas de idade. O PRRSV foi detetado, por PCR, no soro de animais com 6, 9 e 15 semanas de idade. Os resultados indicam que os leitões podem apresentar-se virémicos no desmame, e as 18-21 semanas são a melhor idade para recolha de amostras dos animais em crescimento, como sentinelas, em explorações infetadas.

Palavras-chave: Animais sentinelas; ELISA; Epidemiologia; PCR; *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*

Abstract

PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) is a swine disease which appeared simultaneously in Europe (early 1990s) and North America (late 1980s) and is one of the major diseases nowadays that affect the swine industry worldwide, being responsible for losses of \$664 million annually in U.S.A. PRRS is caused by the virus PRRSV, which is divided into two major genotypes, the type I (European) and type II (North American), which are antigenically, genetically and clinically different. PRRS is characterized by respiratory problems, like cough and dyspnea, in growing pigs and reproductive failure in sows, with late term abortion, stillbirth and increased preweaning mortality. The diagnosis is obtained by virus isolation or by the identification of antibodies, antigens or nucleic acid. Serological tests for PRRSV normally detect serum antibody response after 14-21 days post-infection, but do not allow the distinction between infected and vaccinated animals. The main objectives of the present study were to evaluate the offspring serum profile of antibodies against PRRSV in an affected intensive herd and determine the better sample time using pigs as sentinels, using a total of 66 samples of swine of different ages. The proportion of seropositive animals was 75.0% at farrowing, 33.3% at nursery and 95.8% and growing/finishing phases, being 46 times more likely to meet seropositive animals in fattening compared with weaning ($P < 0.01$). It was estimated ($P < 0.001$) a rapid decrease of antibodies of maternal origin until the sixth week of age, followed by a progressive increase of humoral immunity until 21 weeks of age. PRRSV was detected by PCR in the serum of animals with 6, 9 and 15 weeks. The results indicate that the piglets may present viremic weaning and the 18th – 21st weeks are the best time to collect samples from offspring pigs, as sentinel, from PRRSV contaminated intensive herds.

Keywords: Animal sentinels; ELISA; Epidemiology; PCR; Porcine reproductive and respiratory syndrome

Índice Geral

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. ETIOLOGIA.....	3
2.1. Classificação do PRRSV	3
2.2. Genoma e expressão genética	3
2.3. Componentes Virais.....	5
2.3.1. Proteínas não estruturais (<i>NSP</i>)	5
2.3.2. Proteínas estruturais	6
2.3.3. O virião do PRRSV	8
2.4. Diversidade genética do vírus PRRSV	8
2.4.1. Mecanismos de diversificação genética	8
2.4.2. Diversidade fenotípica e genotípica	10
3. EPIDEMIOLOGIA	12
3.1. Distribuição geográfica.....	12
3.2. Espécies sensíveis.....	12
3.3. Transmissão	12
3.3.1. Transmissão horizontal.....	12
3.3.2. Transmissão vertical	13
3.4. Exposição ao vírus.....	14
3.5. Transmissão intra- e inter- explorações.....	14
4. PATOGENIA, FORMAS CLÍNICAS E QUADRO LESIONAL.....	16

4.1. Replicação no hospedeiro	16
4.2. Sinais clínicos	17
4.2.1. Infecção epidémica	18
4.3. Infecção endémica	22
4.4. Fatores que afetam a gravidade da doença.....	23
4.5. Lesões.....	24
4.5.1. Lesões singulares descritas na Ásia	27
5. IMUNIDADE.....	28
5.1. Resposta Imunitária à infecção por PRRSV	28
5.1.1. Imunidade inata.....	28
5.1.2. Imunidade humoral.....	30
5.1.3. Imunidade celular.....	31
5.1.4. Resposta imunitária anamnésica	32
5.2. Imunidade homóloga, imunidade heteróloga e proteção cruzada.....	32
5.3. Imunidade de origem materna.....	33
5.4. Desregulação imunitária pelo PRRSV.....	34
5.4.1. Inibição da imunidade inata e atraso na resposta imunitária adaptativa	34
5.4.2. Consequências da rápida diferenciação de linfócitos policlonais B nos centros germinativos	34
5.4.3. Diferenciação dos Linfócitos T no Timo comprometida	35
5.4.4. Indução dos Linfócitos T Citotóxicos (CTL) comprometida	35
5.4.5. Evasão Imunitária devido ao <i>NSP2</i>	36
6. DIAGNÓSTICO	38
6.1. Detecção de anticorpos	38
6.1.1. Os Anticorpos IgM e IgG	38
6.1.2. ELISA	39
6.1.3. IFA (<i>Indirect Fluorescent Antibody</i>).....	40
6.1.4. SVN (<i>Serum-virus neutralization test</i>)	41

6.2. Isolamento do vírus.....	42
6.3. Detecção do vírus:	42
6.3.1. Anticorpos fluorescentes e Imunohistoquímica.....	42
6.3.2. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	43
6.4. Outras técnicas de diagnóstico.....	45
6.4.1. Testes rápidos.....	45
6.4.2. Fluidos orais.....	45
6.5. Classificação das estirpes (tipificação)	46
7. CONTROLO E ERRADICAÇÃO DA PRRS NAS EXPLORAÇÕES	48
7.1. Classificação das explorações.....	48
7.2. Práticas de redução da carga viral.....	50
7.2.1. McREBEL™ PRRS.....	50
7.2.2. Biossegurança	52
7.2.3. Higienização	53
7.3. Imunização de explorações suínicas.....	53
7.3.1. Vacinação: vacinas vivas modificadas vs vacinas mortas	53
7.3.2. Exposição ao PRRSV de campo	63
7.3.3. Estratégias de imunização	64
7.4. Erradicação.....	67
7.4.1. Despovoamento	67
7.4.2. Análise e remoção	68
7.4.3. Desmame e remoção	69
7.4.4. Encerramento da exploração	69
8. CONCLUSÃO	72
OBJETIVOS.....	73
MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
RESULTADOS	78
DISCUSSÃO	82
CONCLUSÃO	85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS87

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática de uma partícula viral da família Arteriviridae.....	4
Figura 2. Ciclo produtivo em suinicultura intensiva.	15
Figura 3. Sequelas de necrose auricular em suínos de engorda.	18
Figura 4. Nados-mortos e fetos mumificados.....	20
Figura 5. Leitão recém-nascido infetado por PRRSV.....	21
Figura 6. Comparação de leitões infetados experimentalmente (A) e leitões não infetados (B), aos 22 dias pós-inoculação do vírus VR-2332.	22
Figura 7. Pulmão de suíno infetado por PRRSV.	25
Figura 8. Linfadenopatia de leitão infetado com 6 semanas pós-desmame.	26
Figura 9. Colheita de sangue da veia cava superior	75
Figura 10. Colheita de sangue da veia cava superior	75
Figura 11. Previsão de valores S/P de acordo as idades dos porcos, considerando todos os animais positivos e negativos para anticorpos PRRSV.....	79
Figura 12. Previsão dos valores S/P de acordo com as idades dos porcos, considerando apenas os animais positivos para anticorpos PRRSV.	79
Figura 13. Alinhamento da amostra em estudo com a estirpe Europeia	81

Índice de Tabelas

Tabela 1. Funções das proteínas virais não estruturais e estruturais	7
Tabela 2. Excreção e exposição virais de acordo com cada categoria de classificação da exploração.....	49
Tabela 3. Programa McREBEL [®] PRRS.....	51
Tabela 4. Medidas gerais de biossegurança interna	52
Tabela 5. Principais características dos tipos de vacinas.....	56
Tabela 6. Planos de vacinação dos animais de reposição	60
Tabela 7. Planos de vacinação do efetivo reprodutor.....	61
Tabela 8. Planos de vacinação dos animais em crescimento.....	62
Tabela 9. Resultado dos testes ELISA e PCR	80
Tabela 10. Homologia da amostra em estudo comparativamente à estirpes de referência. .	81

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ADV – Aujeszky Disease virus (vírus da doença de Aujeszky)
AID - Activation-Induced Deaminase
APOBEC - Apolipoprotein B Editing Catalytic Polypeptide
APP - *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Apx – Exotoxina do *Actinobacillus Pleuropneumoniae*
ARN – Ácido Ribonucleico
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
CD169 - Sialoadesina
CTL - Cytotoxic T Lymphocytes (linfócitos T citotóxicos)
DR-ELISA - Double Recognition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EAV - Equine Viral Arteritis (vírus da Arterite Equina)
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay test
EUA – Estados Unidos da América
FA - Fluorescent antibody (Anticorpos fluorescentes)
GP – Glicoproteína
HP-PRRSV - Highly-pathogenic PRRSV
IFA - Indirect Fluorescent Antibody test
IFN - Interferão
Ig – Imunoglobulina
IgCC - Ig-containing cells (células que contêm imunoglobulinas)
IHC – Immunohistochemistry (Imunohistoquímica)
IL - Interleucina
IRF - Interferon Regulatory Factor
ISG's - IFN-Stimulated Genes
JAK/STAT - Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription
Kb – Kilobase
KNAP1 - Karyopherin-alpha1
LDV - Lactate Dehydrogenase-elevating Virus (Vírus que eleva a Lactato Desidrogenase)
NK cells - Natural Killer cells (Linfócitos Natural Killer)
Th cells – T helper cells (Linfócitos T auxiliares)
LPS - Lipopolissacarídeos
LV - Lelystad virus (vírus Lelystad)
mARN - ARN mensageiro

McREBEL™ - Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses
MDSC - Myeloid-derived Suppressor Cell
MHC - Major Histocompatibility Complex
MLV – Vacina viva modificada
Mo-DC - Células Dendríticas Derivadas de Monócitos
NF-κB - Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells
nm – nanómetro
NSP – Non-Structural proteins (proteína não estrutural)
ORF - Opening Reading Frame
MAP –Macrófagos Alveolares Pulmonares
PCP - Papaian-like Cysteine Protease
PCR - Polymerase Chain Reaction
PCV – Porcine Circovirus
pDC - Plasmacytoid dendritic cells
PED - Porcine Epidemic Diarrhoea (Diarreia Epidémica dos Suínos)
MIP - Macrófagos Intravasculares Pulmonares
PMWS - Porcine multisystemic wasting syndrome
PRRS - Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
PRRSV - Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
r - Coeficiente de Correlação
R² - Coeficiente de Regressão
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
RLR - Retinoic-acid-inducible
RSD - Residual Standard Deviation
RTC - Replication and Transcription Complex
RT-PCR - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S/P - Sample-to-positive Values
sg mARN - mARN subgenómico
SHFV – Simian Haemorrhagic Fever virus
STAT1 - Signal Transducer and Activator of Transcription 1
SVN - Serum Virus Neutralization test
Tbp2 - Proteína de superfície do *Actinobacillus Pleuropneumoniae*
TCID - Tissue culture infective dose
TEC - Thymic Epithelial Cells
TNF - Fatores de necrose tumoral
VN - anticorpos neutralizantes do vírus

WPDV - wobbly possum disease virus

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

O vírus PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus* - PRRSV) é o agente etiológico da doença mundialmente epidêmica PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*). O PRRSV é um vírus pequeno e encapsulado, e é altamente específico quanto ao hospedeiro, o suíno, e quanto ao tecido, as células da linha monocitária, preferencialmente os macrófagos alveolares suínos (Duan *et al.*, 1997a; Villarreal *et al.*, 2000).

A PRRS surgiu no final dos anos 80 como uma doença suína misteriosa nos Estados Unidos da América (Keffaber, 1989; Wensvoort *et al.*, 1991). Quase simultaneamente, no início dos anos 90, surgira uma doença reprodutiva semelhante na Europa (Wensvoort *et al.*, 1991; Bischoff *et al.*, 2000). Os sinais clínicos presentes eram respiratórios com destaque para a dispneia e/ou hiperpneia em suínos jovens e problemas reprodutivos generalizados em porcas gestantes, incluindo fetos mumificados, abortos ou partos prematuros (Goyal, 1993).

Apesar do aparecimento quase simultâneo e da semelhança dos sinais clínicos, os vírus Europeu e Norte-Americano variam significativamente no seu genótipo, aproximadamente 40% (Nelsen *et al.*, 1999). Estes dois vírus são representados em dois genótipos distintos: o genótipo Europeu (Tipo 1) e o genótipo Norte-Americano (Tipo 2), representados pelo *Lelystad virus* (LV) e VR-2332 como vírus protótipos, respetivamente (Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992).

A origem do PRRSV é desconhecida, mas a existência de duas estirpes geneticamente diferentes, sugere que ambas evoluíram independentemente em continentes distintos por um período de tempo prolongado, divergindo de um ancestral comum. Esta evolução terá ocorrido em espécies reservatório não-suínas. (Nelsen *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 2001; Hanada *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2013). Murtaugh *et al.*, (2010) referem que o vírus poderá ter origem na Eurásia num hospedeiro ancestral e que a estirpe PRRSV Tipo 2 divergiu após a introdução de suínos infetados pelo PRRSV no Norte da América, há mais de 500 anos. No entanto, e segundo estes investigadores, a divergência entre as estirpes de PRRSV indica que a industrialização da produção suína está fortemente envolvida na evolução do PRRSV. O vírus foi progredindo através das populações suínas na Europa e no Continente Norte Americano e atualmente está presente na grande maioria dos países com atividade suinícola, onde provoca elevadas perdas económicas (Murtaugh *et al.*, 2010; Holtkamp *et al.*, 2012).

A presente revisão teve como objetivo principal descrever de forma global e completa a PRRS, abordando através dos diversos capítulos a etiologia, epidemiologia, patologia, imunologia, quadros lesionais, sintomatologia e diagnóstico, assim como descrever os principais aspetos do controlo, erradicação e prevenção desta síndrome em explorações suínícolas intensivas.

2. ETIOLOGIA

2.1. Classificação do PRRSV

O PRRSV é classificado como membro da família *Arteriviridae*, pertencente à ordem *Nidovirales*, que inclui também as famílias *Coronaviridae* e *Roniviridae*. A ordem *Nidovirales* é constituída por vírus ARN de cadeia simples e polaridade positiva, que possuem a mesma estratégia de replicação/transcrição e possuem organização genómica semelhante, mas diferem nos hospedeiros, no fenótipo da doença, tropismo celular, morfologia do virião e tamanho genómico (Baker *et al.*, 2012). A família *Arteriviridae* é composta por 5 espécies, as quais são semelhantes quanto à sua organização e conteúdo genómico, morfologia e tropismo celular para a linhagem macrofágica (Faaberg *et al.*, 2012). As espécies incluem o PRRSV, o vírus da febre hemorrágica símia (*Simian haemorrhagic fever virus* – SHFV), o vírus que eleva o lactato desidrogenase (*Lactate dehydrogenase-elevating virus* – LDV), o vírus da doença do Cusu-de-orelhas-grandes vacilante (*wobbly possum disease virus* - WPDV) e o vírus da arterite equina (*Equine arteritis virus* – EAV) (Plagemann and Moennig, 1992; Baker *et al.*, 2012; Dunowska *et al.*, 2012).

O PRRSV possui duas linhas genéticas principais representadas pelo genótipo Tipo 1 (Europeu) e o Tipo 2 (Norte-Americano). Ambos foram descobertos no início da década de 90 nos respetivos continentes e atualmente encontram-se distribuídos mundialmente, com o Tipo 1 com maior predominância na Europa e o Tipo 2 com maior predominância no Norte da América e Ásia. Apesar do fenótipo da doença, os sinais clínicos, a organização genómica e o surgimento serem similares, as duas estirpes do PRRSV diferem aproximadamente 40% a nível genómico (Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Meulenberg *et al.*, 1994; Nelsen *et al.*, 1999).

2.2. Genoma e expressão genética

A organização do genoma é semelhante a outros vírus da família *Arteriviridae*, constituído por uma cadeia única com polaridade positiva, que varia entre 14.9 kb a 15.5 kb, organizada em 10 *ORF* (*Opening Reading Frame*). As *ORF*s são expressas a partir do ARN genómico diretamente ou através de um intermediário, o mARN subgenómico (sg mARN), do qual são traduzidas as proteínas estruturais que constituem o virião (Zimmerman *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2013; Kappes *et al.*, 2015).

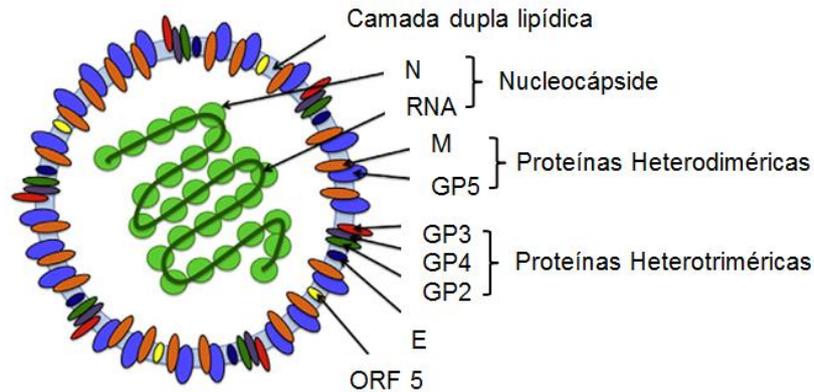


Figura 1. Representação esquemática de uma partícula viral da família Arteriviridae.

Legenda: A membrana contém os complexos maioritários GP5/M (glicoproteína/ proteína de membrana não glicosilada), os complexos glicoproteicos minoritários GP2, GP3 e GP4, a proteína hidrofóbica E e a proteína ORF 5. ORF- *Open Reading Frame*. A proteína N e o ARN viral formam a Nucleocápside. (adaptado de Veit *et al.* 2014)

As ORFs 1a e 1b compreendem cerca de 80% do genoma e codificam a proteína de clivagem, de recombinação homóloga e o mecanismo de replicase do ARN necessário para a transcrição viral, replicação e imunomodulação. Codificam 14 proteínas não-estruturais. As restantes oito ORFs (2, 2b, 3, 4, 5, 5a, 6 e 7), na parte terminal do genoma, codificam as proteínas estruturais virais, cuja tradução é intermediada pelo sg mARN (Zimmerman *et al.*, 2012). A sg mARN2 codifica o ORF 2a e ORF 2b que se traduz em Glicoproteína 2 (GP2) e proteína E. O sg mARN3 e o sg mARN4 codificam a ORF 3 e ORF 4, respetivamente, que se traduzem em GP3 e GP4, respetivamente (van Merle *et al.*, 1999; Wissink *et al.*, 2005; Kimman *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010). A formação de sg mARN não é aleatória, sendo o sg mARN7 o mais abundante, seguido do sg mARN6 e sg mARN5. A abundância de proteínas estruturais segue o mesmo padrão, sendo a proteína N a mais abundante, seguida pela proteína M e GP5 da ORF7, ORF6 e ORF5, respetivamente (Faaberg *et al.*, 1995, Mardassi *et al.*, 1996).

As sequências dos extremos do genoma não traduzíveis (5' e 3') estão envolvidas como componentes essenciais que contribuem para a replicação e translação. No entanto, as funções exatas dos dois extremos e a interação com estes mecanismos são ainda pouco conhecidas. As estirpes Tipo 1 e 2 assemelham-se em cerca de 50%, e dentro de cada estirpe cerca de 96% (Meulenberg *et al.*, 1993; Nelsen *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002).

O sg mARN heteróclito é um de tipo de sg mARN que se distingue da forma dos outros e são normalmente observados condições de elevada multiplicação viral. Foram

identificados em células infectadas, víriões purificados, macrófagos alveolares suínos infectados em condições naturais, e assume-se que resultem da recombinação homóloga de sequências nucleotídicas atípicas. Atualmente, a função deste tipo de sg mARN é desconhecida, mas tem sido proposto como vetor para estudar o efeito de fatores virais, ou o efeito e elementos exógenos na replicação e tradução viral ou resposta/modulação imunitária (Yuan *et al.*, 2000, 2004).

2.3. Componentes Virais

2.3.1. Proteínas não estruturais (NSP)

Apesar da intensa investigação realizada ao PRRSV, pouco se sabe relativamente à estrutura e função da maioria das suas NSPs. As proteínas não estruturais do vírus são codificadas pela *ORF 1a* e *ORF 1b*. O PRRSV possui uma estrutura *loop* invulgar no final da *ORF 1a* que, durante a tradução, permite “saltar” o codão de terminação, resultando na tradução da *ORF 1b* na poliproteína pp1ab. Esta poliproteína é composta por todas as NSPs conhecidas (*NSP1α/β*, *NSP2-6*, *NSP7α/β* e *NSP8-12*). A *ORF1a* codifica a poliproteína pp1a que é composta pelos *NSP1-8*. Estas proteínas não estruturais são necessárias para a transcrição viral, replicação e imunomodulação (Zimmerman *et al.*, 2012; Kappes *et al.*, 2015).

Relativamente às *NSP1α* e *NSP1β*, estas estão envolvidas na clivagem autocatalítica nas junções *NSP1α/1β* (den Boon *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010) e *NSP1β/2* (den Boon *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2010) respetivamente. Adicionalmente a *NSP1α* e *NSP1β* contêm proteases PCPα (*papain-like cysteine protease α*) e PCPβ, respetivamente, que aparentemente são necessárias na síntese de sg mARN e ARN genómico, respetivamente (Kroese *et al.*, 2008).

A *NSP2* é uma proteína grande que varia o seu tamanho entre diferentes estirpes (Allende *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2004). É a NSP mais variável, possuindo apenas 32% de homologia entre os subtipos (Allende *et al.*, 1999). É responsável pela clivagem autocatalítica da junção *NSP2/3* (Han *et al.*, 2009). Quanto à *NSP3*, esta aparenta estar envolvida na formação dos complexos de replicação e na fixação de outras NSPs nas membranas desses mesmos complexos (Han *et al.*, 2009; Posthuma *et al.*, 2008). A *NSP4* é ativada com a clivagem da *NSP2/3* e contém a protease (*3C-like serine proteinase*) responsável pelo processamento de todas as nps's com exceção das *NSP1α/1β*, *NSP1β/2* e *NSP2/3* (Snijder *et al.*, 1996; van Dinten *et al.*, 1999; Ziebuhr *et al.*, 2000). A *NSP4* pode estar também envolvida na regulação do processamento da poliproteína viral (van Aken *et al.*, 2006b).

Relativamente às *NSP5*, *NSP6*, *NSP7*, *NSP8* e *NSP12*, não foram demonstradas as suas funções específicas e as suas estruturas até à data. A *NSP7* contém um local

de clivagem interna, resultando nas proteínas *NSP7 α* e *NSP7 β* no vírus EAV (van Aken *et al.*, 2006a) e presumivelmente também no PRRSV. As restantes *NSP9*, *NSP10* e *NSP11* são as proteínas mais conservadas entre os nidovírus (Gorbalenya *et al.*, 2006). A função destas proteínas ainda é desconhecida, apesar de a estrutura já estar descrita (van Dinten *et al.*, 1996; Bautista *et al.*, 2002; Nedialkova *et al.*, 2009).

Foi demonstrada a modelação da resposta imunitária inata mediada por interferões por ação de *NSP*s (*NSP1 α* , *NSP1 β* , *NSP2*, *NSP4* e *NSP11*) com diferentes intensidades (Beura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

2.3.2. Proteínas estruturais

A proteína N é um polipéptido pequeno e básico que interage com o ARN viral na formação da proteína nucleocápside. É expressa em níveis elevados em células infetadas e representa 20 a 40% da proteína total do virião. A sua elevada expressão e antigenicidade são importantes para testes diagnósticos imunológicos, mas é ainda desconhecida a funcionalidade dos anticorpos contra a proteína N no sistema imunitário (Meulenberg *et al.*, 1995; Dea *et al.*, 2000; Murtaugh *et al.*, 2002a). A proteína N está incorporada no viriões como dímeros ligados por dissulfureto (Mardassi *et al.*, 1996; Wootton and Yoo, 2003).

O invólucro viral contém 2 proteínas de membrana maioritárias (M e GP5) e 4 proteínas de membrana minoritárias (E, GP2, GP3 e GP4) que são necessárias para a produção e infecciosidade dos viriões. No entanto, as 4 proteínas minoritárias são dispensáveis na montagem do vírus (Wieringa *et al.*, 2004; Wissink *et al.*, 2005).

A proteína E encontra-se na membrana viral e promove o desencapsulamento do virião e posterior libertação do genoma viral no citoplasma (Lee and Yoo, 2006). A GP3 é altamente glicosilada e os seus glicanos na superfície viral previnem o reconhecimento de epítomos pelos anticorpos neutralizantes (Das *et al.*, 2010; Vu *et al.*, 2011).

A GP4 possui um epítomo neutralizante na região hipervariável que pode estar associado às proteínas E, GP2 e GP3 através de interações não-covalentes (Meulenberg *et al.*, 1997; Wissink *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2010). As GP2, GP3 e GP4 formam um involucro complexo proteico trimétrico. A presença das três proteínas é importante para a infecciosidade do virião (Wissink *et al.*, 2005). O complexo permite mediar a infeção com ou sem a interação da GP5 (Das *et al.*, 2010; Wissink *et al.*, 2005).

A GP5 é a proteína do PRRSV mais estudada devido à sua elevada diversidade genética e devido ao seu papel na virulência, interação com o hospedeiro e imunidade. A GP5 contém vários epítomos neutralizantes (Wissink *et al.*, 2003; Zimmerman *et al.*,

2012). A proteína M é a proteína de membrana mais conservada (Dea *et al.*, 2000). Associadas, a GP5 e a M formam o heterodímero GP5-M ligados por pontes de dissulfureto que são incorporados no invólucro do virião, essencial para a formação do virião. A simples associação GP5-M não é suficiente para a infecciosidade viral (Wissink *et al.*, 2005; Kimman *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010).

A tabela 1 resume todas as funções tanto das proteínas não estruturais como das proteínas estruturais.

Tabela 1. Funções das proteínas virais não estruturais e estruturais

Tipo	Proteína	Função
Proteínas não estruturais (NSP)	NSP1 α	Clivagem autocatalítica na junção NSP1 α / β Participa na síntese do sg mARN genômico Modelação da resposta imunitária inata mediada por interferões
	NSP1 β	Clivagem autocatalítica na junção NSP1 β /2 Participa na síntese do ARN genômico Modelação da resposta imunitária inata mediada por interferões
	NSP2	Clivagem autocatalítica na junção NSP2/3 Modelação da resposta imunitária inata mediada por interferões
	NSP3	Formação dos complexos de replicação Fixação das outras NSP's nas membranas dos complexos de replicação
	NSP4	Clivagem autocatalítica das restantes junções NSP's Possível regulação do processamento da poliproteína viral Modelação da resposta imunitária inata mediada por interferões
	NSP11	Modelação da resposta imunitária inata mediada por interferões
Proteínas Estruturais	N	Formação da proteína nucleocápside (com o ARN viral) Formação do virião
	M GP5	Formação do virião Participam na infecciosidade viral
	GP4 GP3 GP2	Participam conjuntamente na infecciosidade viral
	E	Desencapsulamento do virião Libertação do genoma viral no citoplasma

2.3.3. O virião do PRRSV

O virião do PRRSV é a forma infecciosa do PRRSV e é uma estrutura de forma esférica ou em forma de ovo, com diâmetro que varia entre 50nm a 74nm. O virião é constituído pela nucleocápside, formada pela proteína N e ARN viral, rodeada por um invólucro formado por 6 proteínas estruturais: E, GP2, GP3, GP4, GP5 e a proteína M (Snijder *et al.*, 1998; Dea *et al.*, 2000).

Através da microscopia eletrónica, é possível visualizar estas partículas que possuem uma superfície lisa com algumas protuberâncias, coincidindo com as pequenas formações das proteínas GP5 e M, correspondendo aproximadamente 2nm de comprimento. Outras protuberâncias são também observáveis na superfície da membrana com 10nm a 15nm, provavelmente correspondendo às restantes proteínas estruturais (Wissink *et al.*, 2005).

2.4. Diversidade genética do vírus PRRSV

2.4.1. Mecanismos de diversificação genética

A variação genética do ARN viral é assumida como resultado de erros da ARN polimerase, sendo esta a explicação mais simples para a diversidade do PRRSV. De acordo com Jenkins *et al.*, (2002) e Hanada *et al.*, (2005), a taxa de substituição de nucleótidos do PRRSV é a mais alta dos vírus ARN, de 4,7-9,8 x 10⁻²/local/ano. No entanto, existem outros mecanismos de modificação ribonucleotídica que podem contribuir para a diversidade genética.

A recombinação é também importante na diversidade do PRRSV e tem um papel importante na biologia do PRRSV pois é necessária para a formação do sg mARN. A recombinação tem de ser elevada para a produção de sg mARN em grandes quantidades, e bastante promiscua, pois a quantidade de ARN heteróclito é semelhante à do sg mARN. Deste modo, a recombinação ocorre em locais semelhantes na sequência entre as moléculas ARN genómicas em células infetadas nos processos de transcrição ou replicação genómica. Em células infetadas com apenas um vírus, os genomas recombinantes não são distinguíveis dos genomas não-recombinantes e, em alternativa, as formas recombinantes não completas, não são funcionais. No entanto, em células infetadas por dois vírus distintos, a recombinação deverá aumentar a substituição aleatoriamente, proporcional ao grau de diferença das sequências, mas as substituições não seriam independentes (Murtaugh *et al.*, 2010). Estudos anteriores demonstraram que os Tipo 1 e Tipo 2 do PRRSV revelam recombinações frequentes em condições *in vitro* (Yuan *et al.*, 1999; van Vugt *et al.*, 2001; Murtaugh *et al.*, 2002b), demonstrando que a recombinação genómica contribui

para a variação das estirpes de campo (Murtaugh *et al.*, 2010) sendo, porém, a frequência destas recombinações mais baixa (Shi *et al.*, 2010a).

A maioria das recombinações naturais identificadas diz respeito apenas a alterações de sequências simples e individuais, e não novas estirpes recombinantes (Murtaugh *et al.*, 2001; Forsberg *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010a). Em alternativa, os atuais estudos podem subestimar a avaliação da recombinação no campo devido às limitações na vigilância (focalizado apenas numa curta porção do genoma da *ORF5* à *ORF7*) ou na falha da metodologia. A deleção e/ou inserção de nucleótidos, que têm sido observadas nas sequências que codificam as proteínas não-estruturais e estruturais, são também evidências da recombinação genética (Murtaugh *et al.*, 2010).

A modificação do genoma do PRRSV pode ser devida, no entanto, a mecanismos não virais. Como a replicação viral ocorre no hospedeiro, ou seja, no citoplasma dos macrófagos dos suínos, a presença de bases de ribonucleótido não padrão, que contêm modificações simples ou complexas, podem comprometer o emparelhamento das bases complementares durante a replicação. Isto explica a elevada incidência de substituição de nucleótidos que caracteriza a replicação do ARN (Murtaugh *et al.*, 2010).

Os vertebrados possuem mecanismos de modificação nucleotídica necessária para a produção proteica e, aparentemente, para defesa contra infeções virais. A desaminação da citosina em uracilo através da enzima AID (*activation-induced deaminase*) é fundamental na diversificação de anticorpos nos vertebrados. A proteína APOBEC (*apolipoprotein B editing catalytic polypeptide*) limita a replicação viral numa grande variedade de vírus e desamina os substratos de ARN e ADN (Hughes *et al.*, 1996; Bishop *et al.*, 2004; Franca *et al.*, 2006; Murtaugh *et al.*, 2010). Nos suínos, a maioria das proteínas APOBEC3 localizam-se no citoplasma, possibilitando que mutação induzida pelo hospedeiro seja também responsável pela evolução do PRRSV (LaRue *et al.*, 2008). Por outro lado, Tanaka *et al.*, (2006) referem que a expressão da APOBEC3G em humanos é induzida pelo interferão α indicando que a desaminação da citosina é em parte induzida por interferões da resposta imunitária antiviral inata. Deste modo, evolução do PRRSV é também influenciada pela resposta imunitária antiviral (Murtaugh *et al.*, 2010).

O PRRSV é um vírus dinâmico na natureza, estando em contínua e rápida evolução. A presença de recombinações na análise de sequências específicas do genoma, a observação direta em culturas celulares ou em animais, e a ocorrência frequente de inserções ou deleções, juntos, indicam que a recombinação é um mecanismo importante para diversidade genética do vírus. Apesar da ocorrência de

falhas na replicação viral ser a melhor explicação da diversificação do PRRSV, as influências dos mecanismos específicos de modificação dos ribonucleotídeos anti-PRRSV são do mesmo modo importantes. O PRRSV poderá ter mecanismos que permitam combater os mecanismos de defesa do hospedeiro, permitindo a sua sobrevivência e variação genética (Murtaugh *et al.*, 2010). No entanto, existem poucos estudos direcionados para a compreensão da interação entre o PRRSV e o hospedeiro, com o objetivo do sucesso da recombinação (Kappes *et al.*, 2015).

2.4.2. Diversidade fenotípica e genotípica

A rápida evolução do PRRSV resulta numa enorme diversidade de estirpes com diferentes graus de patogenicidade. Desde o aparecimento do PRRS nos Estados Unidos da América em 1987 (Keffaber, 1989), foram surgindo novos vírus distintos do protótipo VR-2332 norte-americano (Collins *et al.*, 1992). Na Europa, observaram-se manifestações da doença semelhantes às da América. No entanto, foram observadas diferenças antigénicas entre os vírus isolados de diferentes países europeus, estes que eram substancialmente diferentes dos vírus isolados nos Estados Unidos e Canadá (Paton *et al.*, 1991; Albina *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1992; Plana Duran *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992; Drew *et al.*, 1995).

A sequenciação do genoma do PRRSV confirmou as diferenças antigénicas. Na análise da sequência que codifica a glicoproteína GP5, os vírus europeu e norte-americano revelaram apenas 55% de homologia (Murtaugh *et al.*, 1995), resultando na classificação de dois genótipos diferentes, os atuais PRRSV Tipo 1 e o PRRSV Tipo 2. As estirpes variantes do PRRSV Tipo 2 diferenciavam-se entre si aproximadamente 10% no seu genótipo (Murtaugh *et al.*, 1995; Andreyev *et al.*, 1997; Meng, 2000; Dee *et al.*, 2001b). As estirpes variantes do PRRSV Tipo 1 eram consideradas menos heterogénicas (Suárez *et al.*, 1996; Indik *et al.*, 2000) até que foi comprovada que as estirpes europeias possuíam diferenças genéticas semelhantes ou superiores (2-90% de homologia) (Stadejek *et al.*, 2002). Estas variações refletem o grau de patogenicidade causado por diferentes estirpes (Halbur *et al.*, 1995; 1996a).

Alguns exemplos de casos que demonstram a diversidade do PRRSV são a variante “atípica” que surgiu no Iowa, E.U.A., nos anos 90 (Meng *et al.*, 1996a; Mengeling *et al.*, 1998), o aparecimento de uma nova classe de PRRSV chamada MN184, no Minnesota, E.U.A., em 2001 (Han *et al.*, 2006) e o PRRSV Tipo 2 altamente patogénico (*highly-pathogenic* PRRSV – HP-PRRSV) que surgira em 2006 na China e posteriormente na maioria dos países asiáticos (Tian *et al.*, 2007). Desde o aparecimento do PRRS, têm surgido exemplos episódicos de vírus bastante virulentos em diferentes regiões do mundo, sendo o resultado de divergências do genoma do

PRRSV significativas, desde inserções ou deleções no *NSP2* (Brockmeier *et al.*, 2012) a sequências recombinadas (Shi *et al.*, 2013).

A diversidade fenotípica e genotípica do PRRSV é o resultado da persistência, replicação e recombinação do próprio vírus, obtendo assim um genoma viral extramente flexível. O vírus consegue assim permanecer no hospedeiro, ultrapassando as tentativas de erradicação por parte da resposta imunitária do suíno, vacinação ou outros meios.

3. EPIDEMIOLOGIA

3.1. Distribuição geográfica

A PRRS encontra-se presente na maioria dos países com atividade suinícola, havendo apenas algumas significantes exceções. Na Europa, países como a Suécia, Noruega, Finlândia e Suíça encontram-se livres da doença. Na Oceânia, a Nova Caledônia, Nova Zelândia e Austrália são países que estão também livres da doença. Na América do Sul, o Brasil, a Argentina, Cuba e algumas áreas das Caraíbas, são também considerados livres da PRRS. A prevalência de infecção pelo vírus de campo nos diversos países onde existe a doença ainda não foi determinada. Mas é estimado que, nas regiões com elevada densidade de suínos infetados, cerca de 60% a 80% dos efetivos apresente seroconversão. Por outro lado, o cálculo da seroprevalência pode revelar-se complicado devido à presença de anticorpos derivados da vacina, indistinguíveis nas serologias (Zimmerman *et al.*, 2012).

3.2. Espécies sensíveis

Cada espécie da família *Arteriviridae* infeta apenas uma espécie animal, contrariamente a alguns vírus da família *Coronaviridae* (Hilgenfeld and Peiris, 2013). Deste modo, foram determinadas várias espécies as quais o PRRSV não afeta, como o rato e a ratazana (Rosenfeld *et al.*, 2009) e não foi encontrada qualquer evidência de replicação do PRRSV em espécies como o cão, gato, guaxinins, pardal ou estorninho (Wills *et al.*, 2000a). Contudo, nas observações de Zimmerman *et al.*, observou-se que o pato-real (*Anas platyrhynchos*) é sensível ao vírus (Zimmerman *et al.*, 1997), assim como os suínos selvagens (Albina *et al.*, 2000; Wyckoff *et al.*, 2009).

O PRRSV não é infeccioso para humanos, não sendo uma zoonose e não possui significância para a saúde pública (Zimmerman *et al.*, 2012).

3.3. Transmissão

O PRRSV é transmitido tanto horizontalmente (infecção de porco para porco) como verticalmente.

3.3.1. Transmissão horizontal

A transmissão horizontal do PRRSV ocorre através do contato direto ou indireta entre suínos. A transmissão do PRRSV através do contato direto entre suínos ocorre entre populações e dentro da mesma população suína com animais infetados. Essa transmissão ocorre através das secreções e excreções incluindo saliva, secreções nasais, sangue, urina, sémen e ocasionalmente fezes (Rossow *et al.*, 1994a; Swenson

et al., 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1997a). O vírus pode ser também excretado por secreções da glândula mamária em fêmeas gestantes sensíveis quando infetadas no final da gestação (Wagstrom *et al.*, 2001).

A transmissão do PRRSV através do sémen é uma preocupação atual devido ao uso extensivo da inseminação artificial. O PRRSV infeccioso e o ARN do PRRSV foram detetados em estudos onde foram infetados experimentalmente varrascos a partir dos 43 e 92 dias pós-infecção, respetivamente (Swenson *et al.*, 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995).

O PRRSV é um vírus persistente e esta característica resulta numa infeção na qual o vírus está presente em níveis baixos nos animais infetados. O mecanismo que permite ao vírus evadir-se da resposta imunitária é ainda desconhecido, mas a persistência do PRRSV é importante na transmissão viral pois permite que esta seja longa (Wills *et al.*, 1997b; Allende *et al.*, 2003).

A transmissão horizontal do PRRSV por contato indireto entre suínos é igualmente importante. O contato com fomites (objetos contaminados, com destaque para as botas e a roupa dos trabalhadores, e agulhas contaminadas), com os próprios profissionais e com insetos vetores (moscas e mosquitos) são alguns dos exemplos de transmissão indireta (Otake *et al.*, 2002a, 2002b; Dee *et al.*, 2003; Otake *et al.*, 2004). Os veículos de transporte são também um potencial meio de transmissão de PRRSV (Dee *et al.*, 2004). A transmissão por aerossóis possui imensas formas de dispersão. Condições ambientais como áreas de vento fraco com esporádicas rajadas, temperaturas baixas, elevada humidade relativa do ar e, baixa ou fraca exposição solar contribuem para a transmissão do PRRSV (Dee *et al.*, 2010). Este tipo de transmissão pode também depender da estirpe do PRRSV. A transmissibilidade do vírus através dos aerossóis e a concentração viral nos aerossóis dependem da estirpe presente (Kristensen *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2006).

3.3.2. Transmissão vertical

O PRRSV é transmitido das porcas gestantes virémicas aos fetos através da placenta, resultando na morte dos fetos ou no nascimento de leitões enfraquecidos ou aparentemente normais (Christianson *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994). A infeção dos fetos nos dois primeiros terços da gestação não é comum, ocorrendo maioritariamente no último terço. Isto deve-se ao facto do PRRSV atravessar a placenta mais eficazmente neste período (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994). A transmissão é independente da virulência da estirpe do PRRSV (Park *et al.*, 1996).

3.4. Exposição ao vírus

Os suínos são infetados por diferentes vias, incluindo a intranasal, oral, intrauterina, vaginal ou parenteral. A exposição parenteral pode ser devida às rotinas de manejo da exploração como o corte de cauda, corte de dentes, tatuagem ou a administração de medicamentos ou vacinas. Do mesmo modo, esta transmissão pode ocorrer através da mordedura de um animal infetado, cortes e ou abrasões causados pelas interações dos suínos.

A probabilidade de um porco se infetar depende da própria via de exposição. Existem estudos (Benfield *et al.*, 2000; Hermann *et al.*, 2005) que estimam que a dose necessária para infetar metade dos animais expostos, a Dose Infeciosa 50 (ID_{50}), para a via oral e intranasal é $1 \times 10^{5.3} TCID_{50}$ e $1 \times 10^{4.0} TCID_{50}$, respetivamente, utilizando a estirpe VR-2332. Por via inseminação artificial é de $1 \times 10^{4.5} TCID_{50}$.

Por outro lado, a infecciosidade varia entre diferentes estirpes de PRRSV, sendo que a ID_{50} para a estirpe MN-184 transmitida via aerossol é de $1 \times 10^{0.26} TCID_{50}$, enquanto a estirpe VR-2332 possui a ID_{50} de $1 \times 10^{3.1} TCID_{50}$ (Cutler *et al.*, 2011).

3.5. Transmissão intra- e inter- explorações

Dentro de uma exploração, o PRRSV tende a circular no efetivo indefinidamente devido ao facto da existência contínua de animais infetados e animais sensíveis (animais que nasceram, foram comprados ou por suscetibilidade imunitária). Da mesma forma, o próprio esquema produtivo da suinicultura contribui para a transmissão do vírus: os leitões são infetados na maternidade por reprodutoras virémicas, no útero ou no pós-parto; os leitões virémicos são misturados com animais sensíveis no desmame e posteriormente na engorda, contribuindo para a infeção de uma grande população.

A transmissão do PRRSV entre explorações está fortemente associada à proximidade entre explorações, encontrando-se em elevado risco de se infetarem quando estão próximas de uma exploração infetada pelo PRRSV. Esta transmissão ocorre através de aerossóis ou de insetos. O risco de infeção diminui à medida que a distância entre explorações aumenta. Nas observações de Le Potier *et al.*, (1997), 45% das explorações suspeitas de terem sido infetadas encontravam-se a menos de 500m da exploração infetada, enquanto apenas 2% encontravam-se a 1km de distância. Por outro lado, a transmissão do PRRSV entre explorações está associada à circulação de suínos infetados entre explorações ou à comercialização de sémen infetado. Nas observações de Goldberg *et al.*, (2000), verificou-se que a similaridade genética entre os vírus isolados não se correlacionava com a distância geográfica

entre os mesmos, concluindo-se que a introdução do PRRSV era assegurada pelos animais ou sêmen (Zimmerman *et al.*, 2012).

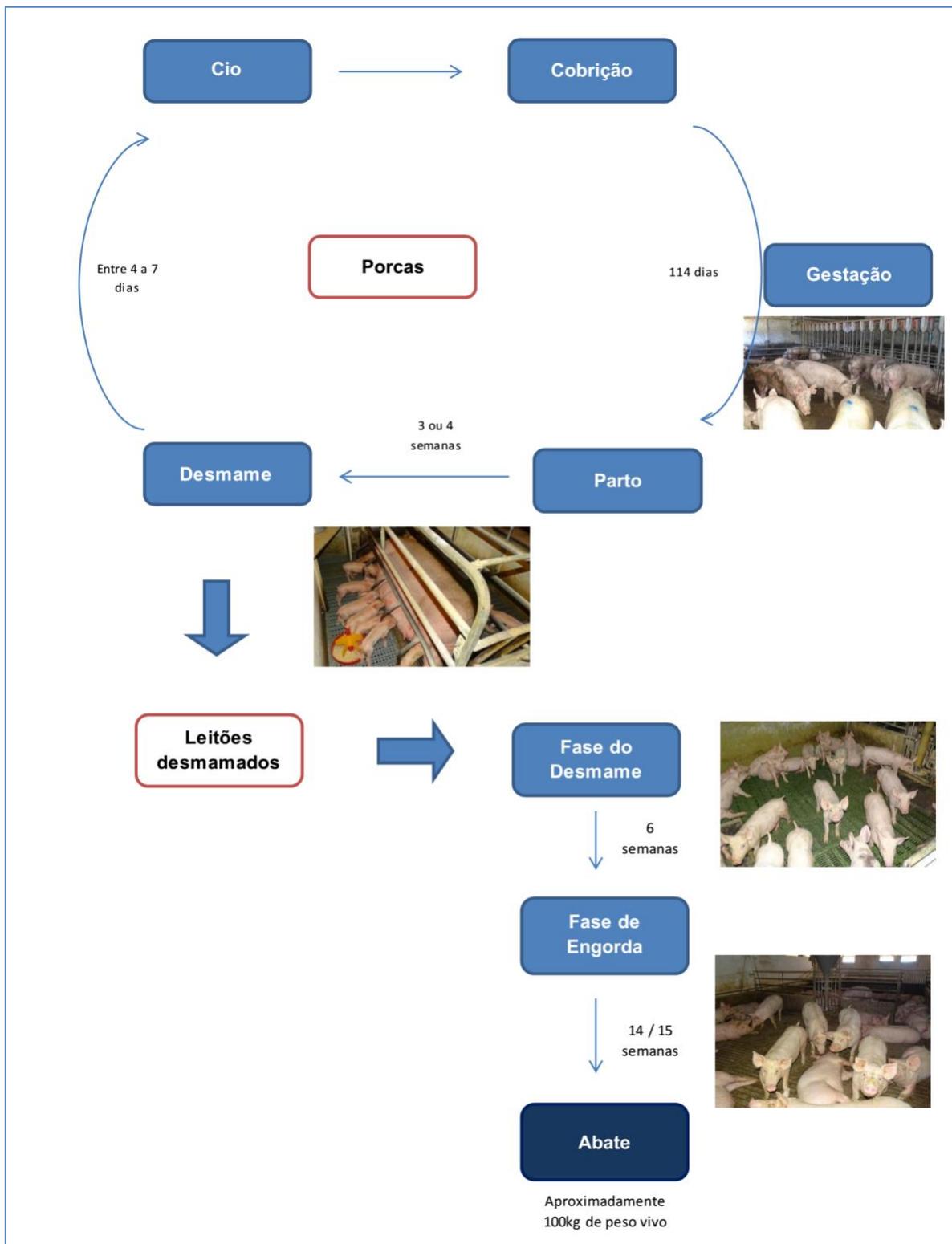


Figura 2. Ciclo produtivo em suinicultura intensiva.

4. PATOGENIA, FORMAS CLÍNICAS E QUADRO LESIONAL

4.1. Replicação no hospedeiro

Após a inoculação do PRRSV, a replicação viral inicial ocorre primariamente nos macrófagos locais e, posteriormente propaga-se rapidamente para os órgãos linfoides e pulmões. Pode propagar-se para outros tecidos, porém, com menor frequência. (Zimmerman *et al.*, 2012). As estirpes mais virulentas causam viremia em 12h em alguns porcos e em 24h em todos os porcos após a inoculação. O vírus atinge o pico máximo no soro, nos linfonodos ou nos pulmões em 7 a 14 dias, com títulos de 1×10^2 - 10^5 TCID₅₀/ml de soro ou grama de tecido (Zimmerman *et al.*, 2012).

A infecção inicia-se quando ocorre a ligação dos viriões com células sensíveis que exibam a glicoproteína recetora CD169 (Sialoadesina) e a glicoproteína transmembranar CD163. A Sialoadesina liga-se ao PRRSV, o que desencadeia a endocitose mediada por Clatrina (Kreutz and Ackermann, 1996; Duan *et al.*, 1998; Nauwynck *et al.*, 1999; Vanderheijden *et al.*, 2003;). A proteína M e o complexo M-GP5 da membrana viral são responsáveis pela ligação inicial ao recetor (Delputte *et al.*, 2002). No entanto, a conexão do PRRSV está dependente da ligação ácido-siálico à imunoglobulina tipo N-terminal da sialoadesina, sendo que os ácidos siálicos presentes na superfície dos viriões são essenciais na infecção do PRRSV (Delputte *et al.*, 2004, 2007).

Após a entrada do vírus através dos endossomas, o genoma viral é lançado no citoplasma através uma reação mediada pelo recetor CD163, estando envolvido num processo de desencapsulamento do vírus (Van Gorp *et al.*, 2008; 2009). Outros mecanismos como a diminuição do pH e a atividade das proteases estão também envolvidos (Nauwynck *et al.*, 1999; Misinzo *et al.*, 2008).

Assim que o genoma viral entra no citoplasma, as *ORF1a* e *ORF1b* desse mesmo genoma são traduzidas para produzir as duas poliproteínas, as pp1a e pp1ab, sendo estas as precursoras das 14 *NSP's*, como já referido anteriormente (Fang and Snijder, 2010). A maioria, se não todas, das *NSP's* estão envolvidas no complexo de replicação e transcrição (*replication and transcription complex – RTC*). O *RTC* é responsável pela amplificação do genoma (replicação) e síntese do sg mARN (transcrição) (Fang and Snijder, 2010). São produzidas seis grandes sg mARN's, através das quais são traduzidas as 8 *ORF's*, presumivelmente utilizando cada sg mARN na translação de uma ou duas *ORF's* (Conzelmann *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1996b). Estas *ORF's* codificam as proteínas estruturais, já referidas anteriormente, que constituem o virião infeccioso.

Numa última fase da replicação viral, grandes quantidades da proteína N associam-se ao ARN genômico sintetizado, formando a nucleocápside (Tijms *et al.*, 2002) e posteriormente adquire as 6 proteínas do involucro viral (E, M e a GP2 à GP5) (Snijder *et al.*, 2013). Finalmente os viriões formados acumulam-se nos compartimentos intracelulares e são libertados para o espaço extracelular via exocitose (Dea *et al.*, 1995).

A replicação do PRRSV ocorre predominantemente em células como macrófagos alveolares pulmonares (MAP) e macrófagos intravasculares pulmonares (MIP) nos pulmões (Wensvoort *et al.*, 1991; Thanawongnuwech *et al.*, 1997a) e os macrófagos nos tecidos linfoides (Duan *et al.*, 1997a). Deste modo, os títulos mais altos são encontrados nesses tecidos durante a infecção aguda. Para que ocorra a replicação, as células infetadas necessitam de ser maduras e ativadas (Molitor *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 1997b; Thacker *et al.*, 1998). De acordo com as observações de Mengeling *et al.*, (1995) e Thanawongnuwech *et al.*, (1998), os MAP ou MIP colhidas de animais jovens demonstraram maior número de replicação de vírus, comparativamente a animais mais velhos. Do mesmo modo, quando porcos jovens e mais velhos são inoculados pela mesma estirpe de PRRSV, os animais jovens replicam e excretam o vírus em quantidades superiores (van der Linden 2003; Cho *et al.*, 2006).

O antigénio e/ou ácido nucleico viral é também encontrado nos macrófagos perivasculares e intravasculares do coração, do cérebro, do rim e de outros locais. Por outro lado, embora menos frequente, é também encontrado no epitélio alveolar, bronquial e nasal, endotélio, fibroblastos, espermátides e espermatócitos (Pol *et al.*, 1991; Magar *et al.*, 1993; Halbur *et al.*, 1995, 1996; Rossow *et al.*, 1996a; Thanawongnuwech *et al.*, 1997a).

Geralmente, a doença clínica e as lesões surgem nos locais onde a carga viral é maior, sendo aos 7-14 dias nos pulmões e linfonodos. A replicação viral nos macrófagos dos pulmões e nos tecidos linfoides induz lesões através de diversos mecanismos, incluindo a apoptose celular (das células infetadas e das células próximas), indução de citocinas inflamatórias, de ativação de linfócitos B policlonais e redução da atividade antibacteriana dos macrófagos que resulta no aumento da suscetibilidade para septicemia (Zimmerman *et al.*, 2012).

4.2. Sinais clínicos

A apresentação clínica da PRRS varia entre explorações, desde quase assintomática a arrasadora, sendo influenciada pela virulência do vírus, estado imunitário e suscetibilidade do hospedeiro, presença de coinfeções e outros fatores

de manejo (Blaha, 1992; White, 1992a). Estirpes de pouca virulência causam infecções subclínicas enquanto estirpes altamente virulentas causam infecções clínicas graves, surgindo de diferentes formas, dependendo do estado imunitário do efetivo (Morrison *et al.*, 1992). De acordo com Martínez-Lobo *et al.*, (2011), o PRRSV Tipo 2 é mais virulento a nível respiratório que o PRRSV Tipo 1.

Os episódios epidêmicos ocorrem quando o PRRSV entra numa exploração sensível e todas as idades são afetadas. Relativamente aos casos endêmicos, ocorrem em efetivos que tem a imunidade homogeneizada para o PRRSV, observando-se manifestação clínica em subpopulações sensíveis, normalmente em animais em que a imunidade materna diminui (no caso dos leitões), na entrada de novas porcas na exploração ou porcas que não se infetaram durante o surto, assim como as suas ninhadas que são infetadas congenitamente (Zimmerman *et al.*, 2012).

4.2.1. Infecção epidémica

A primeira fase de uma epidemia da PRRS dura cerca de 2 ou mais semanas. Inicia-se em uma ou mais fases da exploração e dissemina-se rapidamente por todo o efetivo em 3 a 7 dias. Caracteriza-se pela anorexia e letargia em 5 a 75% dos animais de todas as idades devido à viremia. Os animais ficam também febris, com temperatura retal de 39° a 41°, hiperpneicos e dispneicos, anoréticos por 1 a 5 dias (Zimmerman *et al.*, 2012) e adquirem descoloração vermelha/azul nas extremidades (Figura 3) (Karniychuk *et al.*, 2013).



Figura 3. Sequelas de necrose auricular em suínos de engorda.

Legenda: observar a necrose bilateral nos pavilhões auriculares em suínos na fase inicial de crescimento/engorda após um surto provocado por PRRSV o qual foi detetado por PCR e a evolução acompanhada por teste ELISA.

A segunda fase começa após ou mesmo antes do final da primeira fase, durando aproximadamente 1 a 4 meses. É caracterizada por problemas reprodutivos, principalmente em porcas virêmicas no seu último terço da gestação e pela elevada mortalidade em leitões pré-desmame. Quando a performance reprodutiva e a mortalidade pré-desmame voltam aos níveis normais, a infecção endêmica continua na maioria das explorações (Zimmerman *et al.*, 2012).

4.2.1.1. Porcas

Durante a fase aguda, os sinais clínicos são maioritariamente caracterizados por descoloração azulada/avermelhada da vulva, abortos tardios, partos prematuros e o nascimento de ninhadas de leitões vivos, nados-mortos e fetos em diferentes estados de mumificação (Terpstra *et al.*, 1991; Hopper *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1994; Done and Paton, 1995). Também pode observar-se, de forma menos frequente, agalaxia (Hopper *et al.*, 1992), incoordenação (de Jong 1991), e/ou manifestação dramática de doenças endêmicas como sarna sarcóptica, rinite atrófica, cistite ou pielonefrite (White, 1992a).

Os problemas reprodutivos começam aproximadamente 1 semana após a infecção e continuam até 4 meses, havendo porcas que não manifestam sintomatologia durante este período. A redução da performance reprodutiva no início da gestação (baixas taxas de concepção e baixas taxas de fertilidade) pode ser devida à infecção do PRRSV, durante o surto (Prieto *et al.*, 2000). Caso a infecção ocorra a meio da gestação, poderão ocorrer abortos esporádicos ou surgir pequenos leitões mumificados no parto (Christianson *et al.*, 1993). No entanto, a manifestação clínica da PRRS em porcas é principalmente referida como problemas reprodutivos tardios. Existem vários estudos (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992; Lager *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1994; Kranker *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 1998) que comprovam que a infecção transplacentária e os problemas reprodutivos tardios estão associados à infecção no último terço da gestação. Entre 5% a 80% das porcas têm o parto aos 100 a 118 dias de gestação, cujas ninhadas são quaisquer combinações de leitões normais, enfraquecidos, com tamanhos variados e de leitões mortos, cuja morte ocorreu antes do parto (fetos autolíticos e fetos parcialmente ou completamente mumificados) ou intra-parto (Figura 4). Ocorre uma mudança gradual na predominância nos partos, de leitões que morrem durante o parto e grandes fetos parcialmente mumificados, para fetos pequenos completamente mumificados, posteriormente leitões fracos pequenos e finalmente para leitões de tamanho e vigor

normais (Keffaber, 1989; Loula, 1991; White, 1992a). Após o desmame, as porcas costumam teraios e baixos índices de concepção.



Figura 4. Nados-mortos e fetos mumificados

Legenda: Nados-mortos e fetos mumificados de uma porca infetada por PRRS. Adaptado de Linhares *et al.*, (2013) com autorização do autor Daniel Linhares.

Pode ocorrer mortalidade em porcas em 1 a 4% e é ocasionalmente associada a edema pulmonar e ou cistite/pielonefrite. (Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992). Existem casos descritos com 10 a 50% de abortos em porcas gestantes, até 10% de mortalidade e existência de sinais nervosos como ataxia, “circling” e paralisia (Epperson and Holler, 1997; Halbur and Bush, 1997).

4.2.1.2. Varrascos

Durante o surto, além dos sinais comuns, os varrascos podem ter a libido reduzida e ter redução da qualidade do sêmen (de Jong *et al.*, 1991; Feitsma *et al.*, 1992, Prieto *et al.*, 1994). Após 2 a 10 semanas da infecção, existe uma redução da motilidade dos espermatozoides e defeitos no acrossoma (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996; Prieto *et al.*, 1996). No entanto, a maior importância será a excreção do vírus pelo sêmen, que pode resultar na infecção de porcas (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994).

4.2.1.3. Leitões na maternidade

Durante a fase dos problemas reprodutivos, existe uma mortalidade pré-desmame até aos 60% em leitões nascidos vivos. Normalmente são apáticos, fracos, magros (Figura 5) e com fome, com postura *splaylegged* (abdução), com hiperpneia

e/ou dispneia. Sinais menos comuns são os tremores ou o *paddling* (Keffaber, 1989; Loula, 1991), anemia e trombocitopenia com consequentes hemorragias do umbigo e poliartrites e meningites bacterianas (Hopper *et al.*, 1992; White, 1992a).



Figura 5. Leitão recém-nascido infectado por PRRSV.

Legenda: Leitão recém-nascido enfraquecido devido à infecção pelo PRRSV. Adaptado de Linhares *et al.*, (2013) com autorização do autor Daniel Linhares.

4.2.1.4. Leitões no desmame e porcos de engorda

Durante esta fase aguda é frequente encontrar sinais como anorexia, letargia, hiperemia cutânea, hiperpneia e/ou dispneia sem tosse, pêlo áspero e de maior tamanho e redução variável no ganho médio diário (Figura 6) (Moore, 1990; White, 1992b). Existe uma maior predisposição para doenças endêmicas como meningite por *Streptococcus*, salmonelose septicêmica, doença de Glässer (*Haemophilus parasuis*), dermatite exsudativa, sarna sarcótica e broncopneumonia bacteriana. Do mesmo modo, ocorre um aumento da mortalidade de 12 a 20% (Moore, 1990; Loula, 1991; Blaha, 1992; Keffaber *et al.*, 1992; White, 1992a; Stevenson *et al.*, 1993).

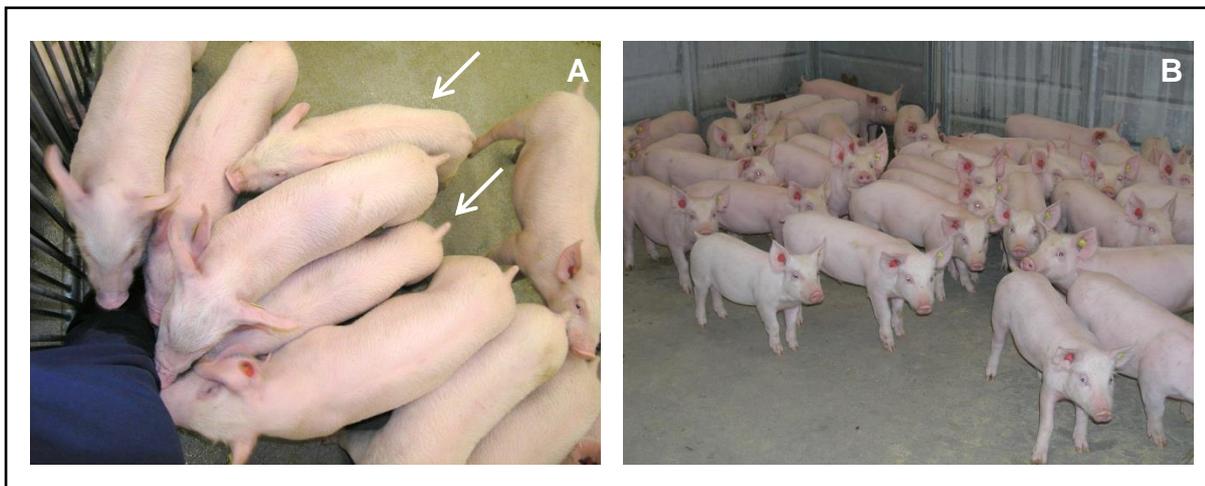


Figura 6. Comparação de leitões infetados experimentalmente aos 22 dias pós-inoculação do vírus VR-2332 (A) e leitões não infetados (B).

Legenda: A: grupo de animais infetados experimentalmente aos 22 dias pós-inoculação do vírus VR-2332. Apresentam-se heterogêneos, com animais com pior condição corporal e tamanho (seta). B: grupo de animais não infetados. Observar a homogeneidade e condição corporal do grupo. Imagem gentilmente cedida por Jeffrey Zimmerman.

4.3. Infecção endêmica

Em explorações endêmicas, é frequente ver regularmente ou ocasionalmente surtos agudos típicos da PRRS em leitões sensíveis na maternidade e nas fases posteriores (Keffaber *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1993) ou em adultos sensíveis como marrãs e varrascos de substituição, expostos pela primeira vez ao PRRSV ao entrarem na exploração (Grosse-Beilage and Grosse-Beilage, 1992; Dee and Joo 1994, Dee *et al.*, 1996), ou porcas sensíveis (a manifestação nas marrãs ou varrascos novos na exploração é considerada epidêmica). As consequências reprodutivas dependem do número de marrãs/porcas infetadas e do momento da gestação em que

foram infetadas (Torrison *et al.*, 1994). Caso as marrãs se infetem permanentemente poderão ocorrer esporadicamente abortos, cios irregulares, marrãs não prenhas e falha reprodutiva tardia com ninhadas anormais típicas do PRRS (White, 1992b). As marrãs que escapam à exposição do vírus formam uma subpopulação sensível significativa em vários estados de gestação. Nesta situação, a PRRS manifesta-se com mini-surtos periódicos nas marrãs e, menos frequente, nas porcas (Dee and Joo, 1994).

4.4. Fatores que afetam a gravidade da doença

A expressão da doença clínica não é totalmente compreendida. Apesar disto, é conhecido que é afetada por diversos fatores como a virulência da estirpe, o estado imunitário e suscetibilidade do hospedeiro, exposição a lipopolissacarídeos e coinfeções. O manejo (o esquema de produção, a regulação de temperatura) assim como a própria arquitetura da exploração têm também impacto na expressão do vírus mas pouco definida.

As estirpes do PRRSV diferem na severidade da sintomatologia respiratória (Halburt *et al.*, 1995; van der Linden *et al.*, 2003) e na severidade da sintomatologia reprodutiva (Park *et al.*, 1996; Mengeling *et al.*, 1998). Quanto mais virulenta for a estirpe do PRRSV, maior será a quantidade de antígeno encontrado no pulmão e nos tecidos linfóides e maior será o pico dos títulos assim como a sua duração (Halbur *et al.*, 1995, 1996a, 1996b; van der Linden *et al.*, 2003; Grebennikova *et al.*, 2004).

A raça dos suínos pode também influenciar a expressão do vírus, como foi demonstrado por Halbur *et al.*, (1998), demonstrando que existe diferenças significativas nas lesões pulmonares, no número de células pulmonares antigénicas positivas ao PRRSV, na incidência para miocardite e encefalite em raças puras de Duroc, Hampshire e Meishan, sendo a raça Hampshire mais sensível ao PRRSV e a raça Duroc a menos afetada.

Os lipopolissacarídeos bacterianos - LPS (endotoxinas) também afetam a expressão do vírus e estão frequentemente presentes em níveis elevados em explorações com pouca ventilação. A inoculação experimental intratraqueal da LPS em animais infetados por PRRSV, quando comparado com outros animais apenas inoculados com o vírus ou com a LPS, provoca sintomatologia respiratória mais grave, associada ao aumento temporário de 10 a 100 vezes da Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e TNF- α , mas sem diferenças nas lesões microscópicas ou macroscópicas no pulmão ou no número de células inflamatórias na lavagem broncoalveolar (Labarque *et al.*, 2002; van Gucht *et al.*, 2003).

Por outro lado, a PRRS torna os suínos mais sensíveis a doenças bacterianas ou víricas e possui um efeito sinérgico para algumas doenças, agravando a sintomatologia. A infecção congênita ou pós-parto com o PRRSV torna os animais mais sensíveis a septicemias com *Streptococcus suis* (Galina *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 2001). A infecção de leitões desmamados pelo PRRSV torna-os mais sensíveis a broncopneumonias por *Bordetella bronchiseptica* (Brockmeier *et al.*, 2000), devido à redução da habilidade de matar bactérias pelos MAP's (Thanawongnuwech *et al.*, 1997b). Do mesmo modo, o PRRSV aumenta a incidência e severidade da salmonelose após a inoculação com *Salmonella choleraesuis* (Wills *et al.*, 2000b). A infecção do PRRSV aumenta também a replicação do Circovírus suíno do tipo 2 (Porcine Circovirus type 2 – PCV2), resultando no agravamento da sintomatologia respiratória da PRRS, assim como a sintomatologia do PCV2 associada ao Síndrome do emagrecimento progressivo pós-desmame (Porcine multisystemic wasting syndrome – PMWS) (Allan *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001). Outros estudos (van Reeth *et al.*, 1996; Thacker *et al.*, 1999; van Reeth *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 2003) demonstraram o mesmo efeito, causando maior severidade da doença comparando com a infecção simples. Incluem *Mycoplasma hyopneumoniae*, Coronavírus respiratório, vírus da Influenza suíno e doença de Aujeszky.

4.5. Lesões

As lesões são semelhantes em todas as idades e a sua gravidade e distribuição estão diretamente relacionadas com a virulência do vírus infetante (Done and Paton, 1995; Halbur *et al.*, 1996b). As lesões macroscópicas e microscópicas são constantemente observadas nos pulmões e nos linfonodos desde os 4 aos 28 dias após a infecção. Em outros órgãos como no rim, cérebro, coração e em outros locais (em macrófagos perivasculares e intravasculares e em células endoteliais), são apenas observadas lesões microscópicas após 7 a 14 dias, porém, de forma menos regular. São também encontradas lesões no útero de porcas gestantes, após os distúrbios reprodutivos, e nos testículos de varrascos (Zimmerman *et al.*, 2012).

Nos pulmões, ocorre pneumonia intersticial desde os 3 aos 28 dias após a infecção, sendo mais grave entre os 10 a 14 dias (Figura 7). Em lesões ligeiras, estas observam-se no pulmão cranial ou distribuídas de forma difusa, o parênquima encontra-se ligeiramente firme, não colapsado, com manchas cinzentas e húmido. Em lesões mais graves, as lesões encontram-se distribuídas de forma difusa. O parênquima encontra-se avermelhado, de forma difusa ou às manchas, não colapsado, firme e húmido. A nível microscópico, o septo alveolar encontra-se espessado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos e poderá estar revestido por

pneumócitos hiperplásicos do tipo 2. O alvéolo pode conter macrófagos necrosados, detritos celulares e fluido seroso. No campo, as lesões pulmonares causadas pela PRRS são frequentemente complicadas ou mascaradas por lesões de coinfeções de doenças bacterianas ou virais (Zimmerman *et al.*, 2012).

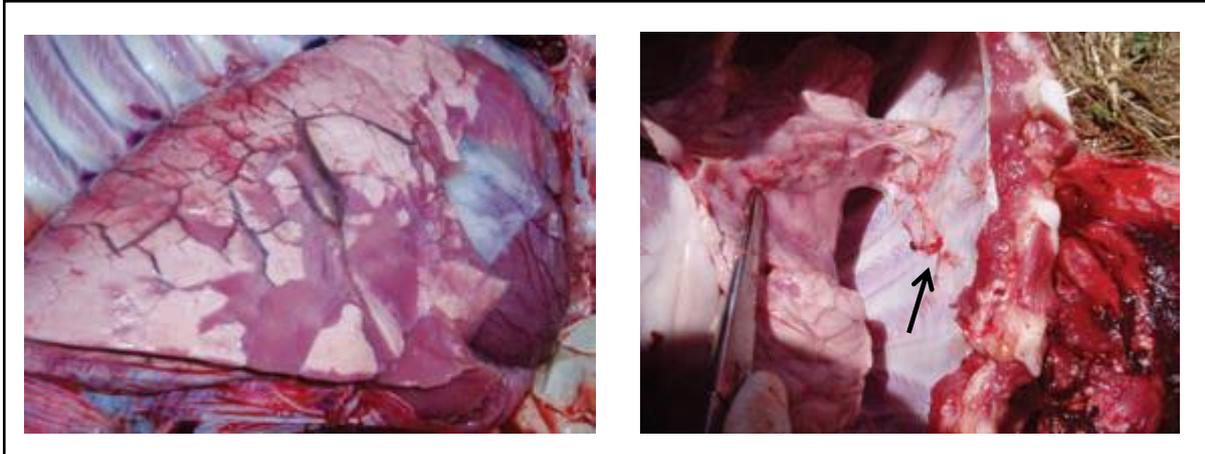


Figura 7. Pulmão de suíno infetado por PRRSV.

Legenda: A: Pneumonia; B: Pulmão de suíno infetado por PRRSV com infecção secundária: pneumonia com aderências à parede costal (seta), compatível com *A. pleuropneumoniae*. Adaptado de Linhares *et al.*, (2013) com autorização do autor Daniel Linhares.

Nos linfonodos (Figura 8), as lesões são observadas 4 a 28 dias após a infecção (Dea *et al.*, 1992; Halbur *et al.*, 1995; Rossow *et al.*, 1995), estando aumentados 2 a 10 vezes, na maioria dos suínos infetados. Após a infecção, tornam-se edemaciados, pálidos e moderadamente firmes. Posteriormente, tornam-se mais firmes. Pode haver a formação de quistos de 2 a 5mm de diâmetro na zona cortical, embora não seja comum. As lesões microscópicas ocorrem predominantemente nos centros germinativos, no córtex, encontrando-se necróticos no início da infecção. Posteriormente, os centros germinativos encontram-se aumentados e repletos de linfócitos imaturos (Rossow *et al.*, 1994b, 1995). Lesões microscópicas como necrose, destruição e/ou hiperplasia linfóide podem ser observadas no timo, no revestimento linfóide periarteriolar do baço, e nos folículos linfóides nas amígdalas e placas de Peyer (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1995).



Figura 8. Linfadenopatia de leitão infetado com 6 semanas pós-desmame.

Legenda: Gânglios linfáticos inguinais superficiais hipertrofiados de leitão com apresentação de sintomatologia clínica de PRRS. Adaptado de Linhares *et al.*, (2013) com autorização do autor Daniel Linhares.

No coração, aos 9 dias após a infecção, podem desenvolver-se vasculites linfohistiocíticas multifocais ligeiras ou moderadas. É menos frequente ocorrer necrose fibrilar do miocárdio ligeira e revestimento linfocítico das fibras de Purkinje (Rossow *et al.*, 1994a, 1995; Halbur *et al.*, 1995) No sistema nervoso, pode observar-se leucoencefalite ou encefalite linfohistiocítica ligeira no cérebro, cerebelo e/ou no tronco cerebral aos 7 dias após a infecção. Ocorre também o revestimento dos vasos sanguíneos por linfócitos e macrófagos, e gliose multifocal. (Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996b; Thanawongnuwech *et al.*, 1997a). A nível renal, observa-se ocasionalmente agregados linfohistiocíticos periglomerulares e peritubulares dos 14 aos 42 dias após a infecção (Rossow *et al.*, 1995; Copper *et al.*, 1997).

No útero, as lesões microscópicas são frequentes em porcas gestantes, observando-se edema do miométrio e/ou endométrio com linfócitos na zona perivascular. Em vários estudos (Christianson *et al.*, 1992; Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993; Lager and Halbur, 1996) encontram-se descritas miometrites, endometrites, placentites e vasculites segmentais em pequenos vasos e microseparação entre o endométrio e os trofoblastos placentários em porcas infetadas experimentalmente e naturalmente. Nos machos, observa-se a atrofia dos túbulos seminíferos 7 a 25 dias após a infecção (em machos com 5 a 6 meses de idade) (Zimmerman *et al.*, 2012).

Na ocorrência de partos prematuros entre os 100 dias de gestação e a data do parto, com leitões de diferentes tamanhos, fracos, nados-mortos e/ou múmias, deve suspeitar-se da presença da PRRS. A maioria das lesões dos fetos não são específicas, sendo difícil encontrar achados específicos para o PRRSV. Por exemplo,

os leitões mortos estão frequentemente cobertos por um fluido castanho (fluido amniônico e mecônico), um achado não específico que sugere hipoxia ou stresse do feto (Lager and Halbur, 1996).

É frequente encontrar lesões em leitões recém-nascidos infetados pelo PRRSV, que acabaram por morrer ou foram sacrificados. Observam-se lesões macroscópicas como o edema perirenal, edema do ligamento esplênico, edema mesentérico, ascite e hidrotórax (Dea *et al.*, 1992; Plana Duran *et al.*, 1992; Lager and Halbur, 1996). As lesões microscópicas incluem arterites segmentais e periarterites no pulmão, coração e rim, pneumonia intersticial multifocal com hiperplasia ocasional dos pneumócitos do tipo 2, hepatite periportal ligeira, miocardite com perda das fibras miocárdicas e leucoencefalite multifocal (Plana Duran *et al.*, 1992; Lager and Halbur, 1996; Rossow *et al.*, 1996b; Sur *et al.*, 1997).

Apesar das lesões descritas, a ausência de lesões microscópicas graves nos órgãos internos de fetos abortados ou nados-mortos levanta a questão de qual o mecanismo que leva aos problemas reprodutivos (Mengeling *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1996b). De acordo com Rossow (1998), a morte fetal poderá dever-se às lesões causadas pelo vírus no útero e na placenta, tendo sido o vírus demonstrado por Stockhofe-Zurwieden *et al.*, (1993) no endométrio e na placenta de porcas infetadas.

Um achado menos comum, mas altamente sugestivo para uma infeção por PRRSV é o alargamento do cordão umbilical até 3 vezes o diâmetro normal, causado por vasculite necrosupurativa e linfo-histiocitária segmentar (Lager and Halbur, 1996).

4.5.1. Lesões singulares descritas na Ásia

Em 2006, surgiu um surto epidémico de PRRS causado por uma estirpe variante do PRRSV do tipo 2, denominada HP-PRRSV (*Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), no este da China, caracterizado pela elevada morbilidade (febres altas em 50 a 100% dos animais) e elevada mortalidade (20 a 100%), afetando 2 milhões de porcos (Li *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2007).

Além das lesões típicas da PRRS, foram observadas outras lesões não encontradas anteriormente como petéquias e equimoses no córtex renal, na cápsula hepática e na pleura visceral. Foram também observados enfartes esplênicos e hematúria mas menos frequentemente. No entanto, na inoculação experimental usando o vírus isolado de explorações infetadas, foram apenas observadas as lesões típicas de PRRS. Assim, não se concluiu se esta nova sintomatologia seria devido ao HP-PRRSV ou devido a coinfeções, já que os relatos descreviam a presença de

coinfecções com *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus parasuis*, entre outros (Li *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2008).

5. IMUNIDADE

A PRRS induz uma resposta do sistema imunitário dos suínos, conferindo proteção imunitária, apesar de possuir um desenvolvimento lento. Esta proteção imunitária é a base para a erradicação do PRRSV em explorações infetadas, que iniciam processo de encerramento da exploração (*Herd Closure*). Estes processos consistem em expor os animais ao vírus por inoculação ou por vacinação com vacina viva modificada e não são introduzidos animais na exploração por um período não inferior a 6 meses (Schaefer and Morrison, 2007; Yeske, 2009; Zimmerman *et al.*, 2012). Para que se desenvolva uma proteção imunitária, os animais têm que ser expostos ao vírus vivo. O mesmo não acontece quando é utilizado o vírus morto, proteínas de subunidades ou outras vacinas experimentais que não contenham o PRRSV vivo. Ainda é desconhecido o que confere a proteção imunitária, apesar dos estudos extensivos realizados (Zimmerman *et al.*, 2012). A suscetibilidade ao PRRSV diminui com a idade, sendo que as porcas mais velhas são substancialmente mais resistentes que leitões desmamados (Klinge *et al.*, 2009).

5.1. Resposta Imunitária à infeção por PRRSV

5.1.1. Imunidade inata

A resposta imunitária inata do hospedeiro desempenha um papel crucial no início da infeção. Os recetores de reconhecimento de ARN viral do hospedeiro, incluindo o RLR (*Retinoic-acid-inducible gene-1-like receptors*), levam à ativação dos Fatores Reguladores do Interferão 3 e 7 (*Interferon Regulatory Factor – IRF*) e NF- κ B e consequente indução de Interferões (IFN) do tipo 1 (IFN- α e IFN- β) e expressão de citocinas inflamatórias. Os IFN do tipo 1 são cruciais na resposta imunitária inata em infeções virais (Heil *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2006; Takaoka *et al.*, 2006; Gonzalez-Navajas *et al.*, 2012).

5.1.1.1. Interferência do PRRSV na indução do IFN

O PRRSV é sensível aos IFN do tipo 1 *in vivo*, confirmado nas observações de Brockmeier *et al.*, (2009). A presença de IFN- α durante a infeção por PRRSV altera a resposta imunitária inata e adaptativa. No entanto, o PRRSV possui mecanismos inibitórios na síntese do IFN do tipo 1 em suínos e na expressão de citocinas

inflamatórias (Luo *et al.*, 2008; Beura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). Verifica-se que a infecção por PRRSV nos MAP's não induz a produção de IFN- α (Albina *et al.*, 1998).

5.1.1.2. Proteínas virais inibitórias da indução do IFN e da sua sinalização

As proteínas virais *NSP1*, *NSP2*, *NSP11* e *N* são antagonistas da indução de IFN. As subunidades da *NSP1* (*NSP1 α* e *NSP1 β*), que se localizam predominantemente no núcleo celular, inibem a tradução do IFN- β . A *NSP2* inibe a indução de IFN através do bloqueio da ativação da IRF3 e inibe a função antiviral do gene ISG15. A *NSP11*, uma endonuclease, é também antagonista da indução do IFN. A proteína *N* inibe também a indução do IFN- β interferindo na ativação da IRF3. O complexo de *NSP's* é sintetizado anteriormente à proteína *N*, sugerindo que as *NSP's* e a *N* participam em diferentes fases da replicação viral (Beura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Sagong and Lee, 2011; Sun *et al.*, 2012a).

Após a sua ativação, o IFN possui a função de se conectar com o seu recetor na superfície das células e ativar a via JAK/STAT, resultando na tradução dos ISG's (*IFN-Stimulated Genes*), cujos produtos dessa tradução possuem numerosas funções antivirais como por exemplo, interferir no ciclo do vírus (Darnel *et al.*, 1994; Schoggins *et al.*, 2011). O PRRSV inibe este mecanismo, suprimindo o sinal JAK/STAT gerado pelo IFN em células MARC-145 ou MAP ou inibe a própria expressão dos ISG's (Patel *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013a, 2013b). A *NSP1 β* está fortemente presente neste processo, sendo que é responsável pela degradação da *KNAP1* (*Karyopherin-alpha1*) que é responsável pela entrada do STAT1 no núcleo celular (Sun *et al.*, 2012b). As outras proteínas virais também demonstram capacidade de inibir o sinal do IFN (Wang *et al.*, 2013a).

5.1.1.3. Efeito da variabilidade de estirpes e celular

Ao infetar diferentes tipos de células, o PRRSV pode ter diferentes efeitos supressivos na indução do IFN. Em células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DC), o PRRSV induz a transcrição de IFN- α e IFN- β . No entanto, não foi detetado IFN- α no sobrenadante, sugerindo haver um bloqueio pós-transcrição (Zhang *et al.*, 2012). Em células MARC-145, a infecção do PRRSV interfere na via RLR (Luo *et al.*, 2008). Em células dendríticas plasmocitóides, uma variedade de estirpes de PRRSV Tipo 1 e Tipo 2 permitem a indução do IFN, não sendo necessário um vírus vivo (Baumann *et al.*, 2013).

Entre estirpes de PRRSV, a variabilidade na indução do IFN em culturas celulares sugere a impossibilidade de generalizar a resposta inata na infecção por PRRSV (Lee *et al.*, 2004). Num estudo envolvendo 6 estirpes de PRRSV (VR-2385, Ingelvac PRRS MLV, VR-2332, NVSL97-7895, MN184 e *Lelystad virus*), apenas a MN184 não inibiu a atividade do IFN em células MARC-145. Nesse mesmo estudo, usando células MAP's, todas inibiram a indução do IFN exceto as estirpes Ingelvac PRRS MLV e NVSL97-7895. (Wang *et al.*, 2013a).

Estas diferentes interações podem explicar a diversidade de respostas entre o hospedeiro e o vírus assim como as respostas imunológicas mas o papel da resposta imunitária inata para o PRRSV é ainda desconhecido. No entanto, as respostas imunitárias inatas *in vivo* poderão servir como biomarcadores precoces da infecção (Gnanandarajah *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2010).

5.1.2. Imunidade humoral

Ao entrarem em contato com o PRRSV, surge a resposta humoral contra diversas estruturas virais ou *NSP's* aproximadamente 1 semana pós-infecção (de Lima *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2009). Normalmente, as imunoglobulinas M (IgM) são detetadas ao 5º dia, atingindo o seu pico ao 7º dia. As imunoglobulinas G (IgG) surgem posteriormente, ao 7º dia e obtêm o pico aos 30 a 50 dias após a infecção. Este período pode ser muito variável, dependendo da estirpe em causa e da carga viral a que os animais foram expostos. As IgM persistem por 21 a 28 dias após a infecção, enquanto as IgG permanecem constantes e decrescem até níveis baixos aos 300 dias após infecção (Joo *et al.*, 1997; Batista *et al.*, 2004; Mulupuri *et al.*, 2008). No entanto, os anticorpos neutralizantes virais (VN) não são detetáveis antes das 4 semanas pós-infecção (Benfield *et al.*, 1992; Yoo *et al.*, 2010). Os anticorpos específicos contra a GP4 ou GP5 neutralizam a infecciosidade viral, comprovando que o complexo de glicoproteínas GP2, GP3, GP4 e GP5 e a proteína M são responsáveis pela infecção de células sensíveis (Wissink *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2010). Esta neutralização pode dever-se à interferência direta ou por obstrução estereoquímica.

Anatomicamente, os linfócitos B de memória ou secretores específicos para o PRRSV estão localizados nos tecidos linfoides, especialmente nos linfonodos que drenam os pulmões e as áreas genitais. O baço e as amígdalas são os maiores reservatórios dos linfócitos B específicos para o PRRSV (Mulupuri *et al.*, 2008).

Existem estudos que demonstram que a viremia ou a replicação viral podem persistir mesmo na presença dos anticorpos VN ou, contrariamente, a viremia pode estar resolvida antes do aparecimento destes anticorpos (Vezina *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2007; Mateu *et al.*, 2008). Por outro lado, os anticorpos contra a nucleocápside

podem decair mesmo com o vírus presente nos tecidos linfoides, podendo levar ao erro nos diagnósticos baseados em serologias (Batista *et al.*, 2004).

A falha no desenvolvimento de uma resposta imunitária eficaz levanta a questão se o vírus possui mecanismos de supressão ou tolerância imunitária (Drew, 2000). Esta falha no desenvolvimento da resposta imunitária pode estar fortemente associada à inibição da indução do IFN do tipo 1 pelo PRRSV. Outro elemento importante é a idade do hospedeiro, sendo que a viremia persiste mais tempo com animais jovens comparativamente em animais mais velhos (Klinge *et al.*, 2009). Esta viremia prolongada é devida à indução tardia de produção de IL-10, sendo que a produção desta citocina supressiva deverá estar associada à replicação viral em leitões (Butler *et al.*, 2014).

Adicionalmente, a presença de anticorpos VN em animais mais velhos correlaciona-se com a eliminação precoce do vírus neste grupo de animais (Robinson *et al.*, 2013).

Por outro lado, os leitões aparentam ser mais sensíveis às desregulações imunitárias dos linfócitos do tipo B.

5.1.3. Imunidade celular

A resposta imunitária celular no sistema imunitário é caracterizada pela ativação e expansão de linfócitos T citotóxicos (CTL), específicos para antigénio e restritos ao MHC. Os CTL matam as células infetadas por vírus e impedem a formação de novas partículas virais. É o mecanismo imunitário mais eficiente contra vírus em espécies mamíferas (Butler *et al.*, 2014)

Especificamente em infeções pelo PRRSV, este mecanismo é ainda pouco conhecido. Apesar de Costers *et al.*, (2009) ter reportado que a indução de CTL pelo PRRSV é muito baixa e lenta (comparativamente à doença do Aujeszky), a literatura existente relativamente a este tópico é escassa. Por outro lado, a análise da indução dos CTL é complicada devido à sua natureza. A ação das CTL é medida através da análise da morte das células infetadas pelos vírus pelas CTL *in vitro*. Esta análise é afetada pelo tempo que as CTL levam a matar as células infetadas em meios *in vitro* e pelo facto do PRRSV também mata as células infetadas (Butler *et al.*, 2014). Adicionalmente, a proliferação *in vitro* de linfócitos-T específicos para antigénio é extremamente complicada e existem poucos meios e reagentes para examinar as respostas *in vitro* ou *in vivo*. No caso do PRRSV, tem existido dificuldade em demonstrar a proliferação de linfócitos-T ou a sua citotoxicidade em meios de cultura celular clássicos (Bautista *et al.*, 1999).

Os linfócitos T γ/δ constituem um subgrupo de linfócitos que se distingue por possuir um receptor de linfócitos T distinto das restantes. Este tipo de linfócitos possui funções na infeção do PRRSV ainda pouco claras porém, os linfócitos T γ/δ comportam-se de forma semelhante às CTL e linfócitos NK (Martelli *et al.*, 2009). Existem diversos relatos que descrevem que este tipo de linfócitos é afetado pelo PRRSV e outros vírus (Olin *et al.*, 2005; Martelli *et al.*, 2009; Toka *et al.*, 2011). No entanto, a informação atual é insuficiente para elaborar uma hipótese relativamente à importância dos linfócitos T γ/δ na PRRS (Butler *et al.*, 2014).

5.1.4. Resposta imunitária anamnésica

A exposição ao PRRSV induz proteção contra infeções subsequentes, havendo respostas maiores e mais rápidas. A resposta anamnésica baseia-se na indução dos linfócitos B de memória e T que permanecem no organismo depois de todas os indicadores da infeção primária desaparecerem. Encontram-se de forma abundante nos tecidos linfoides, correspondendo aos locais predominantes com maior persistência viral (Zimmerman *et al.*, 2012).

Apesar dos linfócitos B aparentarem ser abundantes, não existe uma resposta anamnésica perante uma infeção de PRRSV (Foss *et al.*, 2002). Os suínos demonstram resistência à infeção, mas os níveis de anticorpos não se alteram de modo significativo. Estas observações são importantes para o desenvolvimento de vacinas pois existe a possibilidade dos mecanismos de proteção imunológica não dependerem apenas dos linfócitos B de memória. No arterivírus do rato (LVD), a resistência à infeção é atribuída à depleção dos macrófagos permissivos (Cafruny *et al.*, 2003), podendo funcionar do mesmo modo em suínos (Zimmerman *et al.*, 2012).

5.2. Imunidade homóloga, imunidade heteróloga e proteção cruzada

A imunidade homóloga é a proteção gerada pelo sistema imunitário face à estirpe de PRRSV a que o suíno esteve exposto. Este tipo de imunidade pode persistir durante toda a vida de produção do animal (Lager *et al.*, 1997). Murtaugh and Wagner (2010) demonstraram recentemente que a imunidade homóloga não é 100% eficaz e os animais reexpostos à mesma estirpe viral podem infetar-se. No entanto, a imunidade homóloga é mais eficaz que a imunidade heteróloga (Lager *et al.*, 1999).

A imunidade heteróloga é a proteção gerada pelo sistema imunitário face a uma estirpe de PRRSV à qual o suíno não esteve exposto. A proteção heteróloga é variável entre as diferentes estirpes de PRRSV. No entanto, tem demonstrado ser importante na proteção contra estirpes altamente virulentas (Murtaugh, 2009). Com

isto, é importante referir que este tipo de proteção é a base da vacinação com vírus vivos atenuados.

A proteção contra a infeção com uma estirpe de PRRSV que não é exatamente a mesma estirpe que imunizou o suíno é chamada proteção cruzada. O nível de proteção cruzada está provavelmente relacionado com a similaridade genética dos antigénios apresentada pelas estirpes envolvidas na proteção cruzada. A diversidade genética entre os PRRSV do Tipo 1 e Tipo 2 tem implicações significativas nas estratégias de imunidade. Vacinas baseadas em estirpes isoladas são dependentes da indução da imunidade cruzada. Se a imunidade for demasiado específica para uma estirpe, a eficácia da vacina pode ser nula. No entanto, estudos baseados na proteção cruzada, em porcos em crescimento, mostram constantemente melhorias significativas na saúde, na patologia e histopatologia do pulmão e crescimento dos animais (Mengeling *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Opriessnig *et al.*, 2005). Em porcas gestantes, existe uma melhoria significativa a nível reprodutivo (Lager *et al.*, 1999; Mengeling *et al.*, 1999a).

A eficácia da proteção cruzada no campo é uma preocupação maior principalmente na sintomatologia reprodutiva da PRRS. Em explorações com imunidade estabelecida (com vacinação ou inoculação regular) e proteção elevada mas incompleta, surgem alguns leitões virémicos, que por sua vez poderão levar a surtos nas maternidades. Em contraste, a intervenção vacinal no final de um surto resulta na redução parcial na severidade da doença e reduz perdas económicas.

Apesar da imunidade cruzada ser importante, depende da variação genética das diferentes estirpes de vírus e de outros fatores biológicos que afetam a sua eficácia (Klinge *et al.*, 2009). Entre esses fatores estarão a variação fisiológica dos suínos sensíveis e da variação genética dos suínos tolerantes à infeção por PRRSV (Halbur and Bush, 1997; Petry *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2009).

5.3. Imunidade de origem materna

Os anticorpos maternos contra o PRRSV provenientes do colostro encontram-se presentes no soro de leitões até à 3ª ou 4ª semana de vida, podendo chegar até à 6ª semana de vida (Albina *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 1997).

O surgimento da PRRS em leitões desmamados está associado à perda dos anticorpos maternos (Chung *et al.*, 1997). No entanto, os leitões de porcas não imunes demonstraram sinais clínicos menos graves e menos duração de viremia comparativamente a leitões de porcas imunes (Shibata *et al.*, 1998). Este facto pode sugerir que os anticorpos são dependentes de uma melhoria ou ocorre uma infeção

adicional no útero ou excreção do vírus no leite (Yoon *et al.*, 1996; Wagstrom *et al.*, 2001).

5.4. Desregulação imunitária pelo PRRSV

Os animais neonatos são mais sensíveis ao PRRSV, demonstrando sintomatologia mais grave comparativamente com animais adultos. Em animais adultos, o sistema imunitário já se encontra desenvolvido, especialmente o sistema de linfócitos T, havendo produção de linfócitos T citotóxicos (CTL). Adicionalmente, os animais adultos já possuem os mecanismos modulatórios que previnem respostas imunitárias exageradas, prevenindo a exagerada produção de linfócitos B que ocorre em neonatos. Como resultado, os animais adultos possuem anticorpos VN e células CTL eficientes, conferindo respostas imunitárias eficazes, independentemente da resposta imunitária inata estar comprometida. Em animais neonatos ou fetos, a imunidade inata é inibida pelo PRRSV, inibindo as defesas primárias contra a infecção. Por outro lado, a resposta imunitária adaptativa não está ainda desenvolvida e ainda não possuem os mecanismos modulatórios que os adultos possuem. Existem várias hipóteses para explicar os mecanismos de desregulação imunitária pelo PRRSV em animais neonatos (Zimmerman *et al.*, 2012; Butler *et al.*, 2014)

5.4.1. Inibição da imunidade inata e atraso na resposta imunitária adaptativa

A infecção por PRRSV em suínos induz uma produção tardia e baixa de anticorpos neutralizantes, assim como uma resposta imunitária celular fraca (Labarque *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2004). Como referido anteriormente, o PRRSV inibe a resposta imunitária inata levantando a hipótese de esta inibição ser um fator modelador do sistema imunitário pois os IFN do tipo 1 promovem a apresentação antigénica celular, as funções dos linfócitos *Natural Killer*, a produção de anticorpos pelos linfócitos B, e a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Assim, o PRRSV interrompe também o desenvolvimento da imunidade adaptativa, principalmente em animais jovens, o que explica a razão destes animais desenvolverem sintomatologia mais grave e a incapacidade de desenvolverem uma resposta imunitária protetiva durante a fase crítica da doença (Butler *et al.*, 2014).

5.4.2. Consequências da rápida diferenciação de linfócitos policlonais B nos centros germinativos

A rápida ativação dos linfócitos policlonais B resulta na hiperplasia dos linfonodos contendo células IgCC (*Ig-containing cells*) em leitões estéreis infetados por PRRSV, ocorrendo paralelamente hipergamaglobulinemia com níveis elevados de Ig, apesar da especificidade para o PRRSV ser inferior a 1% (Lemke *et al.*, 2004; Butler *et al.*, 2007). O mesmo deverá ocorrer em leitões convencionais (Butler *et al.*, 2014). Esta produção de imunoglobulinas ocorre simultaneamente com a rápida diferenciação dos linfócitos policlonais B em plasmócitos (Sinkora *et al.*, 2014). Esta observação pode indicar que a rápida diferenciação dos linfócitos policlonais B não permite a diversificação do reservatório de anticorpos. No entanto são necessário estudos que comprovem esta observação. Adicionalmente, o desenvolvimento tardio dos anticorpos VN em leitões infetados por PRRSV pode ser devido aos primeiros anticorpos possuírem pouca afinidade para com o vírus para que funcionem como anticorpos neutralizantes eficazes (Butler *et al.*, 2014).

Por outro lado, uma vez o anticorpo ligado ao antígeno, o final do complexo anticorpo-vírus formado pode depender do isótipo do anticorpo. A IgM, ao ser pentamérica, pode compensar a afinidade do local de ligação intrínseca comparando com a IgG, que não é polimérica. Portanto a IgM deveria proporcionar boa atividade VN. Uma subclasse da IgG, IgG3, pode desempenhar um papel funcional na eficácia de VN mediada por complemento. No entanto, a IgG3 surge precocemente nos fetos e neonatos e após a exposição ao vírus, as IgG3 são substituídas pelas IgG1 (Kloep *et al.*, 2012; Butler *et al.*, 2006). Durante o período em que os anticorpos VN são mensuráveis, os níveis de IgG são 10 vezes superiores aos de IgM, portanto é mais provável que a IgG seja o anticorpo no soro que é medido nos testes SVN. Estas hipóteses podem explicar a ineficácia inicial da resposta humoral para o PRRSV durante a fase crítica mas não explica a expansão extraordinária dos linfócitos B (Butler *et al.*, 2014).

5.4.3. Diferenciação dos Linfócitos T no Timo comprometida

A população de células apresentadoras de antígeno que migram para ou fazem parte da constituição do timo dos fetos ou de neonatos, como as TEC (*Thymic Epithelial Cells*), macrófagos ou pDC (*Plasmacytoid dendritic cells*) estão envolvidas no desenvolvimento dos timócitos ou comprometem o desenvolvimento dos linfócitos T. Caso o PRRSV infete as células apresentadoras de antígeno, a sua interação com os timócitos pode resultar na produção/transcrição de citocinas e transcrição de outras proteínas, o que é anormal para a idade dos animais (Butler *et al.*, 2014).

5.4.4. Indução dos Linfócitos T Citotóxicos (CTL) comprometida

Durante a infecção do PRRSV, os CTL's comportam-se de forma diferente entre animais adultos e neonatos. Nos últimos, a resposta por este tipo de células é afetada pelo fraco desenvolvimento dos precursores dos CTL's devido à redução da seleção no timo. As células que resultam dessa seleção podem ser reconhecidas como antigénio devido aos antigénios do PRRSV, resultando numa infecção das células tímicas, comprometendo a seleção dos linfócitos T. Em adultos, os precursores dos CTL's desenvolvem-se normalmente. Adicionalmente, Butler *et al.*, (2014) sugerem que a desregulação dos linfócitos B favorece o aumento de linfócitos T auxiliares CD4 (*Th – helper*), os quais não são necessários para a indução dos CTL's.

Outra hipótese que Butler *et al.*, (2014) sugerem é a ação das células MDSC (*Myeloid-derived Suppressor Cell*) comprometerem os CTL's. Estes macrófagos acumulam-se em locais de infeções crónicas virais e tumores, e inibem os CTL's. Assim, nos locais com elevada carga viral como o timo, determinados linfonodos e o pulmão podem conter as células MDSC. Por outro lado, o PRRSV é específico para macrófagos. Deste modo, pode existir a hipótese de caso ocorra infecção das células mieloides, estas se diferenciarem em MDSC, afetando os CTL's.

Apesar da existência de vários estudos relativos à interferência do PRRSV no sistema imunitário, existe pouca análise dos CTL's. São necessários estudos mais aprofundados e sensíveis para compreender a biologia deste tipo de células.

5.4.5. Evasão Imunitária devido ao NSP2

A manipulação do genoma viral do PRRSV oferece a oportunidade de realizar ensaios que permitam testar funções de desregulação imunitária por determinados genes ou proteínas virais. A NSP2 é uma das proteínas virais mais variáveis, sujeita a deleções ou adições. Esta proteína é das que primeiro surge e é também um componente estrutural dos viriões sugerindo que entra em contacto com os macrófagos, células dendríticas e outras células (Kappes *et al.*, 2013; Butler *et al.*, 2014).

Existem estudos que demonstram que variantes experimentais do VR-2332 com deleções específicas na NSP2 resultavam numa atenuação do crescimento viral, na alteração da indução do IFN- γ e numa marcada influência no tamanho dos linfonodos traqueobronquiais, sendo o aumento menor para as estirpes variantes (Faaberg *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011).

Os estudos referidos demonstram que a NSP2 demonstra certa influência na resposta imunitária ao PRRSV. No entanto são necessários mais estudos envolvendo estirpes mais virulentas como a MN-184 ou HP-PRRSV e estudos que envolvam deleções/adições de aminoácidos em outras regiões do NSP2 (Butler *et al.*, 2014).

6. DIAGNÓSTICO

A observação de problemas reprodutivos no efetivo reprodutor e problemas respiratórios em porcos de qualquer idade numa exploração suínica pressupõem a presença do PRRSV. No entanto, apesar de sugestivos para a PRRS, estes sinais não são específicos, existindo uma variedade de outras doenças virais ou bacterianas que causam sinais semelhantes (Zimmerman *et al.*, 2012).

Dependendo da região, podemos ter como diagnósticos diferenciais peste suína clássica, citomegalovirus, encefalomielite hemaglutinante, leptospirose, parvovirose, circovirose, doença de Aujeszky, influenza suína ou doença de Teschen (Halbur, 2003), estando estes frequentemente presentes em coinfeções, dificultando o diagnóstico. Para o diagnóstico definitivo, é sempre necessária a demonstração do vírus.

6.1. Detecção de anticorpos

A serologia é frequentemente usado porque o soro é facilmente colhido em grandes quantidades para múltiplos testes. A demonstração de seroconversão usando amostras de soro é o método definitivo para o diagnóstico serológico de infecção de PRRSV. Títulos elevados de anticorpos específicos contra PRRSV demonstrados por IFA (*Indirect Fluorescent Antibody test*) ou por elevados rácios S/P (*sample-to-positive values*) de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em grupos de animais infectados podem indicar também infecção por PRRSV (Zimmerman *et al.*, 2012).

Existem várias técnicas para a deteção de anticorpos incluindo os testes IFA (*Indirect Fluorescent Antibody test*), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou SVN (*Serum-virus neutralization test*). O ELISA é o teste mais utilizado devido à sua facilidade, baixo custo e exigir menor experiência para a sua interpretação (Sørensen *et al.*, 1997; Diaz *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2009).

6.1.1. Os Anticorpos IgM e IgG

Ao entrarem em contato com o PRRSV, os animais de todas as idades seroconvertem de forma rápida. Normalmente, as imunoglobulinas M (IgM) são detetadas ao 5º dia, atingindo o seu pico ao 7º dia. As imunoglobulinas G (IgG) são detetadas ao 7º dia e obtêm o pico aos 30 a 50 dias após a infecção. Este período pode ser muito variável, dependendo da estirpe em causa, da carga viral a que os animais foram expostos e do *kit* de diagnóstico usado. As IgM persistem por 21 a 28 dias após a infecção, enquanto as IgG permanecem constantes e decrescem até níveis baixos aos 300 dias após infecção (Joo *et al.*, 1997; Batista *et al.*, 2004; Mulupuri *et al.*, 2008).

No diagnóstico serológico, é importante considerar que a dinâmica dos anticorpos é variável (dependendo do tipo de anticorpo e antígeno correspondente). Por norma, os ensaios que detetam as IgM, detetam seroconversões rápidas, sendo possível encontrar animais positivos precocemente. Contrariamente, a deteção de IgG é mais tardia, sendo que este tipo de anticorpos é produzido entre a 1ª e 2ª semana pós-infeção, podendo mesmo adiar-se até à 3ª ou 4ª semana, dependendo da estirpe, carga viral a que os animais são expostos e do antígeno.

Existem *kits* que ao detetar anticorpos IgM identificam precocemente a infeção por PRRSV. Os *kits* ELISA *standard*, usados mundialmente e frequentemente, detetam maioritariamente anticorpos IgG. Os *kits* que detetam IgM possuem baixa sensibilidade e especificidade, enquanto os *kits* que detetam IgG possuem baixa sensibilidade para IgM e apenas detetam anticorpos 7 dias pós-infeção. Existem *kits* ELISA que detetam ambos os tipos de anticorpos, denominados DR-ELISA (*Double Recognition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que diminuem o tempo para detetar animais seropositivos (Kim *et al.*, 2007; Venteo *et al.*, 2012).

6.1.2. ELISA

Como referido anteriormente, a proteína viral N é a mais abundante, altamente imunogénica e induz precocemente uma resposta imunitária com produção de anticorpos (Nelson *et al.*, 1994). Esta proteína tem sido usada extensivamente no desenvolvimento de *kits* ELISA comerciais. Os *kits* usados mais frequentemente, detetam maioritariamente anticorpos IgG.

O *kit* ELISA comercial (HerdChek® X3 PRRS ELISA, IDEXX Laboratories Inc.) é um dos testes mais usados para a deteção de anticorpos contra PRRSV, sendo simultaneamente bastante sensível e específico. Um estudo realizado (Iowa State University, 2010) por 3 laboratórios indicou que a especificidade do *kit* no diagnóstico é de 99.9% usando 1445 soros negativos. O *kit* deteta anticorpos contra os antígenos do nucleocápside das estirpes tanto do tipo 1 (Europeu) como do tipo 2 (Norte Americano), sendo detetado anticorpos 9 dias após a infeção, com maior pico aos 30 a 50 dias após a infeção, descendo para valores negativos 4 a 12 meses após a infeção (Roberts, 2003). Adicionalmente, está comprovado que as NSP1, 2 e 7 induzem elevados níveis de anticorpos durante a infeção por PRRSV. Um teste ELISA foi desenvolvido usando NSP2 e NSP7 para monitorizar as respostas dos anticorpos em suínos contra ambos os tipos de PRRSV. Os anticorpos foram detetados aos 14 dias após a infeção e, durante os 126 dias após a infeção, os resultados dos testes ELISA demonstraram correlação com os resultados do *kit* 2XR ELISA. O teste ELISA

usando *NSP7* resolveu também 98% dos casos com suspeita de falsos positivos no teste 2XR ELISA (Brown *et al.*, 2009).

Existe alguma dificuldade na interpretação de resultados ELISA negativos ou positivos. Os resultados negativos poderão ter várias interpretações como: (1) não ocorreu infecção; (2) houve infecção mas não seroconverteram; (3) os porcos estão persistentemente infetados mas tornaram-se seronegativos; (4) a infecção terminou e os animais tornaram-se seronegativos ou (5) o teste possui pouca sensibilidade (Yoon *et al.*, 2003). Por outro lado, porcos com resultados negativos para ELISA podem estar persistentemente infetados, como demonstrado no isolamento do vírus ativo ou detecção de ARN viral nas amígdalas, tecidos linfoides e raspagens orofaríngeas (Horter *et al.*, 2002; Fangman *et al.*, 2007).

As serologias ELISA possuem limitações no diagnóstico da PRRS em animais adultos de explorações anteriormente infetadas ou vacinadas, pois os ensaios serológicos não permitem a diferenciação dos anticorpos resultantes da infecção, reinfeção ou vacinação. Isto deve-se à inexistência de vacinas marcadas ou devido às reinfeções não originarem respostas anamnésicas. Em conclusão, as serologias em animais adultos limitam-se à detecção de seroconversões na adaptação de marrãs ou na monitorização de explorações negativas.

Por outro lado, a serologia é útil em detetar infeções em animais em crescimento. Ao perderem a imunidade materna, estes tornam-se seronegativos até ao momento em que se infetem ou sejam vacinados. Este facto leva à realização frequente de perfis sorológicos para determinar o momento exato onde ocorre a infecção.

Não existem uma relação direta entre os valores S/P e o título real de anticorpos dos animais pois a estirpe do PRRSV que causa a infecção pode influenciar os resultados. Do mesmo modo, não é possível estabelecer uma correlação entre os valores S/P e o tempo decorrido após a infecção, já que estirpes diferentes podem ter resultados diferentes para um mesmo período após a infecção. Deste modo, não é possível corresponder valores S/P baixos a anticorpos vacinais e valores altos a anticorpos contra o vírus de campo (Kim *et al.*, 2007; Diaz *et al.*, 2012; Venteo *et al.*, 2012).

6.1.3. IFA (*Indirect Fluorescent Antibody*)

O teste IFA consiste em colocar uma amostra de soro em células infetadas pelo PRRSV e verificar se ocorre reação antígeno-anticorpo através do uso de anticorpos anti-suíno marcados com fluoresceína. O teste IFA possui boa especificidade, enquanto a sensibilidade depende de vários fatores como o protocolo

utilizado, tempo de incubação, tipo de células utilizadas e da interpretação subjetiva da reação pelo técnico de laboratório. Também depende do grau de variabilidade antigénica entre o PRRSV usado no teste e do PRRSV que infetou o porco-amostra, especialmente em explorações infetadas pelo PRRSV Tipo 1 (Christopher-Hennings *et al.*, 2002).

Comparativamente ao ELISA, o teste IFA permite estimar a magnitude do título de anticorpos. Quando é usado uma estirpe homóloga neste tipo de teste, este permite-nos identificar fiavelmente anticorpos aproximadamente 3 meses pós-infeção (Yoon *et al.*, 1995). É também usado na confirmação de falsos positivos suspeitos de ELISA, mas é também usado para detetar anticorpos contra o PRRSV no transudado do músculo e em amostras de fluido oral como vigilância (Molina *et al.*, 2008; Prickett *et al.*, 2010).

6.1.4. SVN (*Serum-virus neutralization test*)

O teste SVN permite detetar anticorpos capazes de neutralizar para uma quantidade constante de PRRSV (anticorpos neutralizantes). Recorre a uma cultura celular na qual uma determinada quantidade de PRRSV é incubada com várias diluições do soro. Após a incubação, o soro é colocado numa linha de células sensíveis para determinar o título de anticorpo capaz de neutralizar o vírus (Christopher-Hennings *et al.*, 2002). O teste é altamente específico mas este tipo de anticorpos desenvolve-se apenas 1 a 2 meses pós-infeção (Benfield *et al.*, 1992), possuindo menor sensibilidade que o teste IFA ou ELISA por essa mesma razão (Christopher-Hennings *et al.*, 2002). Os anticorpos atingem o pico aos 60 a 90 dias pós-infeção e persistem durante 1 ano (Zimmerman *et al.*, 2012).

Tal como no teste IFA, a magnitude da resposta dos anticorpos neutralizantes deverá ser superior quando é usado o vírus de campo no ensaio (estirpes homólogas), contrariamente ao uso de diferentes estirpes (estirpes heterólogas).

A interpretação e a aplicação dos resultados do teste SVN nas situações de campo são complicadas devido à falta de evidência da correlação entre os anticorpos neutralizantes e a imunidade/proteção. Por outro lado, a estirpe usada no teste pode influenciar os resultados, causando problemas na interpretação de dados entre vários laboratórios.

Este tipo de ensaio não é muito usado como diagnóstico de rotina. O teste SVN é mais dispendioso, difícil de realizar e mais demorado que outros testes serológicos. No entanto, o seu uso deve ser considerado para investigação (Christopher-Hennings *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2012).

6.2. Isolamento do vírus

O PRRSV é detetado em grandes quantidades durante a viremia, atingindo o pico aos 4 a 7 dias após a infecção, até aos 28 aos 42 dias em leitões ou porcos de engorda e até aos 7 aos 21 dias em porcas ou varrascos (Christopher-Hennings *et al.*, 1995; Mengeling *et al.*, 1996; Kittawornrat *et al.*, 2010). No entanto, pode identificar-se o vírus ou o ARN viral em lavagens pulmonares, na saliva, nas amígdalas e nos linfonodos após várias semanas da viremia (Mengeling *et al.*, 1995; Horter *et al.*, 2002; Rowland *et al.*, 2003; Wills *et al.*, 2003; Ramirez *et al.*, 2012)

As amostras devem ser refrigeradas a 4°C imediatamente após a colheita e enviadas para o laboratório em 24 a 48 horas, pois o vírus é instável ao calor e possui pouca estabilidade a variações de pH (Jacobs *et al.*, 2010).

O PRRSV pode ser isolado de MAP's, ou de células sublineares (CI-2621, MARC-145) da linha celular do rim do macaco Africano, MA-104. As MAP's são mais sensíveis para o isolamento do vírus e a presença de recetores Fc nestas células podem melhorar o sucesso do isolamento do vírus na presença de anticorpos (Yoon *et al.*, 2003). As estirpes podem variar a capacidade de replicação em MAP's ou MA-104 (Bautista *et al.*, 1993), sugerindo que ambos os tipos de células deveriam ser usados para melhor isolamento do vírus. (Yoon *et al.*, 2003). O uso de MAP's é significativo para o sucesso do isolamento do PRRSV tipo 1 (europeu) e das suas estirpes (Wensvoort *et al.*, 1991; Christopher-Hennings *et al.*, 2002).

6.3. Deteção do vírus:

Existem diversas formas de realizar-se a deteção do PRRSV isolado. Técnicas como RT-PCR ou utilizando anticorpos fluorescentes ou monoclonais específicos contra o PRRSV. Também começaram a desenvolver-se testes rápidos para o PRRSV.

6.3.1. Anticorpos fluorescentes e Imunohistoquímica

O PRRSV isolado numa cultura celular é confirmado pela visualização dos antígenos da nucleocápside viral no citoplasma de células infetadas através de anticorpos fluorescentes (*Fluorescent antibody* – FA) ou através da Imunohistoquímica (*Immunohistochemistry* – IHC), usando anticorpos monoclonais específicos contra o PRRSV (Nelson *et al.*, 1993). Pode usar-se também o contraste negativo da microscopia eletrónica para observar-se partículas do vírus em culturas.

O pulmão, as amígdalas, linfonodos, coração, cérebro, timo, baço e rim devem ser fixados numa solução tampão a 10% de formalina para avaliação microscópica e

IHC, permitindo a visualização de antígenos virais no citoplasma celular (Halbur *et al.*, 1994; Van Alstine *et al.*, 2002; Yaeger, 2002). As amostras devem ser processadas 48 horas após a fixação para evitar a degradação do antígeno do PRRSV e a perda de células positivas à IHC (Van Alstine *et al.*, 2002). A detecção do PRRSV no pulmão por IHC requer o exame de pelo menos 5 secções do pulmão crânio-ventral para identificar mais de 90% dos suínos infetados (Yaeger, 2002). A técnica FA é mais vantajosa, sendo mais rápida e menos dispendiosa que a IHC mas esta técnica requer amostras recentes. O antígeno viral pode ser também detetado em secções de pulmão congelado por FA (Rossow *et al.*, 1995).

6.3.2. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

A técnica RT-PCR, transcrição reversa do ARN viral (RT – *Reverse Transcription*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), caracteriza-se por realizar um elevado número de cópias do ácido nucleico com o objetivo de obter uma quantidade facilmente detetável e quantificável, permitindo deste modo detetar quantidades muito baixas de ácido nucleico a partir da amostra. Possui elevada sensibilidade e especificidade o que estimulou o seu uso no diagnóstico da doença. Adicionalmente, o RT-PCR é necessário para obter um diagnóstico definitivo, que comprova a presença do vírus nas amostras biológicas. No entanto, em condições práticas reais, nem sempre é possível o diagnóstico concreto devido a determinados fatores. A sensibilidade e a especificidade do teste podem variar de laboratório para laboratório devido à diversidade de metodologias e de fabricantes de distintos reagentes para os diferentes passos da RT-PCR. Por outro lado, algumas amostras contêm inibidores da reação RT ou PCR (como os fluidos orais ou o sémen), o que leva ao aparecimento de resultados negativos, comprometendo a sensibilidade da técnica. A elevada variabilidade do PRRSV também compromete a sensibilidade da técnica, dependendo fundamentalmente da homologia entre a sequência de nucleótidos do ARN do PRRSV e a sequência dos *primers* que se utilizam. Finalmente, a contaminação entre amostras é muito frequente, o poderá levar à obtenção de falsos positivos se não forem tomadas precauções.

Ao planear uma amostragem, é necessária conhecer a dinâmica da infeção para que, no caso da presença do PRRSV numa exploração, a escolha das amostras seja de animais positivos ao vírus. Por exemplo, ocorrendo um surto de PRRS numa exploração com reprodutoras, devemos ter em conta que leva aproximadamente 10 a 15 dias pós-infeção a ocorrer abortos. Relembrando que animais adultos têm um período de viremia curto, podem surgir animais que abortaram não virémicos, o que

leva a resultados negativos em amostras de soro, não se obtendo o diagnóstico. Pelo contrário, animais jovens possuem períodos de viremia relativamente longos, o que facilita a detecção do vírus em amostras de soro (Rossow, 1998; Prieto *et al.*, 2005; Truyen *et al.*, 2006; Rovira *et al.*, 2007; Wernike *et al.*, 2012).

A primeira vez que o ensaio de RT-PCR foi usado para o PRRSV foi em sêmen e soro de varrasco (Christopher-Hennings *et al.*, 1995), tornando possível a detecção do vírus em sêmen sem o isolamento do vírus. As primeiras preocupações dos ensaios de RT-PCR foram os falsos positivos, a incapacidade de diferenciar o tipo 1 e tipo 2 do PRRSV num único ensaio e a incapacidade de detetar geneticamente as diferentes estirpes dos tipos de PRRSV. Atualmente existem vários tipos de ensaio de PCR para a detecção do PRRSV do tipo 1 e do tipo 2. Com o contínuo desenvolvimento da tecnologia do PCR e a crescente disponibilidade de ensaios comerciais, estas áreas irão sofrer melhorias significativas (Zimmerman *et al.*, 2012).

Em infeções agudas, as melhores amostras para o PCR são o soro e tecidos apropriados para o isolamento do vírus. O PRRSV pode ser encontrado no sêmen até aos 92 dias após a infeção, sendo a média aos 35 dias após a infeção. Em suínos persistentemente infetados, o ARN viral é detetado nos linfonodos até aos 86 dias, em raspagens orofaríngeas até aos 105 dias, e no soro e nas amígdalas até aos 251 dias por PCR (Christopher-Hennings *et al.*, 1995, 2001; Bierk *et al.*, 2001; Horter *et al.*, 2002; Wills *et al.*, 2003).

A RT-PCR é uma técnica de eleição para o diagnóstico da PRRS nos seguintes casos: 1- Em surtos nas reprodutoras em que ocorram problemas reprodutivos. Nestas situações, a viremia poderá ser curta e já ter concluído antes dos sinais reprodutivos. Os fetos abortados frequentemente originam também resultados negativos. Isto deve-se aos processos autolíticos que degradam o ARN viral ou nem todos os fetos abortados estão infetados. Assim, um resultado positivo indica o diagnóstico, enquanto um resultado negativo não descarta a PRRS. Concluindo, em casos de problemas reprodutivos, as amostras de eleição são de leitões nascidos débeis, já que estes possuem viremias longas; 2 – No caso de infeção de varrascos, o diagnóstico pode confirmar-se através a presença do vírus no sêmen. A RT-PCR é uma forte ferramenta de monitorização dos centros de inseminação artificial; 3 – Em leitões nas recrias ou nas engordas, a RT-PCR poderá complementar as serologias para determinar o momento de infeção. Do mesmo modo, a detecção da presença do PRRSV no pulmão poderá justificar sintomatologias respiratórias existentes; 4 – A RT-PCR é frequentemente utilizada na monitorização dos programas de controlo da doença (Rossow, 1998; Prieto *et al.*, 2005; Truyen *et al.*, 2006; Rovira *et al.*, 2007; Wernike *et al.*, 2012).

6.4. Outras técnicas de diagnóstico

6.4.1. Testes rápidos

Foi também criado um teste imunocromatográfico para a detecção rápida de PRRSV, em que se mistura o soro ou tecido homogeneizado com uma solução contendo anticorpos monoclonais contra as proteínas N e M do PRRSV. O vírus liga-se aos anticorpos e os complexos antígeno-anticorpo são capturados nas tiras cromatográficas. As reações positivas são detetadas usando um anticorpo marcado que se liga aos anticorpos monoclonais. (Zhou *et al.*, 2009).

6.4.2. Fluidos orais

Atualmente existem técnicas que permitem determinar a infecção pelo PRRSV em amostras de fluidos orais, recolhidos através da mordedura de cordas. Estas técnicas têm como base o fundamento dos fluidos orais conterem anticorpos do tipo IgA e IgG que são produzidos após a infecção. Por outro lado, o vírus é excretado por diversas secreções orgânicas, incluindo a saliva. Assim, é possível determinar a presença do PRRSV por períodos prolongados.

Esta técnica possui a vantagem dos veterinários de campo e os produtores obterem as amostras de maneira fácil e sem ser necessário imobilizar os animais, permitindo obter um elevado número de amostras e realizar controlos periódicos facilmente. Por outro lado, os estudos realizados indicam uma forte correlação entre os resultados obtidos através de fluidos orais e os resultados obtidos através de soros. No entanto, esta técnica possui algumas limitações. Na recolha das amostras através de uma corda num parque, não podemos assumir que todos os animais morderam a mesma. Esta técnica depende de fatores como o tamanho do grupo, relações de dominância, tipo de corda e idade dos animais. Para que a amostragem seja representativa de uma população, devem ser colhidas várias amostras por grupo de idade, dependendo do tamanho da população, do número e da distribuição dos parques. Contudo, há dificuldades na recolha dos fluidos orais em alguns suínos adultos que se recusem a morder as cordas, especialmente de forma sistemática e repetida. Em leitões muito novos, também deverá existir dificuldade por estes não manifestarem interesse pelas cordas que obtêm as amostras.

É importante relevar que os resultados obtidos por esta técnica sejam fiáveis, é crucial que a obtenção e a conservação das amostras sejam adequadas. Caso contrário, haverá a degradação das mesmas ou a amostragem não será válida o que levará a resultados imprecisos. Adicionalmente, é necessário que as técnicas

serológicas e moleculares estejam adaptadas para este tipo de amostra já que, caso isso não aconteça, os resultados não serão válidos (Kittawornrat *et al.*, 2010; Chittick *et al.*, 2011; Gerber *et al.*, 2013).

6.5. Classificação das estirpes (tipificação)

Existe a necessidade de determinar a origem do PRRSV que circula na exploração afetada ou na zona geográfica. Isto permite identificar a possível origem do vírus e identificar as vias de disseminação, desde que se possua uma base de dados sólida.

Anteriormente, as estirpes do PRRSV eram diferenciadas usando o polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) da *ORF5*. Esta técnica não é sensível para a classificação genética das diferentes estirpes do vírus, sendo que duas estirpes de PRRSV geneticamente diferentes podem partilhar RFLP semelhantes. A sequenciação e a análise filogenética permitem essa classificação de forma mais precisa e exata (Zimmerman *et al.*, 2012).

Na maioria dos casos, realiza-se a sequenciação das *ORFs* do genoma viral. É realizada a partir dos produtos diretos do PCR para evitar a seleção, mutação ou alteração nucleótica na passagem entre culturas celulares. A *ORF5* é altamente variável o que permite realizar uma eficaz distinção entre estirpes (Zimmerman *et al.*, 2012). Por outro lado, mantém os segmentos relativamente conservados, o que permite agrupar os vírus isolados de forma coerente. Outro segmento muito utilizado é a *ORF7* mas a discriminação entre estirpes é inferior. As *ORF5* e *ORF7* representam 4% e 2,5% do genoma viral, respetivamente, sendo necessária precaução nas conclusões retiradas da tipificação (Prieto *et al.*, 2009; Murtaugh, 2012).

Adicionalmente deve-se considerar que os vírus isolados que possuam aproximadamente 97% de similaridade na *ORF5* tenham origens distintas e é importante referir que *ORF5* possui uma taxa de variação anual entre 0,5 a 1%, devido à variabilidade genética do vírus. Estes dados indiciam que na interpretação da semelhança entre estirpes, devem ser utilizados dados anteriores da situação epidemiológica e clínica da exploração (Murtaugh, 2012).

A tipificação, ao dar-nos a sequenciação da estirpe em questão, permite a comparação com as estirpes vacinais existentes, identificar as estirpes de campo mais próximas e enquadrar a estirpe em questão no dendograma. O dendograma (ou árvore filogenética) mostra as relações filogenéticas baseadas nas similaridades ou

diferenças genéticas. Outra utilidade da tipificação é identificar a movimentação do PRRSV numa determinada região, implicando o mapeamento das conexões entre as diferentes explorações dessa mesma região. No entanto, a tipificação não permite obter de forma direta e previsível informações sobre a virulência da estirpe nem decidir qual a vacina mais indicada para o caso (Diaz *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2008, 2009; Murtaugh, 2012; Zimmerman *et al.*, 2012).

7. CONTROLO E ERRADICAÇÃO DA PRRS NAS EXPLORAÇÕES

O controlo da PRRS tem como objetivo interromper a entrada do vírus em explorações negativas ou a entrada de novas variantes em explorações infetadas (Dee *et al.*, 2001b; Pitkin *et al.*, 2009a). A erradicação da PRRS tem como objetivo erradicar o PRRSV da exploração, assim como controlar os seus efeitos adversos nas diferentes fases de produção. No entanto não existem tratamentos específicos para a PRRS.

À medida que todos os animais numa exploração possuam imunidade para o vírus, o PRRSV não conseguirá replicar-se e acaba por ser eliminado da exploração. Mas antes da erradicação do vírus, é necessário primeiro implementar práticas de manejo com o objetivo de reduzir a carga viral.

7.1. Classificação das explorações

Existem várias possibilidades de programas de controlo e erradicação do PRRSV e o seu êxito depende significativamente da circulação do vírus em cada exploração. Com isto, criou-se um sistema de classificação sanitária das explorações que permite escolher qual o plano mais adequado e eficaz. A classificação das explorações face ao PRRSV tem como base: 1- a situação de exposição viral, sendo uma exploração positiva ou negativa e; 2- o padrão de circulação do vírus na exploração, em explorações positivas. A exposição e a circulação são dependentes da deteção dos anticorpos e deteção do vírus, respetivamente (Holtkamp *et al.*, 2011).

Atualmente as explorações de reprodutoras são classificadas em 4 categorias diferentes: 1) **Categoria I:** explorações positivas instáveis; 2) **Categoria II:** explorações positivas estáveis. Estas podem dividir-se em explorações positivas estáveis propriamente ditas (*Categoria II-A*) e explorações positivas estáveis submetidas a programas de erradicação (*Categoria II-B*); 3) **Categoria III:** explorações provisoriamente negativas; **Categoria IV:** explorações negativas.

A categoria I inclui as explorações positivas que possuem animais expostos ao vírus e nas explorações em que existe a circulação do vírus nos reprodutores. Deteta-se a presença do vírus através do efetivo reprodutor ou através dos leitões em lactação infetados via transplacentária ou durante a lactação. Deste modo, todas as explorações onde ocorrera um surto de PRRS recente e todas as que o vírus circula de forma crónica classificam-se como Categoria I. As explorações em que se desconhece o estado relativo ao PRRSV, também são classificadas com a mesma categoria (Holtkamp *et al.*, 2011).

Tabela 2. Excreção e exposição virais de acordo com cada categoria de classificação da exploração.

<i>Categoria</i>	<i>Excreção viral</i>	<i>Exposição viral</i>
<i>I – Positiva instável</i>	<i>Positiva</i>	<i>Positiva</i>
<i>II-A – Positiva estável</i>	<i>Duvidosa</i>	<i>Positiva</i>
<i>II-B – Positiva estável com programa de eliminação</i>		
<i>III – Provisoriamente negativa</i>	<i>Negativa</i>	<i>Positiva</i>
<i>IV – Negativa</i>	<i>Negativa</i>	<i>Negativa</i>

A Categoria II são explorações seropositivas onde, no entanto, podem possuir alguma excreção do vírus entre os reprodutores. A classificação nesta categoria requer a ausência de qualquer manifestação de sinais clínicos de PRRS e a confirmação de ausência de leitões virêmicos (ou seja, negativos ao PCR) por um período mínimo de 90 dias. A classificação requer no mínimo 4 resultados PCR negativos consecutivos em amostras de leitões com idade de desmame colhidas a cada 30 dias ou menos dias. A idade de desmame é definida por Holtkamp *et al.*, (2011) como o intervalo entre os 7 dias pré-desmame e os 3 dias pós-desmame. Na Categoria II há a distinção entre as explorações não submetidas aos programas de erradicação (Categoria II-A) e as explorações submetidas (Categoria II-B). Holtkamp *et al.*, (2011) referem que os programas de erradicação começam quando ocorre a introdução do último animal positivo na exploração ou quando ocorre a exposição intencional ao vírus (seja de campo ou vacinal) do último animal de reposição. As explorações na Categoria II-A têm como objetivo a tentativa de controlo do PRRSV e não a sua erradicação (Holtkamp *et al.*, 2011).

A Categoria III inclui as explorações provisoriamente negativas. No entanto, estas explorações são seropositivas mas não existe circulação viral no efetivo reprodutor. Para uma exploração ser classificada nesta categoria, é necessária a ausência de seroconversão nos animais de reposição negativos ao PRRSV. Esta quebra na seroconversão demonstra que o PRRSV já não é transmitido no efetivo reprodutor. Estes animais de reposição negativos devem entrar em contato com animais anteriormente positivos e permanecerem negativos nas serologias por um período mínimo de 60 dias após a entrada no ciclo produtivo. Adicionalmente, se existem animais em crescimento na exploração, estes devem permanecer também seronegativos (Holtkamp *et al.*, 2011).

A Categoria IV inclui as explorações seronegativas ao PRRSV e, portanto, sem circulação do vírus. As explorações que se enquadram nesta categoria podem

alcançar o estado negativo de diversas maneiras. Deste modo, a comprovação desse estado negativo é obtida quando todos os reprodutores infetados foram substituídos por reprodutores negativos e estes últimos permaneçam negativos (a amostra deve ser suficientemente grande para assegurar com 95% de confiança que o resultado é representativo). Deste modo, uma exploração classificada como Categoria III com animais seronegativos que mantenha essa mesma classificação no mínimo por 1 ano pode obter a classificação como Categoria IV. Por outro lado, as explorações novas ou que tenham sido despovoadas e repovoadas com animais seronegativos que consigam permanecer negativas pelo menos 1 mês, são também introduzidas nesta categoria (Holtkamp *et al.*, 2011).

7.2. Práticas de redução da carga viral

As práticas com o objetivo de reduzir a carga viral devem ser implementadas antes do início da erradicação do vírus. Incluem práticas de biossegurança interna e externa, higienização e alteração das práticas de manejo (Torremorell *et al.*, 2000; Dufresne, 2003; Zimmerman *et al.*, 2007).

7.2.1. McREBEL™ PRRS

O programa McREBEL™ (*Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses*) foi desenvolvido pelo Dr. Monte McCaw na Universidade do Estado da Carolina do Norte. Consiste num conjunto de práticas com o objetivo de reduzir infeções bacterianas e o seu impacto económico (McCaw, 1995). Aplicando este programa ao PRRS, reduz-se eficazmente a transmissão do PRRSV assim como infeções bacterianas secundárias.

O McREBEL™ PRRS (Tabela 3) inclui o controlo do *timing* das adoções nas maternidades, não ultrapassando as 24h pós-parto de forma a assegurar a ingestão do colostro; o controlo do movimento das porcas e dos leitões entre salas, aplicando o esquema “*All In-All Out*”; eutanásia de leitões fracos e inviáveis e manter o ciclo de produção na maternidade e salas de recria (McCaw, 2006). Em explorações com programas de erradicação do PRRSV que não aplicaram o programa McREBEL™ PRRS resultaram em reinfeções nas populações de leitões (Polson *et al.*, 2010).

Tabela 3. Programa McREBEL[®] PRRS (Adaptado de McCaw, 2006).

1. Não realizar trocas de leitões entre ninhadas após as 24h de vida.
 - a. Mover o número mínimo de leitões necessário para ocupar os tetos funcionais;
 - b. Não realizar adoções que criem ninhadas de tamanhos ou género uniforme;
 - c. Quando necessário mover leitões em excesso relativamente ao número de tetos, de tamanho medio ou grande, deve-se juntar por tamanho e em porcas com boa produção de leite e recetividade;
 - d. Assegurar que leitões enfraquecidos não são prioritários para ser atribuídos os tetos ou permanecerem junto das mães.

Maximizar sempre o número de leitões juntos das mães.

2. Não mover leitões entre maternidades:
 - a. Deve ser seguido a metodologia “*All In-All Out*”;
3. Remover animais muito doentes, fracos ou com má condição corporal da produção:
 - a. Vender ou eliminar leitões que ao desmame são demasiado magros ou pequenos para sobreviver ao desmame;
 - b. Eliminar leitões que não melhoram rapidamente após o tratamento;
 - c. Eliminar leitões muito magros, pequenos, muito deprimidos, cabeludos ou cronicamente doentes.

Um leitão que é salvaguardado do desmame retira um teto de um leitão potencialmente saudável.

4. Utilizar boas práticas de manejo nos desmames para garantir a sobrevivência e performance dos leitões:
 - a. Separar os leitões por tamanhos com cuidados;
 - b. Colocar os mais pequenos nos locais mais quentes e com menos correntes de ar das salas;
 - c. Alimentar à mão os leitões mais pequenos 4 vezes por dia por 5 dias consecutivos;
 - d. Usar lâmpadas ou tapetes de plástico para leitões pequenos;
 - e. Facilitar o acesso de água aos leitões nas primeiras 24h.

O número de leitões desmamados não deverá ser superior ao número de tetos funcionais.

Para maximizar os números de leitões desmamados, deve maximizar-se o número de tetos funcionais através da seleção apropriada de marrãs e seleção das porcas reformadas.

7.2.2. Biossegurança

A biossegurança interna baseia-se no controlo do movimento do vírus dentro da exploração de animais infetados para animais sensíveis. É usada em casos de surtos de PRRS para minimizar o número de animais afetados e reduzir a carga viral a circular. Alguns exemplos de medidas de biossegurança interna encontram-se descritas no quadro 4.

Tabela 4. Medidas gerais de biossegurança interna (Charbonneau *et al.*, 2007).

- Paragem da circulação de animais positivos em salas de desmame;
- Paragem da circulação de porcas durante o surto de PRRS;
- Isolar as porcas que abortaram;
- Limpeza e desinfeção das celas ou parque onde as porcas abortaram;
- Mudar de agulhas entre porcas ou ninhadas;
- Uso de luvas no maneo de ninhadas e mudar entre as mesmas;
- Lavar as botas e as mãos e mudar de roupa depois de manusear animais doentes, principalmente os que se saiba que estão a excretar o vírus;
- Aplicar desinfetantes nos corredores e entradas;
- Permitir a desinfeção dos materiais de maneo de leitões;
- Controlo da circulação dos carros de ração entre salas;
- Eutanasiar animais com poucas possibilidades de recuperação;
- Manter o ciclo de produção unidirecional: evitar que animais voltem para populações de animais mais novos ou evitar prolongadas permanências na enfermaria;
- Utilizar o esquema “*All In-All Out*”.

A biossegurança externa é igualmente importante para o controlo da entrada de novas doenças. Existem várias medidas de prevenção. Em regiões com maior densidade de explorações pecuárias, a prevenção do PRRSV pode incluir a filtração do ar ou sistemas de tratamento de ar. A filtração tem demonstrado ser eficaz na redução do risco de entrada do PRRSV e outros agentes transportados pelo ar como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pitkin *et al.*, 2009a; Dee *et al.*, 2010; Otake *et al.*, 2010;

Reicks, 2010). Spronk *et al.*, (2010) demonstrou que, numa área com elevada densidade de explorações suinícolas, 2 dessas explorações preveniram o PRRSV com a filtragem do ar, contrariamente a 5 explorações dessa mesma área que se infetaram no período de observação. O uso de quarentenas para a entrada de suínos na exploração, higienização e secagem dos veículos de transporte e outros materiais que entrem na exploração, controlo da entrada de pessoas na exploração como o banho à entrada ou com a “*Danish Entry*”, e controlo de insetos são exemplos de outras medidas. A “*Danish Entry*” consiste na entrada numa primeira divisão onde se deixa as roupas e os sapatos, lavam e higienizam as mãos numa segunda divisão, e vestem roupa da própria pecuária numa terceira divisão (Zimmerman *et al.*, 2012).

7.2.3. Higienização

A higienização é feita entre lotes de porcos de modo a eliminar o PRRSV de explorações infetadas. Todo o material orgânico como fezes, urina, comida ou camas devem ser totalmente removidos. As superfícies devem ser lavadas, preferencialmente com detergentes para assegurar a eliminação de biofilmes.

Após a lavagem, deve proceder-se à desinfeção. Alguns exemplos de produtos eficazes contra o PRRSV são as misturas de amónia quaternária com glutaraldeído ou monopersulfato de potássio, sendo aplicados com a concentração de 0,8% e 1%, respetivamente. Os desinfetantes devem estar em contato com as superfícies no mínimo 2 horas. Após a desinfeção, um passo importante para a inativação do vírus é a secagem das instalações (Pitkin *et al.*, 2009b).

7.3. Imunização de explorações suinícolas

7.3.1. Vacinação: vacinas vivas modificadas vs vacinas mortas

Existe no mercado uma grande variedade de vacinas dividida em dois grandes grupos: vacinas vivas modificadas (MLV – *Modified Live Virus*) e vacinas mortas ou inativadas.

As vacinas vivas modificadas são consideradas mais eficazes na indução de uma resposta imunitária comparativamente com as vacinas mortas. As vacinas vivas, como as estirpes de campo distribuem-se no organismo e como se replicam, contrariamente às vacinas mortas. Por outras palavras, a resposta imunitária obtida com a vacina viva é semelhante à resposta imunitária face às estirpes de campo, produzindo uma resposta imunitária tanto celular como humoral, embora menos intensa. Ocorre produção de anticorpos neutralizantes e de células produtoras de IFN-

γ, específicas contra o vírus (Piras *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006; Zimmerman *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2013).

A resposta imunitária obtida pela vacina viva é suficiente para induzir uma proteção variável e dependente da estirpe de campo (Díaz *et al.*, 2006). O nível de proteção heteróloga transmitida pelas vacinas vivas atenuadas é variável de caso para caso e normalmente estas vacinas possuem dificuldades em manter proteção imunitária contra estirpes heterólogas em porcas, comparativamente com a proteção natural homóloga (Lager *et al.*, 1997; Opriessnig *et al.*, 2005; Kimman *et al.*, 2009). Em geral, observa-se uma diminuição da duração da viremia, menor taxa de infecção transplacentária, menor distribuição no organismo e menor excreção viral nos animais vacinados, comparativamente aos animais não imunizados. (Scortti *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2007a, b; Zuckermann *et al.*, 2007; Okuda *et al.*, 2008; Martelli *et al.*, 2009) São eficazes na redução da sintomatologia após o surto com estirpes de campo mas não são frequentemente eficazes na proteção de infecções virais (Cano *et al.*, 2007b; Okuda *et al.*, 2008). Têm sido usadas no controlo e eliminação do PRRSV com taxas de sucesso variáveis (Dee *et al.*, 1998; Dee and Philips, 1998; Gillespie and Carroll, 2003; Cano *et al.*, 2007a; Thomas *et al.*, 2009;).

Em contrapartida, a replicação do vírus vacinal pode levar à sua excreção e infetar os animais sensíveis, podendo mesmo atravessar a placenta e infetar os fetos. Esta replicação, tanto nos fetos de porcas vacinadas ou nos animais sensíveis, não manifesta sinais clínicos típicos da doença. Mas este comportamento levanta preocupações uma vez que após algumas transmissões entre os animais, o vírus pode modificar-se, adquirindo virulência (Mengeling *et al.*, 1996; Piras *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2012). Existem relatos que referem a possibilidade das vacinas MLV se tornarem virulentas (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1999b; Nielsen *et al.*, 2001).

Pelo contrário, as vacinas mortas possuem a vantagem de ser mais seguras, não havendo qualquer replicação e posterior excreção viral. No entanto, as vacinas mortas conferem fraca proteção. Após a vacinação de animais seronegativos, nem sempre se observa uma resposta imunitária humoral pois nem todos os animais vacinados apresentam anticorpos medidos por ELISA e raramente se deteta anticorpos neutralizantes. Do mesmo modo, a resposta imunitária celular é fraca e praticamente indetetável (Piras *et al.*, 2005; Zuckermann *et al.*, 2007). As vacinas mortas podem ser utilizadas para preparar o sistema imunitário, tornando a resposta imunitária tanto humoral como celular mais rápidas após a infeção. Quando aplicada em animais seropositivos (da vacina viva ou do vírus de campo), a resposta imunitária

secundária é também bastante marcada, induzindo uma resposta anamnésica e a produção de anticorpos neutralizantes (Nilubol *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2012).

Tabela 5. Principais características dos tipos de vacinas

Tipo de Vacina	Indução da resposta imunitária na primeira vacinação		Indução da resposta imunitária secundária		Proteção adquirida na primeira vacinação	Segurança
	Imunidade Humoral	Imunidade Celular	Imunidade Humoral	Imunidade Celular		
Vacina Viva Modificada	<p>Induz a seroconversão, detetada por ELISA na maioria dos animais vacinados;</p> <p>Induz a produção de anticorpos neutralizantes.</p>	<p>Resposta muito inferior quando comparada com vacinas de outros vírus;</p> <p>Resposta das células produtoras de IFN-γ.</p>	<p>Resposta secundária detetável por ELISA, embora mais curta;</p> <p>Aumento do título de anticorpos neutralizantes na maioria dos animais.</p>	<p>Aumento da frequência de células produtoras de IFN-γ.</p>	<p>Diminuição da duração da viremia;</p> <p>Menor distribuição orgânica do vírus e taxa de infecção transplacentária;</p> <p>Proteção imunitária variável.</p>	<p>Replica-se no hospedeiro, atravessa a barreira placentária e é excretado pelos animais vacinados;</p> <p>Existe o risco de reversão de virulência.</p>
Vacina Morta	<p>Nem todos os animais desenvolvem anticorpos;</p> <p>Geralmente não há produção de anticorpos neutralizantes.</p>	<p>Resposta fraca ou indetetável das células produtoras de IFN-γ.</p>	<p>Aumento dos anticorpos detetados por ELISA na maioria dos animais;</p> <p>Aumento do nº de animais com anticorpos neutralizantes.</p>	<p>Aumento da frequência de células produtoras de IFN-γ.</p>	<p>Não existe diminuição da viremia, distribuição orgânica ou infecção transplacentária;</p> <p>- Pouca proteção imunitária.</p>	<p>Mais seguras pois não possuem capacidade de replicação;</p> <p>Sem risco de reversão de virulência.</p>

7.3.1.1. Planos vacinais

Não existe um plano vacinal único e que cada exploração deve aplicar o mais adequado de acordo com as características e com as condições epidemiológicas. Assim, podemos decidir quais as vacinas a usar numa exploração com um surto agudo e, numa exploração endêmica. Em explorações negativas não se recomenda a vacinação (Dee, 2004; Chareerntantanakul, 2012).

Numa exploração com um surto agudo, o principal objetivo é conferir imunidade aos animais para evitar consequências clínicas, sobretudo nas porcas gestantes no último terço de gestação. A melhor opção é a vacinação em massa do efetivo reprodutor, independentemente do momento de gestação. Esta prática é a mais segura comparativamente à exposição ao vírus de campo pois permite estabilizar a exploração e recuperar os níveis de produção num período mais curto que a exposição ao vírus de campo (Alexopoulos *et al.*, 2005; Pejsak *et al.*, 2006).

Em explorações de ciclo fechado, deve vacinar-se todo o efetivo, incluindo a descendência, dependendo da gravidade do surto e do nível de biossegurança da exploração. O objetivo é adquirir imunidade suficiente para limitar a circulação do vírus de campo em todos os animais. Adicionalmente deve-se encerrar a exploração, interrompendo a entrada de animais sensíveis (Linhares *et al.*, 2012, 2014; Rose *et al.*, 2015)

As situações endêmicas são muito distintas, existindo vários planos vacinais distintos. Na escolha do plano adequado, deve ter-se em conta o grau de estabilidade da exploração, as normas de biossegurança ou se se trata de uma exploração de ciclo fechado ou de produção múltipla segmentada (Rose *et al.*, 2015).

a) Vacinação dos animais de reposição

Os animais de reposição, isto é, as porcas nulíparas (marrãs) ou varrascos que entrem na exploração para o efetivo reprodutor, que não estejam imunes para o determinado PRRSV que se encontra na exploração estão em risco de infetarem após a sua entrada e conseqüentemente irão excretar o vírus (Dee and Philips, 1998; Dee, 2004). A infeção de marrãs gestantes, especialmente as que se encontram no último terço de gestação pode resultar na transmissão vertical do PRRSV para os leitões (Scotti *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2010).

A vacinação anteriormente à entrada da exploração reduz a probabilidade de infeção e conseqüente excreção do vírus (Benson *et al.*, 2000) devido à proteção cruzada induzida pela vacina para o PRRSV de campo. Os resultados da vacinação são variáveis dado que nem todos os PRRSV de campo são totalmente controlados pela imunidade induzida pelo vírus vacinal (Opriessnig *et al.*, 2005).

A imunização com o vírus de campo e vacinação posterior (Tabela 6) antes da entrada no efetivo reprodutor permite os animais adquirirem uma imunidade específica ao vírus de campo e uma proteção mais sólida graças à vacina. Este sistema deve limitar-se às explorações que permitam o isolamento total dos animais de reposição por um período suficiente para garantir que já não são portadoras quando entram na exploração. Caso contrário, deve utilizar-se a aplicação de duas doses de vacina (Tabela 6) (Charentantanakul, 2012; Díaz *et al.*, 2013).

b) Vacinação do efetivo reprodutor

Relativamente às reprodutoras, a implementação dos protocolos vacinais é opcional e dependente das características de cada exploração (Tabela 7).

Ao longo do tempo foram desenvolvidos vários programas de vacinação. O programa 6/60 consiste na vacinação ao 6º dia de lactação e 60º dia de gestação, seguida por vacinações em cada lactação. Este programa permite conseguir uma imunização adequada nas porcas sem ter que vacinar no último terço da gestação. No entanto, possui a desvantagem de não se vacinar todos os animais no mesmo momento, sendo que o nível imunitário da população não é homogêneo e existe a dificuldade do controlo da vacinação pois o intervalo entre doses depende da produtividade individual. Com o tempo, verificou-se que o risco de infeção transplacentária pelo vírus vacinal é baixo e não produzem alterações na produtividade caso sejam administradas no último terço de gestação. Com isto, o sistema 6/60 tem sido substituído pelo sistema atual de vacinação em massa a cada 3 a 4 meses. Este sistema permite um melhor controlo das vacinações e uma imunidade mais homogênea na população (Scotti *et al.*, 2006; Charentantanakul, 2012; Zimmerman *et al.*, 2012).

A vacinação em massa do efetivo reprodutor é frequentemente utilizada para ocorrer a exposição ao PRRSV. No entanto, como referido anteriormente, os resultados podem ser variáveis devido à diversidade entre estirpes (Opriessnig *et al.*, 2005).

c) Vacinação da descendência

A vacinação dos leitões pode ser implementada para melhorar os índices produtivos e diminuir a incidência da doença na fase de crescimento ou para controlar um surto pela diminuição da pressão de infeção a que o efetivo reprodutor está submetido (Cano *et al.*, 2007a, b; Kritas *et al.*, 2007).

Em casos endémicos, para reduzir a incidência da doença, a vacinação dos leitões é realizada aproximadamente às 3 ou 4 semanas de vida (Tabela 8). É necessário considerar que a vacinação às 3 ou 4 semanas de vida é mais eficaz no

melhoramento da produtividade pois permite o desenvolvimento da proteção imunitária antes da exposição viral (Cano *et al.*, 2007a, b; Kritas *et al.*, 2007) e antes da imunidade materna desaparecer (Albina *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 1997). A imunidade induzida pelas vacinas vivas modificadas tem um desenvolvimento lento, devendo ser esta programada antes do contato com o PRRSV de campo (Benfield *et al.*, 1999). A vacinação induz imunidade heteróloga em porcos em crescimento caso seja usada 5 semanas antes a exposição ao PRRSV de campo (Opriessnig *et al.*, 2005).

Durante os surtos, a vacinação deverá ser feita em todos os animais em crescimento (Tabela 8). Numa exploração instável, a vacinação dos leitões terá uma eficácia reduzida pois uma percentagem dos animais vacinados já se encontra infetada. No entanto, há uma redução na excreção viral, sendo uma mais-valia pois a vacinação do efetivo total em situações de emergência não tem como principal objetivo proteger os leitões mas sim reduzir a pressão de infeção sobre o efetivo reprodutor. A vacinação em massa da descendência é utilizada para ocorrer a exposição ao PRRSV (Cano *et al.*, 2007a, b; Kritas *et al.*, 2007).

A vacinação não descarta o risco de infeção. No entanto, diminui a duração da viremia e limita a distribuição orgânica, tornando o controlo da infeção mais fácil e rápido (Cano *et al.*, 2007a, b). Tem demonstrado eficácia em reduzir o impacto à exposição de estirpes PRRSV heterólogas em porcos, sendo um investimento benéfico (Mengeling *et al.*, 2003; Opriessnig *et al.*, 2005; Schuon *et al.*, 2008).

Tabela 6. Planos de vacinação dos animais de reposição

Animais de Reposição			
Planos	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Vacinação Dupla	Aplicação de duas doses durante o período de adaptação.	Mais seguro; Melhor opção em períodos de adaptação curtos; Melhor opção quando o isolamento após a exposição ao vírus de campo não é possível; Melhor opção quando não é possível o isolamento dos animais de reposição do efetivo reprodutor.	A proteção imunitária obtida pela vacinação pode não ser eficaz contra a estirpe de campo.
Exposição - Vacinação	Exposição ao vírus de campo e posteriormente vacinação.	Permite imunidade específica frente à estirpe que circula na exploração.	A exposição ao vírus de campo com posterior vacinação é menos segura.

Condicionantes:

- A imunização dos animais de reposição é necessário em qualquer programa de controlo da PRRS, sendo a vacinação o método mais utilizado;
- Em animais negativos, devem ser utilizadas vacinas vivas na primeira vacinação.

Tabela 7. Planos de vacinação do efetivo reprodutor

Efetivo Reprodutor			
Planos	Descrição	Vantagens	Desvantagens
6/60	Vacinação no segundo terço de gestação e posteriormente na primeira semana de lactação.	Mais seguro; Evitam a vacinação durante a fase de infeção transplacentária.	Não permitem o controlo das vacinações e conduzem a imunidade pouco homogénea da exploração; Não permitem intensificar os programas de vacinação.
Vacinação em massa	Vacinação entre 3 a 4 meses, independentemente do momento de gestação.	As vacinações em massa permitem o controlo mais eficaz; Conduzem a uma imunidade homogénea na exploração; Permitem a adaptação da frequência de vacinação.	Existe o risco de infeção transplacentária, embora baixo.

Condicionantes

- Em explorações instáveis, com pouca biossegurança, ciclos fechados e adaptação dos animais de reposição insuficiente, é importante a implementação de protocolos vacinais;
- Em explorações estáveis, com biossegurança e com boa adaptação dos animais de reposição, pode não ser necessária a vacinação do efetivo.

Tabela 8. Planos de vacinação dos animais em crescimento

Animais em crescimento			
Planos	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Vacinação às 3 ou 4 semanas	Vacinação às 3 ou 4 semanas de forma a conferir proteção contra os efeitos negativos da infeção durante a fase de crescimento.	Diminui a duração da viremia; Limita a distribuição orgânica do vírus; Aumenta a produtividade.	Não evita a infeção; Método dispendioso.
Vacinação em massa	Vacinação de todo o efetivo com o objetivo de controlar de forma rápida o surto.	Diminuição da excreção do vírus; Auxilia o controlo do surto.	Não evita a infeção; Método dispendioso.

Condicionantes

- A vacinação de leitões deve realizar-se com vacinas vivas modificadas, dado serem animais negativos que se imunizam pela primeira vez;
- Para melhorar a produtividade e reduzir os efeitos negativos, devem ser vacinados às 3-4 semanas de vida de forma a assegurar o desenvolvimento da resposta imunitária antes da exposição ao PRRSV;
- A decisão da vacinação dos leitões deve basear-se numa relação custo-benefício.

7.3.2. Exposição ao PRRSV de campo

A exposição ao vírus vivo de campo não é uma técnica recente e é usada no controlo de diversas doenças virais como por exemplo em doenças gastrointestinais transmissíveis (Moxley *et al.*, 1993). A Diarreia Epidémica dos Suínos (PED) é um dos exemplos. A exposição viral baseia-se no princípio da imunidade homóloga é mais eficaz que a imunidade heteróloga (Lager *et al.*, 1999).

A exposição ao PRRSV de campo assegura a exposição de todos os animais para uma determinada estirpe com o objetivo de produzir uma exploração seropositiva uniforme e prevenir o aparecimento de subpopulações sensíveis (FitzSimmons, 2005; Ruen *et al.*, 2007). É importante que o vírus usado seja retirado da própria exploração de modo a minimizar as possibilidades de entrada de novas estirpes.

A exposição pode ser realizada através da injeção de soro, tecidos contaminados ou através do contato entre animais contaminados e sensíveis. O soro é colhido de animais infetados que tenham o vírus em circulação (Hill *et al.*, 2004), sendo os leitões infetados os que possuem maior concentração viral (Ruen, 2003). A injeção do soro é o método mais eficaz pois assegura 100% da exposição dos animais caso o procedimento seja realizado corretamente (FitzSimmons, 2005). A dose necessária para ocorrer seroconversão eficaz é entre 7 a 247 partículas virais vivas (Pugh *et al.*, 2005). Os tecidos contaminados são colhidos de suínos infetados sendo dados aos animais que necessitam de desenvolver imunidade (Dufresne, 2003). A exposição realizada através do contato consiste em identificar os animais infetados e favorecer o contato nasal entre animais infetados e sensíveis. Porcas que tenham abortado ou animais jovens são as escolhas durante os surtos (Desrosiers and Boutin, 2002; Batista and Dee, 2002; Ruen, 2003). No entanto, a exposição através de tecidos contaminados ou contatos não são métodos eficazes pois não existe precisão em quantificar a carga viral transmitida (Hill *et al.*, 2004).

Existem riscos associados ao uso da exposição do PRRSV de campo, nomeadamente a infeção dos indivíduos expostos será tão severa como a infeção natural. Pode resultar na manifestação de sinais clínicos, morte ou redução da produtividade reprodutora (FitzSimmons, 2005; Bruner, 2007). Existe também o risco de infeção por outros agentes patogénicos ao realizar a exposição ao PRRSV (Corzo *et al.*, 2010). Para reduzir os prejuízos, a exposição deve ser utilizada através de um planeamento. Adicionalmente, podem ser utilizados antipiréticos (ácido acetilsalicílico) e antibióticos como a tilmicosina para oferecer algum bem-estar aos animais, assim como reduzir as perdas (Fano *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2009).

7.3.3. Estratégias de imunização

As estratégias da imunização ao PRRSV de campo nas diferentes fases de produção incluem:

- i. Adaptação do efetivo de reposição;
- ii. Exposição ao efetivo reprodutor;
- iii. Exposição aos animais em crescimento.

7.3.3.1. Adaptação do efetivo de reposição

Na adaptação (*Acclimation*) do efetivo de reposição, é importante assegurar que a entrada de novos animais não representa um risco de introdução de novas estirpes de PRRSV ou reintrodução do vírus para o sucesso do programa de controlo ou erradicação da PRRS. As explorações origem dos animais devem fornecer informações relativamente ao estado de sanidade, assim como os protocolos de controlo de doenças. O transporte destes animais deve assegurar a biossegurança dos mesmos. O mesmo se aplica para explorações de origem do sémen ou de varrascos.

a. Exposição

O processo de adaptação é composto por 3 fases: pré-exposição, exposição e período de recuperação pós-exposição (Dee, 2004).

Período de pré-exposição

Este período consiste em explorar o estado dos animais de reposição, verificando a ocorrência de infeções recentes que ocorram na exploração de origem ou durante o transporte através de serologias ou PCR. Quando realizada as serologias, devem ser realizadas 24h a 48h após a chegada, verificando se os animais se infetaram na exploração de origem. No entanto, pode realizar-se novamente serologias aos 14 dias após a chegada a fim de verificar se não ocorreu nenhuma infeção durante o transporte. Os testes de PCR detetam viremias 24h após a infeção. Estes podem complementar as serologias, identificando o vírus em infeções recentes (Pitkin *et al.*, 2009b).

Período exposição

O período de exposição varia de acordo com a técnica usada. Exposição através da injeção do soro com o vírus é realizada em apenas 1 dia. Usando as vacinas MLV em duas doses separadas por 1 mês, demora o mesmo tempo. A exposição através do contato com

porcos infectados ou tecidos requer mais de 60 dias (Gillespie and Carroll, 2003; Dee, 2004; FitzSimmons, 2005).

Período de recuperação pós-exposição

O objetivo deste período é assegurar que as porcas nulíparas ou varrascos não entrem no efetivo reprodutor a excretar o vírus. Este período deve demorar pelo menos 90 dias pós-exposição (Batista and Dee, 2002). Quanto mais longo for este período, menor o risco de excreção do vírus e infecção do efetivo reprodutor (FitzSimmons, 2005). A realização de testes PCR antes da entrada no efetivo reprodutor é frequentemente utilizada. Os testes positivos são fortes indicadores de que os animais se encontram a excretar o vírus, enquanto testes negativos não permitem garantir que um animal não é infeccioso.

b. Local da adaptação

A adaptação das porcas nulíparas ou varrascos de reposição pode ser realizada na própria exploração – Adaptação Interna (*On-site Acclimation*) ou externamente – Adaptação Externa (*Off-site Acclimation*).

Adaptação interna com os animais em crescimento

Neste caso, as porcas nulíparas e varrascos de reposição são introduzidos em salas de desmame ou engordas (Batista and Pijoan, 2000). Este método de adaptação só deve ser utilizado em explorações que possuam o PRRSV em circulação nos animais em crescimento, baseando-se no contato com animais infectados, não sendo este método muito fiável como referido anteriormente (Hill *et al.*, 2004). Caso a adaptação falhe, existe o risco de surgir surtos de PRRS no efetivo reprodutor. Por outro lado, caso a estirpe de PRRSV que circule nos animais em crescimento seja diferente do efetivo reprodutor, existe o risco de introduzir uma nova estirpe (FitzSimmons, 2005). Este método é apenas aconselhado em programas de adaptação a curto prazo com o objetivo de eliminar o PRRSV dos animais em crescimento.

Adaptação interna em quarentenas em explorações encerradas

Em explorações positivas encerradas (ver em Programas de Erradicação), os animais de reposição devem ser submetidos à adaptação com a estirpe presente no efetivo reprodutor em quarentenas. A utilização de quarentenas possui a vantagem de comprometer o efetivo reprodutor à excreção do vírus durante a adaptação. As quarentenas não devem estar próximas ou diretamente ligadas ao edifício principal pois existe o risco de

transmissão da doença por aerossóis ao efetivo reprodutor, devendo existir também regras de biossegurança (Torremorell *et al.*, 2000). Os trabalhadores devem mudar a roupa e as botas, seguido da lavagem das mãos entre cada movimento entre a exploração e a quarentena. Adicionalmente, deve ser utilizado o método “*All In - All Out*” na quarentena com lavagem e desinfecção entre lotes para minimizar o risco de mutação viral (Dee, 2004).

Adaptação externa

Este tipo de adaptação favorece maior proteção para o efetivo reprodutor pois o risco de transmissão por aerossóis da quarentena é reduzido e a circulação dos trabalhadores tem melhor controle. As instalações de adaptação externa devem possuir medidas de biossegurança extremamente exigentes (FitzSimmons, 2005). Caso estas estejam demasiado próximas de outras explorações, existe o risco dos animais de reposição se infetarem com estirpes PRRSV diferentes através de moscas, mosquitos, aerossóis, entre outros (Zimmerman, 2007). Podem ser instalados filtros de ar para reduzir esse risco (Reicks, 2010). Outro problema deste método é o risco de infeção durante transporte dos animais de reposição para a exploração.

c. Monitorização da estirpe

Em explorações positivas com o PRRSV em circulação, a monitorização regular da estirpe é muito utilizada. O objetivo deste método é procurar manter a imunidade do efetivo reprodutor “atualizado” com as mutações do PRRSV. A monitorização da estirpe da exploração requer o isolamento frequente do PRRSV da exploração com a comparação entre estirpes e atualização do programa de adaptação (Torrison *et al.*, 2003).

7.3.3.2. Exposição ao efetivo reprodutor

A exposição do PRRSV de campo a todas as porcas do efetivo reprodutor e varrascos é utilizado para expor todo o efetivo simultaneamente, permitido assim a imunidade simultânea do efetivo (Corzo *et al.*, 2010), um fator importante para a erradicação do PRRSV. A exploração é então encerrada pelo menos 180 dias (Schaefer and Morrison, 2007) ou 200 dias (Yeske, 2009).

A exposição do vírus de campo a porcas gestantes pode levar à morte, problemas reprodutivos ou infeção dos fetos em gestações mais tardias (Bruner, 2007). A infeção no útero aumenta o risco de problemas nos leitões nas maternidades, salas de recria ou mesmo nas engordas (Bruner, 2007).

7.3.3.3. Exposição aos animais em crescimento

A exposição do PRRSV de campo aos animais em crescimento (desde os leitões desmamados aos animais em acabamento) é usada para assegurar a exposição simultânea, permitindo assim a imunidade simultânea (Pittman, 2007). O objetivo deste método é adquirir imunidade uniforme e assim reduzir a excreção do vírus anteriormente à introdução de animais de reposição. A exposição a estirpes PRRSV virulentas não é aconselhada devido à sintomatologia respiratória que causa (Dufresne, 2003).

7.4. Erradicação

A erradicação do PRRSV de uma população é necessária para melhorar a saúde dos porcos e a produtividade. A erradicação espontânea de PRRSV a partir de uma exploração está descrita (Freese and Joo 1994), mas torna-se progressivamente impossível nos atuais sistemas de produção. A erradicação bem-sucedida de PRRSV de explorações infetadas pode ser alcançada através de vários métodos como o despovoamento total com repovoamento negativo ou despovoamento parcial, “Análise e Remoção” e “Desmame e Remoção”, e encerramento da exploração ou preenchimento-encerramento-homogeneização (Dee and Molitor 1998; Torremorell *et al.*, 2003). Um plano de erradicação bem-sucedido requer a implementação de medidas de biossegurança para a prevenção de reinfeções na exploração (Torremorell *et al.*, 2004).

7.4.1. Despovoamento

7.4.1.1. Despovoamento total e repovoamento

Este método consiste em remover todo o efetivo reprodutor e/ou os animais em crescimento da exploração, desinfecção das instalações e repovoamento com animais negativos (Corzo *et al.*, 2010). É frequentemente usado em explorações com várias doenças presentes e não existe outro método com melhor relação custo-benefício com probabilidade de sucesso. É também aconselhado em explorações com múltiplas estirpes de PRRSV com sinais de outras doenças (Roberts, 2002; Corzo *et al.*, 2010). No entanto, este método não deve ser aplicado até ser encontrada a origem do PRRSV e serem reconhecidos os fatores que contribuíram para o surto. O objetivo é prevenir o reaparecimento da PRRS após o repovoamento (DeBuse, 2007).

A eficácia deste método é elevada e permite resolver múltiplas doenças simultaneamente. Adicionalmente, a repovoação permite a entrada de animais com melhorias genéticas. Como desvantagens, este método é dispendioso e requer que os

animais de repovoamento sejam provenientes de explorações negativas. Outra desvantagem é o risco de reinfecção durante ou após o repovoamento (Corzo *et al.*, 2010).

7.4.1.2. Despovoamento parcial

O despovoamento parcial é indicado para a erradicação do vírus em porcos de engorda quando a excreção do vírus já não ocorre no efetivo reprodutor (Dee and Joo, 1997). Este tipo de despovoamento torna-se vantajoso pois possui menores custos comparativamente ao despovoamento total.

a. Despovoamento dos animais em crescimento e repovoamento

Este método é utilizado quando existe produção de animais em crescimento negativos nas explorações com programas de erradicação da PRRS implementados. As salas de recria/desmames e salas de engorda são despovoadas e, após a limpeza profunda e desinfecção, são novamente repovoadas com suínos negativos ao PRRSV (Dee and Joo, 1997; Dufresne, 2003; Torremorell *et al.*, 2003). Este método tem elevada eficácia e permite aumentar a produtividade. Como desvantagens, os animais provenientes do despovoamento terão de terminar o seu crescimento fora da exploração, terão de permanecer mais tempo nas salas de recria no caso do despovoamento nas engordas ou terão que antecipar o deslocamento para as engordas no caso do despovoamento das salas de recria.

b. Despovoamento parcial dos animais em crescimento e Repovoamento

Em explorações com produções utilizando o método “*All In - All Out*” por secção, a erradicação do PRRSV pode ser conseguida através da despovoamento parcial. Consiste na separação dos animais negativos e positivos em diferentes secções. As secções que irão albergar os animais negativos devem ser limpas e desinfetadas (Andreasen, 2000, Dufresne, 2003; Torremorell *et al.*, 2003). A erradicação do PRRSV depende da implementação de regras de biossegurança e da estirpe de PRRSV presente. No entanto, existe o risco de transmissão do PRRSV através dos aerossóis. Este método é mais conveniente que a despovoamento total mas, no entanto, possui riscos elevados de reinfecções.

7.4.2. Análise e remoção

Este método baseia-se em serologias/testes PCR no efetivo reprodutor e posteriormente abate dos animais seropositivos/infetados (Corzo *et al.*, 2010). O efetivo reprodutor total é testado simultaneamente usando testes ELISA e PCR e as porcas

positivas a qualquer teste são abatidas (Dee *et al.*, 2001a; Roberts, 2002). Caso tenha decorrido a detecção de infecção em animais pós-desmame, as salas de recria e/ou engorda devem ser despovoadas 24 a 48h antes do método Análise e Remoção (Dee *et al.*, 2001a). Após a conclusão deste método, o efetivo reprodutor e os animais em crescimento ficam sobre monitorização mensal por ELISA durante 12 meses consecutivos. Este método é apenas viável em explorações com seroprevalências baixas no efetivo reprodutor, inferior a 25% (Zimmerman *et al.*, 2012).

Este método pode ter até 100% de eficácia e possui menor risco que o método de segregação ao desmame. Porém, é um método dispendioso devido à quantidade de análises necessárias e devido às perdas dos animais abatidos.

7.4.3. Desmame e remoção

Este método é semelhante ao método Análise e Remoção mas especificamente focado em porcas após o desmame. Consiste em testar os animais antes da entrada nas maternidades com ELISA e PCR (Sandri, 2001). As porcas positivas ao PCR são removidas imediatamente, mesmo antes do parto. As porcas seropositivas são removidas apenas após o desmame e substituídas por porcas negativas. Este programa deve durar no mínimo 20 semanas (Roberts, 2002) e todas as porcas devem ser testadas.

Comparativamente ao método Análise e Remoção, este método é mais prático em explorações maiores e menos dispendioso dado que as porcas gestantes seropositivas não são abatidas. No entanto, é um processo mais lento e possui o risco das porcas já diagnosticadas seronegativas se infetarem por outra virémica ainda não diagnosticada. Por outro lado, as porcas seropositivas e negativas ao PCR podem excretar o vírus até 90 dias pós-infecção, sendo a origem do PRRSV.

7.4.4. Encerramento da exploração

O encerramento da exploração ou preenchimento-encerramento-homogeneização (*Herd Closure ou Load-Close-Homogenize*) é o método mais utilizado dentro dos programas de erradicação do PRRSV (Corzo *et al.*, 2010). Este método baseia-se na interrupção da entrada de animais de reposição por um período mínimo de 6 meses acompanhada da eliminação dos animais seropositivos durante esse período. O encerramento da exploração envolve os seguintes passos:

7.4.4.1. Preenchimento-Encerramento-Homogeneização

O preenchimento da exploração consiste na introdução de animais para reposição antes do encerramento da exploração. Alternativamente, os animais de reposição negativos podem ser colocados em instalações externas (como na adaptação externa) em casos de falta de espaço na própria exploração (Torremorell *et al.*, 2003).

Após a entrada dos animais, a exploração suspende a entrada de animais de reposição até que a exploração possa ser definida com estável. Deste modo, evita-se a introdução de novos animais sensíveis ao PRRSV. Este passo chama-se de encerramento.

A homogeneização consiste na vacinação dos animais, frequentemente usada nos programas de encerramento, ou exposição ao PRRSV existente na exploração (DeBuse, 2007). Esta confere simultaneamente aos animais uma resposta imunitária eficaz e elimina eventuais subpopulações sensíveis. Apesar da existência temporária de animais persistentemente infetados, ao eliminar subpopulações sensíveis permite a redução ou mesmo eliminação da circulação do vírus dentro da exploração (Corzo *et al.*, 2010).

7.4.4.2. Reintrodução dos animais de reposição seronegativos

Antes da introdução de porcas nulíparas de reposição seronegativas, deve colocar-se isoladamente animais sentinela misturados com porcas seropositivas com o objetivo de determinar se o vírus ainda está a ser excretado. Caso não esteja, os novos animais de reposição entram na exploração separados dos animais existentes (Torremorell *et al.*, 2003).

7.4.4.3. Abate das porcas seropositivas

Após a entrada das nulíparas seronegativas, as porcas existentes anteriormente seropositivas ao PRRSV são removidas. Um programa mais acelerado de abate pode ser implementado com o objetivo de atingir o estado serológico negativo da exploração mais rapidamente (Dufresne, 2003).

7.4.4.4. Erradicação do PRRSV nos animais em crescimento

A erradicação do PRRSV em animais em crescimento deve iniciar-se apenas quando há garantias que o ciclo de produção terá condições de permanecer negativo. Este passo requer o despovoamento das salas de recria e posteriormente lavagem e desinfecção. Após estes passos, procede-se o repovoamento com porcos negativos ao PRRSV (Dufresne, 2003; Torremorell *et al.*, 2003).

7.4.4.5. Monitorização pós-erradicação

A monitorização é necessária durante todo o processo: nos animais sentinela, nos animais de reposição e nos animais em crescimento. A monitorização do ciclo de produção deve realizar-se mensalmente para detetar se ainda existem infeções (Torremorell *et al.*, 2003).

O encerramento da exploração tem uma taxa de sucesso entre 91 a 100% e é menos complicada e dispendiosa que os métodos “Análise e Remoção” ou “Desmame e Remoção”. Como desvantagens, este método necessita de períodos prolongados até estar concluído e levanta a necessidade de instalações externas (Dee *et al.*, 2001a; Torremorell *et al.*, 2003; Dubois, 2007).

8. CONCLUSÃO

Apesar de ter surgido no início dos anos 90 do século XX, a PRRS continua a ser uma doença atual, com graves consequências para a indústria suinícola de todo o mundo. De acordo com Holtkamp *et al.*, (2012), a PRRS é responsável pela perda anual de 664 milhões de dólares nas explorações suinícolas dos Estados Unidos da América.

O PRRSV é um vírus extremamente dinâmico tanto a nível genético, com a sua elevada variabilidade genética entre os genótipos e entre as mesmas estirpes, quer a nível imunitário, através dos variados mecanismos de evasão e desregulação imunitária, como a nível de manifestação clínica, dependendo aqui da estirpe, do indivíduo e condições ambientais.

A vacinação com o vírus vivo atenuado é um método largamente utilizado. Possui eficácia na redução dos sinais clínicos após o surto mas a sua eficácia na proteção imunitária contra estirpes heterólogas é reduzida quando comparada com a proteção homóloga. Adicionalmente, existem riscos associados ao uso deste tipo de vacina.

Por estas razões, é necessário continuar a investigação de novas formas de combate ao PRRSV, como novas vacinas ou novas técnicas de controlo do vírus. É também necessária a investigação mais aprofundada dos mecanismos de evasão imunitária de forma a permitir um melhor controlo da doença durante surtos agudos ou em zonas endémicas.

No entanto, o método de encerramento da exploração durante pelo menos 200 dias é um método eficaz na eliminação do PRRSV da exploração. A implementação de protocolos de biossegurança rigorosos incluindo, por exemplo, a filtração do ar, permite prevenir a (re)entrada do vírus. Estas duas práticas permitem os produtores de suínos evitarem e/ou erradicarem o PRRSV.

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a descendência do efetivo reprodutor de uma exploração infetada por PRRS;
- Interpretação dos dados obtidos através dos testes ELISA e RT-PCR;
- Definir quais as idades dos animais ideais para amostra que serão utilizados como sentinelas;
- Definir um possível plano de controlo da doença e erradicação do PRRSV na exploração do presente estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais e características gerais da exploração:

O presente estudo foi realizado numa exploração suinícola com o esquema de produção “Ciclo Fechado”, localizada na região Centro de Portugal, na latitude 39.649478 e longitude -8.307067.

A sua estrutura é constituída por 3 edifícios principais: 2 edifícios com engordas e 1 edifício com as salas de gestação, salas de maternidades e salas de recria ou desmame. Na data da recolha das amostras estava presentes aproximadamente 480 reprodutoras, 1500 leitões desmamados e 2000 porcos em crescimento nas engordas. Os animais de reposição do efetivo reprodutor têm origem externa. Os porcos são produzidos através do cruzamento de fêmeas Large white X Landrace com machos finalizadores Pietrain.

Relativamente ao manejo da exploração, semanalmente são inseminadas artificialmente aproximadamente 25 porcas. Os leitões são desmamados às 4 semanas de vida, semanalmente, sendo transferidos para as salas de recria. Às 10-12 semanas de idade, os leitões são transferidos para as salas de engorda.

A vacina PRRSV usada no plano profilático é Porcilis® PRRS (Intervet International BV, Boxmeer, Holanda), uma vacina com uma estirpe PRRSV Tipo 1 (Europeia) viva atenuada, administrada a cada 6 meses às porcas. O plano profilático inclui também a vacinação para a doença do Aujeszky e Circovirus. A descendência é apenas vacinada contra o Circovirus. Este plano profilático é usado há pelo menos 3 anos.

A PRRS foi anteriormente diagnosticada na exploração por ELISA e PCR nos últimos 3 anos. Os sinais clínicos reprodutivos e respiratórios estavam também presentes. Nesse mesmo período, foram monitorizados os anticorpos contra Circovirus (PCV K2 – IgM e IgG), *Actionobacillus pleuropneumoniae* (APP ApXII/TBp 2), *Influenza* e doença do Aujeszky (ADV gB e ADV gE) de animais sentinelas de cada fase do ciclo de produção: os mesmos 4-6 animais foram analisados mensalmente desde a maternidade até às 24 semanas de idade.

2. Colheita de amostras

No mês de Novembro de 2014, foram colhidas amostras de sangue de 66 porcos de descendência de diferentes idades e zonas de produção. Foram formados grupos de 6 animais selecionados aleatoriamente com 0 (recém-nascidos), 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e

24 semanas de idade. As amostras de sangue foram colhidas através da punção da veia cava ou veia jugular. Após a colheita, as amostras foram refrigeradas a 4°C e enviadas para o laboratório. O soro foi removido da amostra através da centrifugação e armazenado a -20°C até serem analisados.

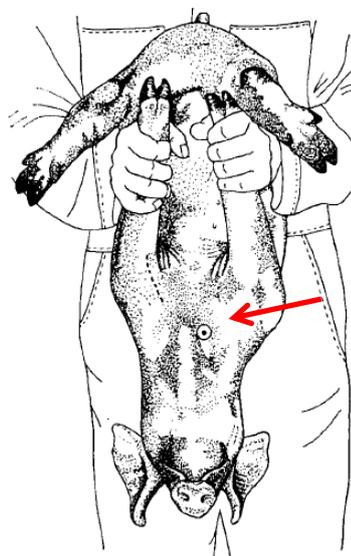


Figura 9. Colheita de sangue da veia cava superior (adaptado de Zimmerman *et al.*, 2012).

Legenda: Método de restrição de suínos com menos de 20 kg para colheita de sangue da veia cava superior. O local de punção encontra-se marcado com um círculo, indicado pela seta vermelha.

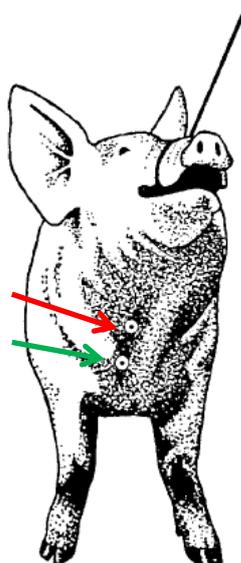


Figura 10. Colheita de sangue da veia cava superior (adaptado de Zimmerman *et al.*, 2012).

Legenda: Método de restrição de suínos em pé. A seta vermelha indica o local de punção da veia jugular e a seta verde indica o local de punção da veia cava superior.

3. Teste ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) dos anticorpos específicos contra o PRRSV

As amostras foram analisadas individualmente, de acordo com as instruções do fabricante, através de testes *kit* ELISA comerciais IDEXX PRRS X3 (IDEXX Laboratory Inc., Liebefeld-Bern, Suíça), o qual deteta ambas as estirpes Tipo I (Europeia) e Tipo II (Norte Americana).

O *cut off* para as amostras serem positivas (valores S/P), ou seja, o nível limite para as amostras serem positivas, foi de 0,4.

4. Quantificação do PRRSV através do RT-PCR e análise do *amplicon*

Por razões económicas, foi utilizada uma estratégia de *pooling* na análise RT-PCR. O soro de 3 amostras de porcos com a mesma idade foi misturado anteriormente (total de 22 *pools*) e posteriormente submetido para análise.

O ARN viral foi isolado usando o kit BioSprint® 96 One-For-All (Qiagen S.A., Hilden, Alemanha).

A amplificação do ARN viral foi realizado através do kit QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR (Qiagen S.A., Hilden, Alemanha). O PCR foi realizado no termociclador Rotor Gene Q (Qiagen S.A., Hilden, Alemanha).

Todos os passos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

5. Análise do fragmento

O ARN obtido do isolamento da amostra foi submetido a uma análise de comparação com outras estirpes de referência. Esta genotipagem foi obtida através da sequenciação do fragmento *ORF7*, o qual codifica a proteína N, utilizando o método Sanger.

As sequências foram analisadas através BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), comparando com as estirpes de referência europeias, americanas e chinesas para permitir descobrir entre as quais é a mais similar.

6. Análise Estatística

Para interpretação dos valores obtidos, estes foram submetidos a uma análise estatística.

A razão de probabilidades (odds ratio) de acordo com as fases de produção foi calculada através da regressão logística univariada. O teste Wald foi considerado.

Foi utilizada a regressão polinomial de grau 4 entre os valores S/P e idade dos animais na análise da previsão do modelo.

Foi utilizado o programa estatístico JMP (versão 7) (SAS Institute Inc, 2007).

RESULTADOS

Neste estudo foram utilizados 66 animais descendentes do efetivo reprodutor nas diferentes fases do ciclo de produção.

A proporção dos animais seropositivos nas fases de maternidade (com idades de 0, 1, 2 e 3 semanas), de desmame (com idades de 6, 9 e 12 semanas) e engorda (com idades de 15, 18, 21 e 24 semanas) foi de 75,0% (18/24), 33,3% (6/18) e 95,8% (23/24), respectivamente (Tabela 9).

Foi 46 vezes mais provável encontrar porcos seropositivos nas fases de engorda que na fase de desmame (95% de intervalo de confiança com razão de probabilidade entre 5.0 a 427.4; $P < 0.01$).

Foi determinada uma correlação $r = 0,78$ ($P < 0,01$) entre os valores S/P e a idade dos porcos, considerando todos os animais positivos e negativos nas serologias do PRRSV (figura 11). Esta correlação permaneceu significativa ($r = 0,69$; $P < 0,01$) mesmo quando são apenas considerados os animais positivos para os valores S/P (figura 12).

Relativamente aos resultados RT-PCR (através de uma estratégia utilizando *poolings*), os animais que apresentavam resultados positivos foram os animais com 6 e 9 semanas de idade e animais com 15 semanas de idade, correspondendo às fases de desmame e engorda, respectivamente.

Da amostra positiva (*pool*) correspondente aos porcos com 6 semanas de idade, realizou-se a tipificação, concluindo-se que o vírus de campo é mais próximo geneticamente da estirpe europeia Lelystad AY588319.1 [M96262.2 (gi 51094507)] (Tabela 10).

A sequência nucleotídica do fragmento (Imagem 13) foi:

```
CCAGTTGCTGGGTGCAATGATAAAGTCCCAGCGCCAGCAACCTAGGGGAGGACA  
GGCAAAAAAAGAAAGCCTGAGAAGCCACATTTTCCCCTAGCTGCTGAAGATGAC  
ATTCGGCACCCACCTCACCCAGACCGAACGTTCCCTCTGCTTGCAATCGATCCAGA  
CGGCTTTTAACCAAGGCGCAGGAACTGCGTCGCTTTCATCCAGCGGGAAGGTCA  
GTTTTCAGGTTGAGTTCATGCTGCCGGTTGCT.
```

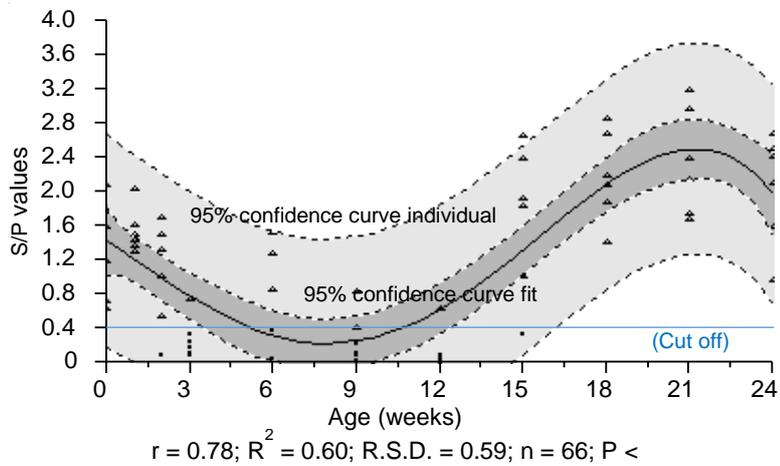


Figura 11. Previsão de valores S/P de acordo as idades dos porcos, considerando todos os animais positivos e negativos para anticorpos contra o PRRSV.

Legenda: R.S.D.: Residual standard deviation.

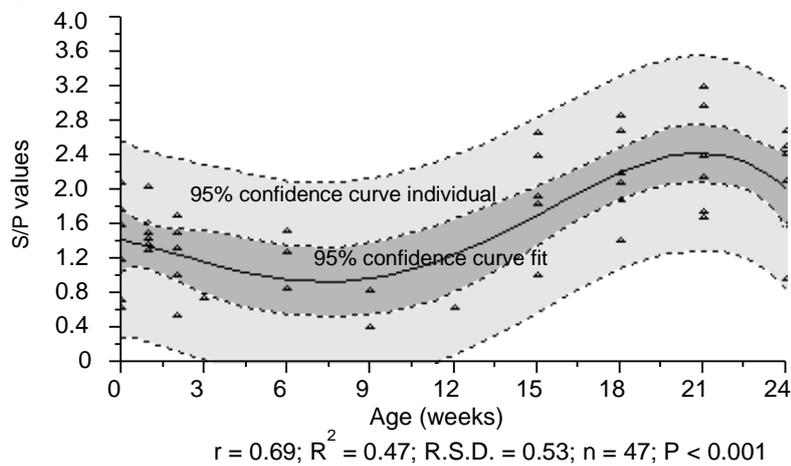


Figura 12. Previsão dos valores S/P de acordo com as idades dos porcos, considerando apenas os animais positivos para anticorpos contra o PRRSV.

Legenda: R.S.D.: Residual standard deviation.

Tabela 9. Resultado dos testes ELISA e PCR:

Nº Tubo	Idade	PRRS ELISA		PCR PRRS
		S/P	Pos/Neg	Pool
1	0	0,707	Positivo	Negativo
2	0	1,761	Positivo	
3	0	1,186	Positivo	
4	0	0,633	Positivo	Negativo
5	0	2,066	Positivo	
6	0	1,586	Positivo	
7	1	1,431	Positivo	Negativo
8	1	1,28	Positivo	
9	1	2,031	Positivo	
10	1	1,598	Positivo	Negativo
11	1	1,493	Positivo	
12	1	1,361	Positivo	
13	2	1,683	Positivo	Negativo
14	2	1,315	Positivo	
15	2	0,532	Positivo	
16	2	1,497	Positivo	Negativo
17	2	0,998	Positivo	
18	2	0,078	Negativo	
19	3	0,724	Positivo	Negativo
20	3	0,328	Negativo	
21	3	0,167	Negativo	
22	3	0,122	Negativo	Negativo
23	3	0,08	Negativo	
24	3	0,25	Negativo	

Nº Tubo	Idade	PRRS ELISA		PCR PRRS
		S/P	Pos/Neg	Pool
25	6	0,849	Positivo	Negativo
26	6	1,511	Positivo	
27	6	0,375	Negativo	
28	6	0,379	Negativo	Positivo
29	6	0,039	Negativo	
30	6	1,256	Positivo	
31	9	0,085	Negativo	Positivo
32	9	0,109	Negativo	
33	9	0,217	Negativo	
34	9	0,404	Positivo	Negativo
35	9	0,019	Negativo	
36	9	0,812	Positivo	
37	12	0,631	Positivo	Negativo
38	12	0,014	Negativo	
39	12	0,008	Negativo	
40	12	0,052	Negativo	Negativo
41	12	0,023	Negativo	
42	12	0,099	Negativo	
43	15	1,833	Positivo	Negativo
44	15	2,654	Positivo	
45	15	0,998	Positivo	
46	15	2,369	Positivo	Positivo
47	15	0,334	Negativo	
48	15	1,918	Positivo	

Nº Tubo	Idade	PRRS ELISA		PCR PRRS
		S/P	Pos/Neg	Pool
49	18	2,662	Positivo	Negativo
50	18	2,835	Positivo	
51	18	2,074	Positivo	
52	18	1,408	Positivo	Negativo
53	18	1,86	Positivo	
54	18	2,177	Positivo	
55	21	2,126	Positivo	Negativo
56	21	1,73	Positivo	
57	21	2,386	Positivo	
58	21	1,67	Positivo	Negativo
59	21	2,963	Positivo	
60	21	3,171	Positivo	
61	24	0,946	Positivo	Negativo
62	24	2,487	Positivo	
63	24	2,394	Positivo	
64	24	2,672	Positivo	Negativo
65	24	1,588	Positivo	
66	24	2,099	Positivo	

Tabela 10. Homologia entre a amostra em estudo e as estirpes de referência Europeia Lelystad AY588319.1 (M96262.2), a Norte-americana U87392.3 (VR-2332) e Chinesa AY150312.1.

Accession	Description	Total score	Querycoverage	E value	Ident
AY588319.1	PRRSV LV4.2.1, complete genome	407	100%	8,00E-117	96%
U87392.3	PRRSV strain ATCC VR-2332, complete genome	62,6	52%	5,00E-13	70%
AY150312.1	PRRSV HB-1 (sh)/2002, complete genome	80,6	52%	2,00E-18	73%

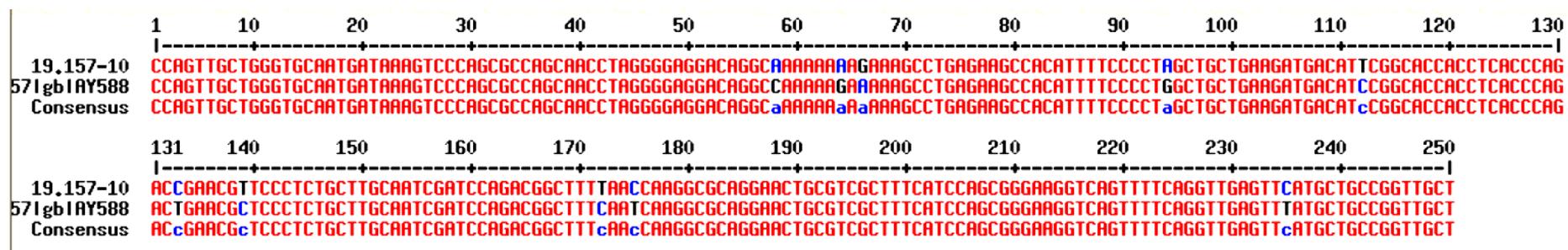


Figura 13. Alinhamento da amostra (19.157-10) em estudo com a estirpe Europeia M96262.2(gi 51094507)

DISCUSSÃO

Com o presente estudo, pretendeu-se realizar uma avaliação e interpretação dos perfis serológicos de PRRS da descendência do efetivo reprodutor de uma exploração suinícola infetada pela PRRS, assim como dos dados obtidos pela análise RT-PCR.

De acordo com Albina *et al.*, (1994), os anticorpos maternos contra o PRRSV provenientes do colostro estão presentes no soro sanguíneo até à idade de 3 semanas de vida, anteriormente ao desmame. No entanto, Chung *et al.*, (1997) mostrou que os anticorpos maternos permanecem relativamente elevados até as 4 semanas de vida, atingindo os valores mais baixos às 6 semanas de vida. No presente estudo, os valores S/P estimados mantêm-se elevados inicialmente e começam a decrescer até atingem o nível limite (0,4) para amostras positivas durante a 5ª semana, indicando o desaparecimento dos anticorpos maternos.

Com o decrescimento dos anticorpos maternos, os leitões desmamados tornam-se sensíveis e podem infetar-se com o PRRSV (Goyal, 1993). Este facto é evidenciado no presente estudo pela deteção do PRRSV no soro dos leitões desmamados com 6 semanas de vida.

Os porcos infetados pelo PRRSV produzem uma resposta inflamatória, a qual é facilmente detetada pela presença de anticorpos específicos do tipo IgM ou IgG aproximadamente aos 7 e 14 dias pós-infeção, respetivamente (Vezina et al. 1996). Nas observações de Brown *et al.*, (2009), os porcos infetados experimentalmente com PRRSV encontravam-se em 0%, 76,6% e 100% seropositivos aos 7, 14 e 21 dias pós-infeção, com os testes ELISA Idexx. O valor máximo S/P foi observado às 8 semanas pós-infeção, decrescendo nas semanas seguintes. No presente estudo, os leitões infetaram-se na fase de desmame, aproximadamente entre as 6 e 9 semanas de vida, como determinado pelo teste RT-PCR. Nas semanas posteriores, e apesar da circulação do PRRSV na fase de engorda (demonstrada pelo *pool* positivo dos animais com 15 semanas de idade), observa-se um aumento dos valores S/P estimados durante a fase de engorda, como se pode observar na figura 11. Um aumento semelhante também ocorre quando é apenas considerado animais positivos no teste ELISA. Os valores S/P máximos foram observados nas amostras de animais com 21 semanas de vida, decrescendo rapidamente até às 24 semanas de vida, semelhante com o descrito com animais infetados pelo PRRSV experimentalmente (Brown *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2013) ou naturalmente (Sasaki *et al.*, 2010). Estes factos podem indicar que os animais com idades entre 18 e 21 semanas de

vida são a melhor opção para usar como sentinelas numa exploração infetada com PRRSV, mesmo com a vacinação do efetivo reprodutor. De facto, no presente estudo, não é apenas observado um aumento dos valores S/P previstos de animais nas fases de engorda até as 21 semanas de vida, mas também observa-se que a probabilidade dos porcos na fase de engorda se tornarem seropositivos ao PRRSV é 46 vezes superior quando comparado com os leitões na fase do desmame, embora o intervalo de confiança 95% da razão de probabilidades seja grande.

O presente estudo demonstra uma curva de animais seropositivos com diferentes idades quando as amostras são colhidas simultaneamente numa exploração infetada com os animais a serem infetados em diferentes idades. No entanto, os valores relativos baixos do coeficiente de regressão observado entre os valores S/P e as idades de todos os animais ($R^2 = 0,60$) ou apenas os positivos ($R^2 = 0,47$) podem indicar que a idade dos animais não é único fator importante que afeta a seroconversão, mesmo com a circulação do vírus na exploração comprovada pelos resultados positivos PCR em animais de diferentes idades. Provavelmente, a capacidade individual de imunomodulação e a potencial interação com outros microrganismos, como por exemplo *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou Circovirus (Lévesque *et al.*, 2014; Fraile *et al.*, 2009), coincidindo com as análises ELISA anteriores, pode também afetar os porcos.

Os resultados do presente estudo também sugerem que as medidas de biossegurança aplicadas até à data não eram suficientes. Para controlar e erradicar o PRRS, existem vários procedimentos, incluindo a adaptação dos animais de substituição, sistemas All-In/All-out, administração de medicamentos anteriormente ao desmame, segregação precoce nos desmames, despovoamento unidirecional dos desmames e a vacinação, apesar desta última possuir diferentes taxas de sucesso. Nas explorações infetadas, como a presente exploração deste estudo, o encerramento da exploração deve ser iniciado com o objetivo de impedir a entrada de novas estirpes e reduzir o número de subpopulações sensíveis. A preparação das marrãs é também eficaz quando é utilizada uma exposição planeada ao PRRSV de campo, sendo um processo barato e eficaz na diminuição dos efeitos adversos da PRRS em porcas gestantes (Thanawongnuwech *et al.*, 2010).

A utilização de vacinas vidas modificadas é muito comum e tem demonstrado eficácia na redução dos sinais clínicos e na gravidade dos mesmos. Também é eficaz na redução da duração da viremia e excreção do vírus. Estudos anteriores demonstraram que a vacinação concede proteção desde 50% a 85%, conferindo alguma imunidade (Osorio *et al.*,

1998; Scotti *et al.*, 2006; Martelli *et al.*, 2009). No entanto, este tipo de vacinas possui limitações quando enfrentam estirpes PRRSV geneticamente distintas (Thanawongnuwech *et al.*, 2010). Em casos extremos, a despovoamento total com posterior repovoamento pode ser utilizado e possui elevada eficácia na erradicação do vírus. No entanto, é um método com elevado custo (Yeske, 2010).

CONCLUSÃO

A *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome* é uma doença que está em contínua evolução, gerando novas estirpes e expandindo a sua diversidade. No entanto, a indústria moderna suinícola é também uma grande preocupação pois é responsável pela distribuição do vírus a nível nacional ou mesmo internacional (Shi *et al.*, 2010b).

Para combater este problema atual, é necessário a implementação rigorosa das medidas de controlo e erradicação da doença, assim como a criação de novos mais eficazes e a criação de novos métodos de vigilância.

De acordo com os resultados apresentados e com o discutido ao longo deste trabalho, podemos concluir:

- Os anticorpos contra o PRRSV originados pela imunidade passiva (maternal) em leitões nas maternidades aparentam desaparecer antes do 1º mês de vida, antes do desmame;
- O uso de vacinas vivas atenuadas ou modificadas na vacinação do efetivo reprodutor não é suficiente na prevenção de infeção de leitões nas fases de desmame;
- Os leitões nas fases de desmame são capazes de realizar seroconversão ao infetarem-se através do contacto com o PRRSV;
- A seroconversão é incrementada nas fases de engorda;
- Os valores S/P máximos foram observados nas amostras dos porcos com idades de 21 semanas de vida, decrescendo até as 24 semanas de vida;
- Em explorações infetadas ou em explorações endémicas, os porcos com idades compreendidas entre as 18 e 21 semanas de vida são a melhor opção para animais sentinela da PRRS.

No caso do presente estudo seria aconselhado iniciar um processo de encerramento da exploração, impedindo a entrada de animais sensíveis na exploração e permitir a homogeneização imunitária da exploração, por um período não inferior a 6 meses (Schaefer and Morrison, 2007; Yeske, 2009).

Seria aconselhado também modificar o protocolo vacinal para um programa vacinal do efetivo reprodutor em massa mais rigoroso e apertado. É importante referir que o programa vacinal consiste na vacinação de 6 em 6 meses, sendo este um período maior que o defendido pela bibliografia.

Adicionalmente, de forma a diminuir os efeitos negativos da doença nos animais em crescimento, poderia sugerir-se o início da vacinação dos leitões aproximadamente às 3 semanas de vida. Esta vacinação permite preparar o sistema imunitário dos animais mais jovens para o desafio com o PRRS. Por outro lado, permite a posterior diminuição de excreção viral por parte destes animais, reduzindo a pressão de (re)infecção do efetivo reprodutor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albina, E., Carrat, C., Charley, B. (1998). Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Interferon Cytokine Res.* 18, pp. 485–490.
- Albina, E., Leforban, Y., Baron, T., Plana Duran, J.P., Vannier, P., (1992). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Annals of veterinary research*, 23, pp. 167–176
- Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Torrison, J. (1994) Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet Rec*, 134, pp. 567-573.
- Albina, E., Mesplede, A., Chenut, G., Le Potier, M.F., Bourbao, G., Le Gal, S., Leforban, Y., (2000). A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Vet. Microbiol.* 77, pp. 43–57
- Alexopoulos, C., Kritas, S.K., Kyriakis, C.S., Tzika, E., Kyriakis, S.C. (2005) Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *Vet Microbiol.* 111, pp. 151-157
- Allan, G., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Meehan, B., McNair, I., Walker, I., Kennedy, S. (2000). Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication. *Arch Virol*, 145, pp. 2421–2429.
- Allende, R., Laegreid, W., Kutish, G., Galeota, J., Wills, R.W., Osorio, F.A. (2003) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection. *J Virol*.72, pp. 10834–10837.
- Allende, R., Lewis, T.L., Lu, Z., Rock, D.L., Kutish, G.F., Ali, A., Doster, A.R., Osorio, F.A., (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J Gen Virol*, 80, pp. 307–315.
- Andreasen, M. (2000) Experiences with eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome in Danish swine herds. *Vet Res.* 31, pp. 91-92
- Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M. (1997). Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch Virol*,142, pp. 993-1001.
- Baker, S.C., Baric, R.S., Balasuriya, U.B., Brinton, M.A., Bonami, J.R., Crowley, J.A., de Groot, R.J., Enjuanes, L., Faaberg, K.S., Flegel, T.W., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Leung, F.C.-C., Lightner, D.V., Nauwynck, H., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Snijder, E.J., Stadejk, T., Talbot, P.J., Walker, R.M., Woo, P.C.Y., Yang, H., Yoo, D., Ziebuhr, J., (2012). Nidovirales, *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, CA, USA, pp. 785–834.
- Batista, L., Dee, S.A. (2002). Inducing sterilizing immunity against PRRSV in breeding-age, female swine. *Proc A D Leman Swine Conf.* pp. 78-80.

- Batista, L., Dee, S.A., Rossow, K.D., Polson, D.D., Xiao, Z., Olin, M., Murtaugh, M.P., Molitor, T.W., Joo, H.S., Pijoan, C. (2004). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs with low positive or negative ELISA s/p ratios. *Vet Rec*, 154, pp. 25–26.
- Batista, L., Paradis, M.A., Gagnon, C., Gottschalk, M. (2009). Evaluation of the effects of tilmicosin (Pulmotil AC[®]) administered in drinking water on nursery pigs inoculated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Proc AASV*. Dallas, Texas. pp. 173-177.
- Batista, L., Pijoan, C. (2000). PRRS control by gilt replacement exposure in the nursery. *Proc AASV PreConference Seminar*. Indianapolis, Indiana. pp. 1-12.
- Baumann, A., Mateu, E., Murtaugh, M.P., Summerfield, A. (2013). Impact of genotype 1 and 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses on interferon-alpha responses by plasmacytoid dendritic cells. *Vet Res*. 44, pp. 33.
- Bautista, E.M., Faaberg, K.S., Mickelson, D., McGruder, E.D., (2002). Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 298, pp. 258–270.
- Bautista, E.M., Goyal, S.M., Yoon, I.J., Joo, H.S., Collins, J.E. (1993). Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J Vet Diagn Invest*, 5, pp. 163–165.
- Bautista, E.M., Suarez, P., Molitor, T.W. (1999). T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 144, pp. 117–134.
- Benfield, D.A., Collins, J.E., Dee, S.A., Halbur, P.G., Joo, H.S., Lager, K.M., Mengeling, W.L., Murtaugh, M.P., Rossow, K.D., Stevenson, G.W., Zimmerman, J.J. (1999) Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Straw, B.E., D’Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., Diseases of Swine. 8^a ed. Ames, Iowa, pp. 201-232.
- Benfield, D.A., Nelson, C., Steffen, M., Rowland, R.R.R. (2000). Transmission of PRRSV by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. *Proc Annu Meet Am Assoc Swine Pract*, pp. 405–408.
- Benfield, D.A., Nelson, E., Collins, J.E., Harris, L., Goyal, S.M., Robison, D., Christianson, W.T., Morrison, R.B., Gorcyca, D., Chladek, D. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate VR-2332). *J Vet Diagn Invest*, 4, pp. 127–133.
- Benson, J.E., Yaeger, M.J., Lager, K.M. (2000) Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) exposure dose on fetal infection in vaccinated and non vaccinated swine. *J Swine Health Prod*. 8, pp. 155-160.
- Beura, L.K., Sarkar, S.N., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, A.K., and Osorio, F.A. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J Virol*, 84, pp. 1574–1584.
- Bierk, M., Dee, S., Rossow, K., Otake, S., Collins, J.E., Molitor, T.W. (2001). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can J Vet Res*, 65, pp. 261–266.
- Bischoff, C., Ohlinger, V.F., Pesch, S. (2000). History, occurrence, dynamics and current status of PRRS in Europe. *Vet. Res*, 31, pp. 86-87.

- Bishop, K.N., Holmes, R.K., Sheehy, A.M., Malim, M.H., (2004). APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* 305 (5684), 645
- Blaha, T. (1992). Epidemiological investigations into PEARs in Germany: Consequences in fattening pigs. *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, 12, pp. 126
- Bøtner, A., Nielsen, J., Bille-Hansen, V. (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a Danish swine herd and experimental infection of pregnant gilts with the virus. *Vet Microbiol.*, 40, pp. 351-60.
- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sørensen, K.J., Have, P., Madsen, K.G., Madsen, E.S., Alexandersen, S. (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet Rec.* 141, pp. 497-499
- Brockmeier, S., Palmer, M., Bolin, S. (2000). Effects of intranasal inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Bordetella bronchiseptica*, or a combination of both organisms in pigs. *Am J Vet Res* 61, pp. 892–899.
- Brockmeier, S.L., Lager, K.M., Grubman, M.J., Brough, D.E., ETTYREDDY, D., SACCO, R.E., GAUGER, P.C., LOVING, C.L., VORWALD, A.C., KEHRLI, M.E., LEHMKUHL, H.D. (2009). Adenovirus-mediated expression of interferon-alpha delays viral replication and reduces disease signs in swine challenged with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol.* 22, pp. 173–180.
- Brockmeier, S.L., Loving, C.L., Vorwald, A.C., Kehrlí Jr., M.E., Baker, R.B., Nicholson, T. L., Lager, K.M., Miller, L.C., Faaberg, K.S., (2012). Genomic sequence and virulence comparison of four Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains. *Virus Res*, 169, pp. 212–221.
- Brown, E., Lawson, S., Welbon, C., Gnanandarajah, J., Li, J., Murtaugh, M.P., Nelson, E.A., Molina, R.M., Zimmerman, J.J., Rowland, R.R., Fang, Y. (2009). Antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) nonstructural proteins and implications for diagnostic detection and differentiation of PRRSV types I and II. *Clin Vaccine Immunol*, 16, pp. 628–635.
- Bruner, L. (2007). Serum inoculation in a sow herd for the control of PRRSV: A case report. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp. 65-68.
- Butler, J.E., Lager, K.M., Golde, W., Faaberg, K.S., Sinkora, M., Loving, C., Zhang, Y.I. (2014). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an immune dysregulatory pandemic. *Immunol Res.* 59, pp. 81-108
- Butler, J.E., Lemke, C.D., Weber, P., Sinkora, M., Lager, K.D. (2007). Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets: XIX. Undiversified B cells with hydrophobic HCDR3s preferentially proliferate in PRRS. *J Immunol.* 178, pp. 6320–6331.
- Butler, J.E., Wertz, N. (2006). Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. XVII. IgG subclass transcription revisited with emphasis on new IgG3. *J Immunol.* 177, pp. 5480–5489
- Cafruny, W.A., Jones, Q.A., Haven, T.R., Zitterkopf, N.L., Plagemann, P.G., Rowland, R.R. (2003). Glucocorticoid regulation of lactate dehydrogenase-elevating virus replication in macrophages. *Virus Res*, 92, pp. 83–87.
- Cano, J.P., Dee, S., Rovira, A., Zanzi, C.M., Anil, S., Morrison, R. (2010) PRRS virus vertical transmission dynamics in a sow herd. *Proc IPVS Cong.* Vancouver, Canada. pp. 115:149.

- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Pijoan, C. (2007a) Impact of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine intervention on a population of pigs infected with a heterologous isolate. *Vaccine*. 25, pp. 4382-4391.
- Cano, J.P., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Trincado, C.A., Pijoan, C.B. (2007b). Effect of vaccination with a modifiedlive porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine on dynamics of homologous viral infection in pigs. *Am J Vet Res*. 68, pp. 565-571.
- Charbonneau, G. (2007) Best management practices used in the control of PRRS. *Proc London Swine Conference*. pp. 145-150.
- Charerntantanakul, W. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. *World J Virol*. 1, pp. 23-30.
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., and Fang, Y. (2010). Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398, pp. 87–97.
- Cho, J.G., Dee, S.A., Deen, J., Trincado, C., Fano, E., Jiang, Y., Faaberg, K., Murtaugh, M.P., Guedes, A., Collins, J.E., Joo, H.S. (2006). The impact of animal age, bacterial coinfection, and isolate pathogenicity on the shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in aerosols from experimentally infected pigs. *Can J Vet Res*, 70, pp. 297–301.
- Christianson, W.T., Choi, C.S., Collins, J.E., Molitor, T.W., Morrison, R.B., Joo, H.S. (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res.*, 57, pp. 262-268
- Christianson, W.T., Collins, J.E., Benfield, D.A., Harris, L., Gorcyca, D.E., Chladek, D.W., Morrison, R.B., Joo, H.S. (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am J Vet Res.*, 53, pp. 485-488.
- Christopher-Hennings J, Faaberg KS, Murtaugh MP, Nelson, E.A., Roof, M.B., Vaughn, E.M., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (2002). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) diagnostics: Interpretation and limitations. *J Swine Health Prod*, 10, pp. 213–218
- Christopher-Hennings, J., Holler, L., Benfield, D., Nelson, E. (2001). Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J Vet Diagn Invest*, 13, pp. 133–142.
- Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C., *et al.*, (1995). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (7), pp. 1730–1734.
- Chu, J.Q., Hu, X.M., Kim, M.C., Park, C.S., Jun, M.H. (2009). Development and validation of a recombinant nucleocapsid protein-based ELISA for detection of the antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Microbiol.* 47, pp. 582-588
- Chung, W.B., Lin, M.W., Chang, W.F., Hsu, M., Yang, P.C. (1997) Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in intensive farrow-to-finish pig herds. *Can J Vet Res*, 61, pp. 292-298.
- Collins, J.E., Benfield, D.A., Christianson, W.T., Harris, L., Hennings, J.C., Shaw, D.P., Goyal, S.M., McCullough, S., Morrison, R.B., Joo, H.S., *et al.*, (1992). Isolation of

- swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*, 4, pp. 117–126.
- Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P., Thiel, H.J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 193, pp. 329–339.
- Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., Morrison, R.B. (2010). Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, pp. 185-192.
- Costers, S., Lefebvre, D.J., Goddeers, B., Deputte, P.L., Nauwycnc, H.J. (2009). Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3⁺ CD8 high cell. *Vet Res.* 40, pp. 46.
- Cutler, T.D., Wang, C., Hoff, S.J., Zimmerman, J.J. (2011). Median infectious dose (ID₅₀) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate MN-184 via aerosol exposure. *Vet Microbiol.*, 151, pp. 229–237.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264, pp. 1415–1421.
- Das, P.B., Dinh, P.X., Ansari, I.H., de Lima, M., Osorio, F.A., Pattnaik, A.K. (2010). The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J Virol*, 84, pp. 1731–1740
- de Jong, M.F., Cromwijk, W., Van't Veld, P. (1991). The new pig disease: Epidemiology and production losses in the Netherlands. In *The new pig disease. Porcine reproductive and respiratory syndrome. A report on the seminar/workshop held in Brussels on April 29–30 and organized by the European Commission (Directorate General for Agriculture)*, pp. 9–19
- de Lima, M., Pattnaik, A.K., Flores, E.F., Osorio, F.A. (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 353, pp. 410–421.
- Dea, S., Bilodeau, R., Athanassios, R., Sauvageau, R.A., Martineau, G.P. (1992) Québec. Isolation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Québec. *Can Vet J*, 33, pp. 552–553.
- Dea, S., Gagnon, C.A., Mardassi, H., Pirzadeh, B., and Rogan, D. (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 145, pp. 659–688
- Dea, S., Sawyer, N., Alain, R., and Athanassios, R. (1995). Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. *Adv. Exp. Med. Biol.* 380, pp. 95–98.
- DeBuse, N.K. (2007). Overview of multiple approaches to system-wide eradication of PRRS. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp. 15-18.
- Dee, S. (2004) The science of PRRS: What do we really know about its transmission, diagnosis and control? *Proc AASV*. Des Moines, Iowa. pp. 353-357.

- Dee, S., Otake, S., Deen, J. (2010). Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: results from a 2-year study. *Virus Res.*, 154, pp. 177-84
- Dee, S.A., Bierk, M.D., Deen, J., Molitor, T.W. (2001a) An evaluation of test and removal for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 5 swine farms. *Can J Vet Res.* 65, pp. 22-27.
- Dee, S.A., Deen, J., Otake, S., Pijoan, C. (2004). An assessment of transport vehicles as a source of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transmission to susceptible pigs. *Can J Vet Res.*, 68, pp. 124–133.
- Dee, S.A., Deen, J., Rossow, K.D., Weise, C., Eliason, R., Otake, S., Joo, H.S., Pijoan, C. (2003). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can J Vet Res.*, 67, pp. 12–19.
- Dee, S.A., Joo, H.S. (1994). Recurrent reproductive failure associated with porcine reproductive and respiratory syndrome in a swine herd *J Am Vet Med Assoc*, 205, pp. 1017–1018.
- Dee, S.A., Joo, H.S. (1997) Strategies to control PRRS: A summary of field and research experiences. *Vet Microbiol.* 55, pp. 347-353.
- Dee, S.A., Joo, H.S., Henry, S., Tokach, L., Park, B.K., Molitor, T., Pijoan, C., (1996). Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. *Swine Health Prod*, 4, pp. 181–184.
- Dee, S.A., Joo, H.S., Park, B.K., Molitor, T.W., Bruna, G. (1998). Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. *Vet Rec.* 142, pp. 569-572
- Dee, S.A., Molitor, T.W. (1998). Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *Vet Rec*, 143, pp. 474–476.
- Dee, S.A., Philips, R. (1998). Using vaccination and unidirectional pig flow to control PRRSV transmission. *J Swine Health Prod.* 6, pp. 21-25.
- Dee, S.A., Torremorell, M., Rossow, K., Mahlum, C., Otake, S., Faaberg, K. (2001b) Identification of genetically diverse sequences (ORF 5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *Can J Vet Res*, 65, pp. 254-60.
- Delputte, P.L. and Nauwynck, H.J. (2004). Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J. Virol.* 78, pp. 8094–8101.
- Delputte, P.L., Van Breedam, W., Delrue, I., Oetke, C., Crocker, P.R., and Nauwynck, H.J. (2007). Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin. *J. Virol.* 81, pp. 9546–9550.
- Delputte, P.L., Vanderheijden, N., Nauwynck, H.J., and Pensaert, M.B. (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, pp. 4312–4320.
- den Boon, J.A., Faaberg, K.S., Meulenbergh, J.J., Wassenaar, A.L., Plagemann, P.G., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J. (1995). Processing and evolution of the N-terminal

- region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *J Virol*, 69, pp. 4500-4505
- Desrosiers, R., Boutin, M. (2002). An attempt to eradicate porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) after an outbreak in a breeding herd: eradication strategy and persistence of antibody titers in sows. *J Swine Health Prod.* 10, pp. 23-25.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2005). Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 86, pp. 1943-1951.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2006). Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology*, 351, pp. 249-59
- Díaz, I., Gimeno, M., Callén, A., Pujols, J., López, S., Charreyre, C., Joisel, F., Mateu, E. (2013). Comparison of different vaccination schedules for sustaining the immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet J.* 197, pp. 438-444.
- Díaz, I., Venteo, Á., Rebollo, B., Martín-Valls, G.E., Simon-Grifé, M., Sanz, A., Mateu, E. (2012). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Vet Diagn Invest*, 24, pp. 344-348
- Done, S.H., Paton, D.J. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet Rec*, 136, pp. 32–35.
- Drew, T.W. (2000). A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res.* 31, pp. 27–39.
- Drew, T.W., Meulenber, J.J., Sands, J.J., Paton, D.J., (1995). Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 76, pp. 1361–1369.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert M.B. (1997a) Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol*, 56, pp. 9-19.
- Duan, X., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B. (1997b). Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Arch Virol* 142, pp. 2483–2497
- Duan, X., Nauwynck, H., Favoreel, H., Pensaert, M. (1998). Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages. *J Virol*, 72, pp. 4520–4523
- Dubois, P. (2007). Costs and benefits of herd closure associated with PRRS eradication. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp.19-20
- Dufresne, L. (2003). Control and elimination of PRRS in multiple site production. *Proc AASV*. Orlando, Florida. 2003:541-547.

- Dunowska, M., Biggs, P.J., Zheng, T., Perrott, M.R., (2012). Identification of a novel nidovirus associated with a neurological disease of the Australian brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Vet Microbiol*, 156, pp. 418–424.
- Epperson, B., Holler, L. (1997). An abortion storm and sow mortality syndrome. *Proc Annu Meet Am Assoc Swine Pract*, pp. 479–484.
- Faaberg, K.S., Balasuriya, U.B., Brinton, M.A., Gorbalenya, A.E., Leung, F.C., Nauwynck, H., Snijder, E.J., Stadejek, T., Yang, H., Yoo, D. (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, pp. 796–805.
- Faaberg, K.S., Even, C., Palmer, G.A., Plagemann, P.G., (1995). Disulfide bonds between two envelope proteins of lactate dehydrogenase-elevating virus are essential for viral infectivity. *J Virol*, 69, pp. 613–617.
- Faaberg, K.S., Kehrl, M.E., Lager, K.M., Guo, B., Han, J. (2010) In vivo growth of porcine reproductive and respiratory syndrome virus engineered nsp2 deletion mutants. *Virus Res*. 154, pp. 77-85.
- Fang, Y. and Snijder, E.J. (2010). The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res*. 154, pp. 61–76.
- Fang, Y., Kim, D.-Y., Ropp, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Rowland, R.R.R., (2004). Heterogeneity in Nsp2 of European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses isolated in the United States. *Virus Res*, 100, pp. 229–235.
- Fang, Y., Schneider, P., Zhang, W.P., Faaberg, K.S., Nelson, E.A., Rowland, R.R., (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Arch Virol*, 152, pp. 1009–1017
- Fangman, T.J., Kleiboeker, S.B., Coleman, M. (2007). Tonsillar crypt exudate to evaluate shedding and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus after inoculation with live field virus or vaccination with modified live virus vaccine. *J Swine Health Prod*, 15, pp. 219–223.
- Fano, E., Olea, L., Pijoan, C. (2005). Eradication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serum inoculation of naïve gilts. *Can J Vet Res*. 69, pp. 71-74.
- Feitsma, H., Grooten, H.J., Schie, F.W. (1992). The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. *Proc 12th Int Anim Reprod Congr*, pp. 1710–1712.
- Feng, W., Laster, S., Tompkins, M., Brown, T., Xu, J.S., Altier, C., Gomez, W., Benfield, D., McCaw, M.B. (2001). In utero infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol*, 75, pp. 4889–4895.
- FitzSimmons, M.A. (2005). Principles of dealing with PRRS. *Proc AASV*. Toronto, Ontario. pp. 319-328.
- Forsberg, R., Oleksiewicz, M.B., Petersen, A.M., Hein, J., Bøtner, A., Storgaard, T. (2001) A molecular clock dates the common ancestor of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus at more than 10 years before the emergence of disease. *Virology*, 289, pp.174-179.

- Forsberg, R., Storgaard, T., Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Cordioli, P., Sala, G., Hein, J., Botner, A., (2002). The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe. *Virology* 299, pp. 38–47
- Foss, D.L., Zilliox, M.J., Meier, W., Zuckermann, F., Murtaugh, M.P. (2002). Adjuvant danger signals increase the immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol* 15, pp. 557–566.
- Fraile, L., Calsamiglia, M., Mateu, E., Espinal, A., Cuxart, A., Seminati, C., *et al.*, (2009). Prevalence of infection with porcine circovirus-2 (PCV-2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in an integrated swine production system experiencing postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res*, 73, pp. 308-312.
- Franca, R., Spadari, S., Maga, G., (2006). APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism. *Med Sci Monit*, 12 (5), RA92–RA98
- Freese, W.R., Joo, H.S. (1994). Cessation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus spread in a commercial swine herd. *Swine Health Prod*, 2, pp. 13–15
- Galina, L., Pijoan, C., Sitjar, M., Christianson, W.T., Rossow, K., Collins, J.E. (1994). Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec*, 134, pp. 60–64.
- Gerber, P.F., O'Neill, K., Owolodun, O., Wang, C., Harmon, K., Zhang, J., Halbur, P.G., Zhou, L., Meng, X.J., Opriessnig, T. (2013) Comparison of commercial real-time reverse transcription-PCR assays for reliable, early, and rapid detection of heterologous strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected or noninfected boars by use of different sample types. *J Clin Microbiol*. 51, pp. 547-56
- Gillespie, T.G., Carroll, A.L. (2003) Techniques for PRRSV elimination utilizing modified live vaccine on single-site swine farms. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp. 549-552.
- Gnanandarajah, J.S., Dvorak, C.M., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P. (2008). Presence of free haptoglobin alpha 1S-subunit in acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Gen Virol*. 89, pp. 2746-2753
- Goldberg, T.L., Hahn, E.C., Weigel, R.M., Scherba, G. (2000). Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J Gen Virol*, 81, pp. 171–179.
- Gonzalez-Navajas, J.M., Lee, J., David, M., Raz, E.. (2012) Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*. 12, pp. 125–135.
- Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*, 117, pp. 17–37.
- Goyal, S.M. (1993) Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*, 5, pp. 656-664.
- Grebennikova, T., Clouser, D., Vorwald, A., Musienko, M.I., Mengeling, W.L., Lager, K.M., Wesley, R.D., Biketov, S.F., Zaberezhny, A.D., Aliper, T.I., Nepoklonov, E.A. (2004). Genomic characterization of virulent, attenuated, and revertant passages of a North American porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain. *Virology*, 321, pp. 383–390

- Grosse-Beilage, E., Grosse-Beilage, T. (1992). Epidemiological investigations into PEARs in Germany: Influence on reproduction. *Proc 12th Congr Int Pig Vet Soc*, p. 125.
- Guo, B., Vorwald, A.C., Alt, D.P., Lager, K.M., Bayles, D.O., Faaberg, K.S. (2011) Large scale parallel pyrosequencing technology: PRRSV strain VR-2332 nsp2 deletion mutant stability in swine. *Virus Res*. 161, 162-169.
- Halbur, P.G. (2003). Factors that influence the severity of clinical disease. In J Zimmerman, K-J Yoon, eds. *The PRRS Compendium*, (2^a ed.). Des Moines, IA: National Pork Board, pp. 17–25.
- Halbur, P.G., Andrews, J.J., Huffman, E.L., Paul, P.S., Meng, X.J., Niyo, Y. (1994). Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J Vet Diagn Invest*, 6, pp. 254–257.
- Halbur, P.G., Bush, E. (1997). Update on abortion storms and sow mortality. *Swine Health Prod*, 5, pp. 73.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., (1995). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol*. 32, pp. 648–660.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Frey, M.L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X.J., Andrews, J.J., Lum, M.A., Rathje, J.A. (1996b). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol*, 33, pp. 159–170.
- Halbur, P.G., Paul, P.S., Meng, X.J., Lum, M.A., Andrews, J.J., Rathje, J.A., (1996a). Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Investig.* 8, pp. 11–20.
- Halbur, P.G., Rothschild, M.F., Thacker, B.J., Meng, X.J., Paul, P.S., Bruna, J.D. (1998) Differences in susceptibility of Duroc, Hampshire, and Meishan pigs to infection with a high virulence strain (VR2385) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *J Anim Breed Genet* 115: 181–189
- Han, J., Rutherford, M.S., Faaberg, K.S., (2009). The porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 cysteine protease domain possesses both trans- and cis-cleavage activities. *J Virol*, 83, pp. 9449–9463.
- Han, J., Wang, Y., Faaberg, K.S., (2006). Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 122, pp. 175–182.
- Han, K., Seo, H.W., Park, C., Oh, Y., Kang, I., Ham, H.J., *et al.*, (2013). Comparative Pathogenicity of three Korean and one Lelystad type I Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (Pan-European subtype 1) isolates in experimentally infected pigs. *J Comp Pathol*, 149, pp. 331-340.
- Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol Biol Evo*, 22, pp. 1024-1031
- Harms, P., Sorden, S., Halbur, P., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol*, 38, pp. 528–539.

- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., Bauer, S. (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol.* 33, pp. 2987–2997.
- Hermann, J.R., Muñoz-Zanzi, C.A., Roof, M.B., Burkhart, K., Zimmerman, J.J. (2005) Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet Microbiol.*, 110, pp. 7-16
- Hilgenfeld, R., Peiris, M., (2013). From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antivir. Res.* 100, pp. 286–295
- Hill, H.T., Mulford, J.A., Kaisand, J.J., Holtcamp, A., Reyes, C. (2004). PRRS control: To hell and back. *Proc AASV.* Des Moines, Iowa. pp. 369-375.
- Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Zimmerman JJ, Neumann E, Rotto H, Yode T, *et al.*, Economic Analysis of PRRS Virus Elimination from a Herd. Animal Industry Report 2012; AS 658, ASL R2678. Available (March 23, 2015) at: http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1716&context=ans_air.
- Holtkamp, D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, T., Yeske, P., Zimmerman, J. (2011). Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod.* 19, pp. 44–56.
- Hopper, S.A., White, M.E., Twiddy, N., (1992). An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec*, 131, pp. 140–144.
- Horter, D.C., Pogramichniy, R.C., Chang, C.C., Evans, R.B., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Microbiol*, 86, pp. 213–218.
- Hughes, S.D., Rouy, D., Navaratnam, N., Scott, J., Rubin, E.M., (1996). Gene transfer of cytidine deaminase apoBEC-1 lowers lipoprotein(a) in transgenic mice and induces apolipoprotein B editing in rabbits. *Human gene therapy*, 7, pp. 39–49.
- Indik, S., Valicek, L., Klein, D., Klanova, J., (2000). Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 81, pp. 2497–2502.
- Iowa State University. 2010. PRRS X3. Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine on line report. <http://vetmed.iastate.edu/diagnostic-lab/diagnostic-services/diagnostic-sections/serology/prrs3x>.
- Jacobs, A.C., Hermann, J.R., Muñoz-Zanzi, C., Prickett, J.R., Roof, M.B., Yoon, K.J. (2010). Stability of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus at ambient temperatures. *J Vet Diagn Invest*, 22, pp. 257–260.
- Jenkins, G.M., Rambaut, A., Pybus, O.G., Holmes, E.C., (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol.* 54, pp. 156–165.
- Johnson, C.R., Yu, W., Murtaugh, M.P. (2007). Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 88, pp. 1184–1195.

- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, C.R., Murtaugh, M.P. (2004). Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 102, pp. 233–247
- Joo, H.S., Park, B.K., Dee, S.A., Pijoan, C. (1997). Indirect fluorescent IgM antibody response of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 55, pp. 303–307
- Kappes, M.A., Faaberg, K.S. (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*, 479-480, pp. 475–486
- Kappes, M.A., Miller, C.L., Faaberg, K.S. (2013). Highly divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus incorporate multiple isoforms of nonstructural protein 2 into virions. *J Virol*. 87, pp.13456–13465.
- Karniychuk, U.U., Nauwynck, H.J. (2013). Pathogenesis and prevention of placental and transplacental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res*. 7, pp. 44:95
- Kawai, T., Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, 7, pp. 131–137.
- Keffaber, K.K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Prac Newsletter*, 1, pp. 1-9.
- Keffaber, K.K., Stevenson, G., Van Alstine, W., Kanitz, C., Harris, L., Gorcyca, D., Schlesinger, K., Schultz, R., Chladek, D., Morrison, R. (1992). SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Am Assoc Swine Prac Newsletter* 4, pp. 38-39.
- Kim, W.I., Lee, D.S., Johnson, W., Roof, M., Cha, S.H., Yoon, K.J. (2007). Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet Microbiol*, 123, pp. 1-14.
- Kimman, T.G., Cornelissen, L.A., Moormann, R.J., Rebel, J.M., Stockhofe-Zurwieden N. (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*, 27, pp. 3704-3718
- Kittawornrat, A., Prickett, J., Chittick, W., Wang, C., Engle, M., Johnson, J., Patnayak, D., Schwartz, T., Whitney, D., Olsen, C., Schwartz, K., Zimmerman, J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance? *Virus Res*, 154, pp. 170–176.
- Klinge, K.L., Vaughn, E.M., Roof, M.B., Bautista, E.M., Murtaugh, M.P. (2009). Age-dependent resistance to Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in swine. *Virology*, 6, pp. 177.
- Kloep, A., Wertz, N., Mendicino, M., Butler, J.E. (2012). Linkage haplotype for IgG and IgA subclass genes. *Immunogenetics*. 64, pp. 469–73.
- Kranker, S., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., Bøtner, A. (1998). Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol*, 61, pp.21–31.
- Kreutz, L.C., Ackermann, M.R. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res*, 42, pp. 137–147.

- Kristensen, K.S., Bøtner, A., Takai, H., Nielsen, J.P., Jorsal, S.E. (2004). Experimental airborne transmission of PRRS virus. *Vet Microbiol.*, 99, pp. 197–202.
- Kritas, S.K., Alexopoulos, C., Kyriakis, C.S., Tzika, E., Kyriakis, S.C. (2007) Performance of fattening pigs in a farm infected with both porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and porcine circovirus type 2 following sow and piglet vaccination with an attenuated PRRS vaccine. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 54, pp. 287-291.
- Kroese, M.V., Zevenhoven-Dobbe, J.C., Bos-de Ruijter, J.N., Peeters, B.P., Meulenberg, J.J., Cornelissen, L.A., and Snijder, E.J. (2008). The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis. *J Gen Virol.* 89, pp. 494–499.
- Labarque, G., Reeth, K., van Gucht, S., Nauwynck, H., Pensaert, M. (2002). Porcine reproductive-respiratory syndrome virus infection predisposes pigs for respiratory signs upon exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Vet Microbiol*, 88, pp. 1–12.
- Labarque, G.G., Nauwynck, H.J., Van Reeth, K., Pensaert, M.B. (2000). Effect of cellular changes and onset of humoral immunity on the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of pigs. *J Gen Virol.* 81, pp. 1327–1334.
- Lager, K.M., Halbur, P.G. (1996). Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*, 8, pp. 275–282.
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L. (1996). Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet Rec*, 138, pp. 227–228.
- Lager, K.M., Mengeling, W.L., Brockmeier, S.L. (1997). Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol*, 58, pp. 113–125
- Lager, K.M., Mengling, W.L., Brockmeier, S.L. (1999). Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenged-exposed with an antigenically distinct isolate. *Am J Vet Res.* 60, pp. 1022–1027.
- LaRue, R.S., Jonsson, S.R., Silverstein, K.A., Lajoie, M., Bertrand, D., El-Mabrouk, N., Hotzel, I., Andresdottir, V., Smith, T.P., Harris, R.S., (2008). The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol.* 9,104.
- Le Potier, M.F., Blanquefort, P., Morvan, E., Albina, E. (1997). Results of a control programme for the porcine reproductive and respiratory syndrome in the French 'Pays de la Loire' region. *Vet Microbiol.*, 55, pp. 355–360.
- Lee, C., Yoo, D., (2006). The small envelope protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus possesses ion channel protein-like properties. *Virology*, 355, pp. 30–43.
- Lee, S.M., Schommer, S.K., Kleiboeker, S.B. (2004). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes. *Vet Immunol Immunopathol*, 102, pp. 217–231.
- Lemke, C.D., Haynes, J.S., Spaete, R., Adolphson, D., Vorwald, A., Lager, K., Butler, J.E. (2004). Lymphoid hyperplasia resulting in immune dysregulation is caused by porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus infection in neonatal pigs. *J Immunol.* 172, pp. 1916–1925.
- Lévesque, C., Provost, C., Labrie, J., Hernandez Reyes, Y., Burciaga Nava, J.A., *et al.*, (2014). Actinobacillus pleuropneumoniae possesses an antiviral activity against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *PLoS One*, 9, pp. e98434.
- Lewis, C.R., Torremorell, M., Galina-Pantoja, L., Bishop, S.C. (2009). Genetic parameters for performance traits in commercial sows estimated before and after an outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Anim Sci*, 87, pp. 876–884.
- Li, B., Fang, L., Xu, Z., Liu, S., Gao, J., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S., (2009). Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg Infect Dis*, 15, pp. 2032–2035.
- Li, H., Zheng, Z., Zhou, P., Zhang, B., Shi, Z., Hu, Q., and Wang, H. (2010). The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 2 antagonizes interferon regulatory factor 3 activation. *J Gen Virol*, 91, pp. 2947–2958.
- Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, W., Jiang, P. (2007). Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet J*, 174, pp. 577–584
- Lin, Y.C., Chang, R.Y., Chueh, L.L. (2002). Leader–body junction sequence of the viral subgenomic mRNAs of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Taiwan. *J Vet Med Sci*, 64, pp. 961–965.
- Linhares, D.C., Cano, J.P., Torremorell, M., Morrison, R.B. (2014). Comparison of time to PRRSV-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSV in sow herds. *Prev Vet Med.* 116, pp. 111-119
- Linhares, D.C., Cano, J.P., Wetzell, T., Nerem, J., Torremorell, M., Dee, S.A. (2012). Effect of modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine on the shedding of wild-type virus from an infected population of growing pigs. *Vaccine.* 30, pp. 407-413.
- Linhares, D., Assayag, M., Almeida, M. (2013). PRRSV – O que é, como diagnosticar, controlar e eliminar. O que precisamos conhecer a respeito. São Paulo, Brasil: *Câmara Brasileira do Livro.*
- Lopez, O.J., Oliveira, M.F., Alvarez-Garcia, E., Kwon, B.J., Doster, A., Osoria, F.A. (2007). Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin Vaccine Immunol.* 14, pp. 269–275.
- Loula, T. (1991). Mystery pig disease. *Agri-practice*, 12, pp. 23–34.
- Luo, R., Xiao, S., Jiang, Y., Jin, H., Wang, D., Liu, M., Chen, H., Fang, L. (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Mol Immunol.* 45, pp. 2839–2846.
- Magar, R., Larochelle, R., Robinson, Y., Dubuc, C. (1993). Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can J Vet Res*, 57, pp. 300–304.

- Mardassi, H., Massie, B., Dea, S. (1996). Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 221, pp. 98–112.
- Martelli, P., Gozio, S., Ferrari, L., Rosina, S., Angelis, E., Quintavalla, C., Bottarelli, E., Borghetti, P. (2009). Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to heterologous European (Italian cluster) field strain: clinical protection and cell-mediated immunity. *Vaccine*, 27, pp. 3788–3799.
- Martínez-Lobo, F.J., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García-Artiga, C., Simarro, I., Castro, J.M., Prieto, C. (2011). Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet Microbiol*, 154, pp. 58-68
- Mateu, E., Diaz, I. (2008). The challenge of PRRS immunology. *Vet J*. 177, pp. 345–351.
- McCaw, M.B. (1995) McRebel TM PRRS: Management procedures for PRRS control in large herd nurseries. *Proc AD Leman Conf*. pp. 161-162.
- McCaw, M.B. (2006). Different approaches to handling PRRS. *Proc London Swine Conf*. pp. 21-33
- Meng, X.J., (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microbiol*. 12, 309–329.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Halbur, P.G., Lum, M.A., (1996a). Characterization of a highvirulence US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Investig*. 8, pp. 374–381.
- Meng, X.J., Paul, P.S., Morozov, I., and Halbur, P.G. (1996b). A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol*. 77, pp. 1265–1270.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. (1994). Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res.*, 55, pp. 1391-1398.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. (1995). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*, 7, pp. 3–16.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. (1999a). Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res*, 60, pp. 796–801.
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., (1998). Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of “atypical” PRRS. *Am. J. Vet. Res.* 59, pp. 1540–1544
- Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., Clouser, D.F. (2003). Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Microbiol*, 93, pp. 25–38.
- Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., Brockmeier, S.L. (1996). Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am J Vet Res*, 57, pp. 834–839

- Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., Clouser, D.F., Wesley, R.D. (1999b). Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res.* 60, pp. 334-340.
- Meulenberg, J.J., Bende, R.J., Pol, J.M., Wensvoort, G., Moormann, R.J., (1995). Nucleocapsid protein N of Lelystad virus: expression by recombinant baculovirus, immunological properties, and suitability for detection of serum antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2, pp. 652–656.
- Meulenberg, J.J., de Meijer, E.J., Moormann, R.J. (1993). Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader–body junction sequence. *J Gen Virol,* 74, pp. 1697–1701.
- Meulenberg, J.J., Hulst, M.M., de Meijer, E.J., Moonen, P.L., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., Moormann, R.J. (1994). Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. *Arch Virol. Supplementum.* 9, pp. 441–448
- Meulenberg, J.J., van Nieuwstadt, A.P., van Essen-Zandbergen, A., Langeveld, J.P., (1997). Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol,* 71, pp. 6061–6067
- Misinzo, G.M., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2008). Involvement of proteases in porcine reproductive and respiratory syndrome virus uncoating upon internalization in primary macrophages. *Vet. Res.* 39, pp. 55.
- Molina, R.M., Chittick, W., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Rowland, R.R., Zimmerman, J.J. (2008) Diagnostic performance of assays for the detection of anti-Porcine reproductive and respiratory syndrome virus antibodies in serum and muscle transudate ("meat juice") based on samples collected under experimental conditions. *J Vet Diagn Invest,* 20, pp. 735–743.
- Molitor TW, Xiao J, Choi CS. (1996). PRRS virus infection of macrophages: Regulation by maturation and activation state. *Proc Annu Meet Am Assoc Swine Pract,* pp. 563–569.
- Moore, C. (1990). Clinical presentation of mystery swine disease in the growing pig. *Proceedings of the Mystery Swine Disease Committee Meeting, Livestock Conservation Institute, Denver, Colorado,* pp. 41–49.
- Morrison, R.B., Collins, J.E., Harris, L., *et al.*, (1992). Sero-epidemiologic investigation of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS, PRRS, SIRS). *Proc Congr Int Pig Vet Soc* 12, pp. 114.
- Moxley, R.A., Olson, L.D., Davis, A.P. (1993). Experience with a planned exposure program for the control of enzootic transmissible gastroenteritis in swine. *J Am Vet Med Assoc.* 202, pp. 1861-1864.
- Mulupuri, P., Zimmerman, J.J., Hermann, J., Johnson, C.R., Cano, J.P., Yu, W., Dee, S.A., Murtaugh, M.P. (2008). Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol,* 82, pp. 358–370.
- Murtaugh, M. (2009). Update on PRRSV immunology and viral genetics: From hopeless to hopeful. *Proc AASV.* Dallas, Texas. pp. 459-462.
- Murtaugh, M. (2012). Use and interpretation of sequencing in PRRSV control programs. *Proc Allen D. Lemay Swine Conference,* pp. 49-55

- Murtaugh, M.P., Elam, M.R., Kakach, L.T., (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch Virol*, 140, pp. 1451–1460.
- Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Abrahante, J.E., Lam, T.T., Leung, F.C. (2010). The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 154, pp. 18-30.
- Murtaugh, M.P., Wagner, M. (2010). Protecting the pregnant sow from PRRS: Research findings. *Proc AASV*. Omaha, Nebraska. pp. 471-473.
- Murtaugh, M.P., Xiao, Z., Zuckermann, F., (2002a). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol*, 15, pp. 533–547.
- Murtaugh, M.P., Yuan, S., Faaberg, K.S., (2001). Appearance of novel PRRSV isolates by recombination in the natural environment. *Adv Exp Med Biol*, 494, pp. 31–36.
- Murtaugh, M.P., Yuan, S., Nelson, E., Faaberg, K.S., (2002b). Genetic interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in cell culture and in animals. *J Swine Health Prod*, 10, pp. 15–21.
- Nauwynck, H., Duan, X., Favoreel, H.W., Van Oostveldt, P., Pensaert, M.B. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J Gen Virol*, 80, pp. 297–305.
- Nedialkova, D.D., Ulferts, R., van den Born, E., Lauber, C., Gorbalenya, A.E., Ziebuhr, J., Snijder, E.J., (2009). Biochemical characterization of arterivirus nonstructural protein 11 reveals the nidovirus-wide conservation of a replicative endoribonuclease. *J Virol*, 83, pp. 5671–5682
- Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol*, 73, pp. 270-280.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A. (1994). Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Diagn Invest*, 6, pp. 410–415.
- Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, J.E., Benfield, D.A. (1993). Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 31, pp. 3184–3189.
- Nielsen, H.S., Oleksiewicz, M.B., Forsberg, R., Stadejek, T., Bøtner, A., Storgaard, T. (2001). Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J Gen Virol*, 82, pp. 1263–1272.
- Nilubol, D., Platt, K.B., Halbur, P.G., Torremorell, M., Harris, D.L. (2004) The effect of a killed porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol*. 102, pp. 11-18.
- Okuda, Y., Kuroda, M., Ono, M., Chikata, S., Shibata, I. (2008). Efficacy of vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus following challenges with field isolates in Japan. *J Vet Med Sci*. 70, pp. 1017-1025.
- Olin, M.R., Bastista, L., Xiao, Z., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Pijoan, C.C., Molitor, T.W. (2005). Gamma delta lymphocyte response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viral Immunol*. 18, pp. 490–499.

- Opriessnig, T., Pallares, F.J., Nilubol, D., Vincent, A.L., Thacker, E.L., Vaughn, E.M., Roof, M., Halbur, P.G. (2005). Genomic homology of ORF 5 gene sequence between modified live vaccine virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge isolates is not predictive of vaccine efficacy. *J Swine Health Prod.* 13, pp. 246-253.
- Osorio, F.A., Zuckermann, F., Wills, R., Meier, W., Cristian, S., Galeota, J., *et al.*, (1998). PRRSV: Comparison of commercial vaccine in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. *Proc. of the Allen D. Leman, Swine Conference*, 25, pp. 176-182.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J. (2010). Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet Microbiol.* 145, pp. 198-208.
- Otake, S., Dee, S.A., Moon, R.D., Rossow, K.D., Trincado, C., Pijoan, C. (2004) Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). *Vet Rec.*, 154, pp. 80–85.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Joo, H.S., Deen, J., Molitor, T.W., Pijoan, C. (2002a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet Rec*, 150, pp. 114–115.
- Otake, S., Dee, S.A., Rossow, K.D., Moon, R.D., Pijoan, C. (2002b). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by mosquitoes, *Aedes vexans* (Meigen). *Can J Vet Res.*, 66, pp. 191–195.
- Park, B.K., Yoon, I.J., Joo, H.S. (1996) Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. *Am J Vet Res.*, 57, pp. 320-323
- Patel, D., Nan, Y., Shen, M., Ritthipichai, K., Zhu, X., Zhang, Y.J. (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits type I interferon signaling by blocking STAT1/STAT2 nuclear translocation. *J Virol.* 84, pp. 11045–11055.
- Paton, D.J., Brown, I.H., Edwards, S., Wensvoort, G., (1991). 'Blue ear' disease of pigs. *The Vet Rec* 128, pp. 617.
- Pejsak, Z., Markowska-Daniel, I. (2006). Randomised, placebo-controlled trial of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sows on infected farms. *Vet Rec.* 158, pp. 475-478.
- Petry, D.B., Lunney, J., Boyd, P., Kuhar, D., Blankenship, E., Johnson, R.K. (2007). Differential immunity in pigs with high and low responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Anim Sci*, 85, pp. 2075–2092.
- Piras, F., Bollard, S., Laval, F., Joisel, F., Reynaud, G., Charreyre, C., Andreoni, C., Juillard, V. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol.* 18, pp. 381-389.
- Pitkin, A., Otake, S., Dee, S. (2009b). Biosecurity protocols for the prevention of spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *AASV Publication*. http://www.aasv.org/aasv/PRRSV_BiosecurityManual.pdf
- Pitkin, A.N., Deen, J., Dee, S.A. (2009a). Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol*, 136, pp. 1–7.

- Pittman, J.S. (2007). Use of exposure and closure to stabilize health in a large multi-age finishing site. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp. 3-11
- Plagemann, P.G., Moennig, V., (1992). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: a new group of positivestrand RNA viruses. *Advances in Virus Res*, 41, pp. 99–192.
- Plana Duran, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M., San Gabriel, A., Pujols, J., Badiola, J.L., Ramos, J.A., *et al.*, (1992). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet Microbiol*, 33, pp. 203–211.
- Pol JM, van Dijk JE, Wensvoort G, Terpstra C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet Q*, 13, pp. 137–143.
- Polson, D., Hartsook, G., Dion, K. (2010). McREBEL as a key component for the successful elimination of PRRS virus from very large swine breeding herds. *Proc IPVS Cong*. Vancouver, Canada. pp. 235-267
- Posthuma, C.C., Pedersen, K.W., Lu, Z., Joosten, R.G., Roos, N., Zevenhoven–Dobbe, J.C., and Snijder, E.J. (2008). Formation of the arterivirus replication/transcription complex: a key role for nonstructural protein 3 in the remodeling of intracellular membranes. *J Virol*, 82, pp. 4480–4491.
- Prickett, J., Cutler, S., Kinyon, J.M., Naberhaus, N., Stensland, W.R., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (2010). Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J Swine Health Prod*, 18, pp. 187–195.
- Prieto C, Sanchez R, Martin-Rillo S, *et al.* (1996). Exposure of gilts in early gestation to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Rec*, 138, pp. 536–539.
- Prieto, C., Alvarez, E., Martínez-Lobo, F.J., Simarro, I., Castro, J.M. (2008). Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet J*. 175, pp. 356-63
- Prieto, C., Castro, J.M. (2000). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in gestating sows. *Vet Res*, 31, pp. 56–57.
- Prieto, C., Castro, J.M. (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology*, 63, pp. 1-16.
- Prieto, C., Suarez, P., Sanchez, R., Solana, A. (1994). Semen changes in boars after experimental infection with porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus. *In Proc 13th Congr Int Pig Vet Soc*, p. 98.
- Prieto, C., Vázquez, A., Núñez, J.I., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, J.M. (2009). Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet J*. 180, pp. 363-370
- Pugh, M.L., Main, R., DeBuse, N., Karriker, L. (2005) Development of a quality-controlled protocol and resulting commercial sow farm production for on-farm live PRRS virus inoculation. *Proc AASV*. Toronto, Ontario. pp. 33-36
- Ramirez, A., Wang, C., Prickett, J.R., Pogranichniy, R., Yoon, K.J., Main, R., Johnson, J.K., Rademacher, C., Hoogland, M., Hoffmann, P., Kurtz, A., Kurtz, E., Zimmerman, J.

- (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluid. *Prev Vet Med*, 104, pp. 292-300
- Reicks, D.L. (2010). Using air filtration to reduce the risk of PRRS introduction. *Proc IPVS Cong. Vancouver, Canada*. pp. 239-271
- Roberts, J. (2002). Coping with PRRS Virus: treatment, control and elimination. *Proc 46th Annual North Carolina Pork Conf.*
- Roberts, J. (2003). Serological monitoring in infected sow herds. In J Zimmerman, K-J Yoon, eds. *The PRRS Compendium*, (2^a ed.). Des Moines, IA: National Pork Board, pp. 75–86.
- Robinson, S., Schwartz, J., Murtaugh, M. (2013). Humoral response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *10th Int'l Vet. Immunol. Symposium (IVIS) 2013*. Abstract P05.17, p 82.
- Rose, N., Renson, P., Andraud, M., Paboeuf, F., Le Potier, M.F., Bourry, O. (2015). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) modified-live vaccine reduces virus transmission in experimental conditions. *Vaccine*. 33, pp. 2493-2499
- Rosenfeld, P., Turner, P.V., MacInnes, J.I., Nagy, E., Yoo, D. (2009). Evaluation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in laboratory rodents. *Can J Vet Res*, 73, pp. 313-318
- Rossow, K.D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Pathol*, 35, pp. 1-20.
- Rossow, K.D., Bautista, E.M., Goyal, S.M., Molitor, T.W., Murtaugh, M.P., Morrison, R.B., Benfield, D.A., Collins, J.E. (1994a). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, pp. 3–12
- Rossow, K.D., Benfield, D.A., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Collins, J.E. (1996a). Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol*, 33, pp. 551–556
- Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet Pathol*, 32, pp. 361–373
- Rossow, K.D., Laube, K.L., Goyal, S.M., Collins, J.E. (1996b). Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. *Vet Pathol*, 33, pp. 95–99.
- Rossow, K.D., Morrison, R.B., Goyal, S.M., Singh, G.S., Collins, J.E. (1994b). Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest*, 6, pp. 368–371.
- Rovira, A., Reicks, D., Muñoz-Zanzi, C. (2007). Evaluation of surveillance protocols for detecting porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boar studs by simulation modelling. *J Vet Diagn Invest*. 19, pp. 492-501
- Rowland, R., Lawson, S., Rossow, K., Benfield, D. (2003). Lymphoid tissue tropism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication during persistent infection of pigs originally exposed to virus in utero. *Vet Microbiol*, 96, pp. 219–235.
- Ruen, P.D. (2003) How we use strategic inoculation to control PRRS. *Proc A D Leman Swine Conf.* pp. 60-67

- Ruen, P.D., Wagner, M.A., Davies, P.R. (2007) PRRS planned exposure in sow herds: What to expect. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp. 9-14.
- Sagong, M., Lee, C. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein modulates interferon-beta production by inhibiting IRF3 activation in immortalized porcine alveolar macrophages. *Arch Virol*. 156, pp. 2187–2195.
- Sandri, G.P. (2001). PRRS eradication by “Wean & Removal” in two large sow units working in a multi site system in Northern Italy. Can we call it a success? *International Symp Swine Disease Eradication*. pp. 11-13.
- SAS Institute Inc. JMP User's Guide. Version 7.0. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2007.
- Sasaki, K., Tsukahara, T., Taira, O., Tsuchiya, K., Itoh, M., Ushida, K. (2010). Prevalence of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine Circovirus type 2 in piglets after weaning on a commercial pig farm in Japan. *Anim Sci J*, 81, 135-141.
- Schaefer, N., Morrison, R. (2007). Effect on total pigs weaned of herd closure for elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Swine Health Prod*, 15, pp. 152–155.
- Schoggins, J.W., Rice, C.M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol*. 1, pp. 519–525.
- Schuon, C., Westhoff, D., Elbers, K., Stampa, F. (2008). Economic impact of a modified-live PRRS virus vaccine to control PRRSV in growing pigs. *Proc IPVS Cong*. Durban, South Africa. pp. 01-56.
- Scotti, M., Prieto, C., Simarro, I., Castro, J.M. (2006). Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*, 66, pp. 1884-1893.
- Shi, M., Holmes, E.C., Brar, M.S., Leung, F.C., (2013). Recombination is associated with an outbreak of novel highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in china. *J Virol*, 87, pp. 10904–10907.
- Shi, M., Lam, T., Hon, C., Hui, R., Faaberg, K., Wennblom, T., *et al.*, (2010b). Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective. *Virus Res*, 154, pp. 7-17.
- Shi, M., Lam, T.T., Hon, C.C., Murtaugh, M.P., Davies, P.R., Hui, R.K., Li, J., Wong, L.T., Yip, C.W., Jiang, J.W., Leung, F.C., (2010a). Phylogeny-based evolutionary, demographical, and geographical dissection of North American type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol*, 84, pp. 8700–8711.
- Shibata, I., Mori, M., Uruno, K. (1998). Experimental infection of maternally immune pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J Vet Med Sci* 60, pp. 1285–1291.
- Shibata, I., Yazawa, S., Ono, M., Okuda, Y. (2003). Experimental dual infection of specific pathogen-free pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies virus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50, pp. 14–19.
- Sinkora, M., Butler, J.E., Lager, K.M., Potockova, H., Sinkorova, J. (2014) Comparative lymphocyte profile and the T and B cell spectratype of germfree piglets infected with three important viruses. *Vet Res*. 4, pp. 45-91.
- Snijder, E.J., Kikkert, M., Fang, Y., (2013). Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J. Gen. Virol*, 94, pp. 2141–2163.

- Snijder, E.J., Meulenbergh, J.J. (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol*, 79, pp. 961–979.
- Snijder, E.J., Wassenaar, A.L., van Dinten, L.C., Spaan, W.J., and Gorbalenya, A.E. (1996). The arterivirus nsp4 protease is the prototype of a novel group of chymotrypsin-like enzymes, the 3Clike serine proteases. *J Biol Chem*, 271, pp. 4864–4871.
- Sørensen, K.J., Bøtner, A., Madsen, E.S., Strandbygaard, B., Nielsen, J. (1997). Evaluation of a blocking Elisa for screening of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet Microbiol*, 56, pp. 1-8.
- Spronk, G., Otake, S., Dee, S. (2010). Prevention of PRRSV infection in large breeding herds using air filtration. *Vet Rec*, 166, pp. 758–759.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., Belak, S., Drew, T.W., Pejsak, Z., (2002). Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol*, 83, pp. 1861–1873.
- Stevenson, G.W., Van Alstine, W.G., Kanitz, C.L., Keffaber, K.K. (1993). Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J Vet Diagn Invest*, 5, pp. 432–434
- Stockhofe-Zurwieden, N., Navarro Camarro, J.A., Grosse-Beilage, E., Chavez, J., Pohlenz, J. (1993). Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *Zentralbl Veterinarmed B*, 40, pp. 261–271.
- Suárez, P., Zardoya, R., Martín, M.J., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., Castro, J.M. (1996) Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res*, 42, pp.159-165
- Sun, Y., Han, M., Kim, C., Calvert, J.G., Yoo, D. (2012a). Interplay between interferon-mediated innate immunity and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Viruses*. 4, pp. 424–446.
- Sun, Y., Xue, F., Guo, Y., Ma, M., Hao, N., Zhang, X.C., Lou, Z., Li, X., and Rao, Z. (2009). Crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus leader protease Nsp1alpha. *J Virol*, 83, pp. 10931–10940.
- Sun, Z., Chen, Z., Lawson, S.R., Fang, Y. (2010). The cysteine domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 possesses deubiquitinating and interferon antagonism functions. *J Virol*. 84, pp. 7832–7846.
- Sun, Z., Li, Y., Ransburgh, R., Snijder, E.J., Fang, Y. (2012b). Nonstructural protein 2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus inhibits the antiviral function of interferon-stimulated gene 15. *J Virol*. 86, pp. 3839–3850.
- Sur, J.H., Doster, A.B., Christian, J.S., Galeota, J.A., Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Osorio, F.A. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. *J Virol*, 71, pp. 9170–9179.
- Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Evans, L.E., Landgraf, J.G., Wills, R.W., Sanderson, T.P., McGinley, M.J., Brevik, A.K., Ciszewski, D.K., and *et al.* (1994). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, pp. 1943–1948.

- Takaoka, A., Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* 8, pp. 907–922
- Tan, C., Chang, L., Shen, S., Liu, D.X., Kwang, J., (2001). Comparison of the 50 leader sequences of North American isolates of reference and field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes*, 22, pp. 209–217
- Tanaka, Y., Marusawa, H., Seno, H., Matsumoto, Y., Ueda, Y., Kodama, Y., Endo, Y., Yamauchi, J., Matsumoto, T., Takaori-Kondo, A., Ikai, I., Chiba, T., (2006). Antiviral protein APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 341, pp. 314–319.
- Terpstra, C., Wensvoort, G., Pol, J.M.A. (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet Q*, 13, pp. 131–136
- Thacker, E., Halbur, P., Ross, R., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J.(1999). *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol*, 37, pp. 620–627.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Paul, P.S., Thacker, B.J. (1998). Detection of intracellular porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in porcine macrophages by flow cytometry *J Vet Diagn Invest*, 10, pp. 308–311
- Thanawongnuwech, R., Halbur, P.G., Andrews, J.J. (1997a). Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in neurovascular lesions. *J Vet Diagn Invest* , 9, pp. 334–337.
- Thanawongnuwech, R., Suradhat, S. (2010). Taming PRRSV: Revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Res*, 154, pp. 133-140
- Thanawongnuwech, R., Thacker, E., Halbur, P. (1997b). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) (isolate ATCC VR-2385) infection on bactericidal activity of porcine pulmonary intravascular macrophages (PIMs): in vitro comparisons with pulmonary alveolar macrophages (PAMs). *Vet Immunol Immunopathol*, 59, pp. 323–335.
- Thanawongnuwech, R., Thacker, E.L., Halbur, P.G. (1998). Influence of pig age on virus titer and bactericidal activity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected pulmonary intravascular macrophages (PIMs). *Vet Microbiol* 63, pp. 177–187.
- Thomas, P., Dudley, S., Haroldson, S. (2009). A field comparison of three different PRSSV vaccines used during an acute PRRS outbreak. *Proc AASV*. Dallas, Texas. pp. 103-108.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., Gao, G.F., (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One*, 2, e526.
- Tijms, M.A., van der Meer, Y., Snijder, E.J. (2002). Nuclear localization of non-structural protein 1 and nucleocapsid protein of equine arteritis virus. *J. Gen. Virol.* 83, pp. 795–800

- Toka, F.N., Kenney, M., Golde, W.T. (2011). Rapid and transient activation of cdT cells to interferon gamma production, NK cell-like killing and antigen processing during acute virus infection. *J Immunol.* 186, pp. 4853–4861.
- Torremorell, M., Geiger, J.O., Thompson, B., Christianson, W.T. (2004). Evaluation of PRRSV outbreaks in negative herds. *Proc Congr Int Pig Vet Soc*, 1, pp.103.
- Torremorell, M., Henry, S., Christianson, W.T. (2003). Eradication using herd closure. In Zimmerman, J., Yoon, J.K., eds. *The PRRS Compendium*, (2^a ed.). Des Moines, IA: National Pork Board, pp. 157–161.
- Torremorell, M., Henry, S., Moore, C. (2000) Producing PRRSV negative herds and systems from PRRSV positive animals: the principles, the process and the achievement. *Proc AASP*. Indianapolis, Indiana. pp. 341-347.
- Torrison, J., Rossow, K., Yeske, P. (2003). Use of PRRS virus sequence information within herds. *Proc A D Lemn Conf*. pp. 46-51.
- Torrison, J., Vannier, P., Albina, E., Madec, F. Morrison, R. (1994). Incidence and clinical effect of PRRS virus in gilts on commercial swine farms. *Proc 13th Congr Int Pig Vet Soc*, p. 511.
- Truyen, U., Wilhelm, S., Genzow, M., Schagemann, G. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): a ring test performed in Germany to assess RT-PCR detection methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 53, pp. 68-74.
- van Aken, D., Snijder, E.J., and Gorbalenya, A.E. (2006a). Mutagenesis analysis of the nsp4 main proteinase reveals determinants of arterivirus replicase polyprotein autoprocessing. *J Virol*, 80, pp.3428–3437.
- van Aken, D., Zevenhoven-Dobbe, J., Gorbalenya, A.E., and Snijder, E.J. (2006b). Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7. *J Gen Virol.* 87, pp. 3473–3482.
- Van Alstine, W.G., Popielarczyk, M., Albergts, S.R. (2002). Effect of formalin fixation on the immunohistochemical detection of PRRS virus antigen in experimentally and naturally infected pigs. *J Vet Diagn Invest*, 14, pp. 504–507.
- van der Linden I, Voermans J, van der Linde-Bril E, *et al.*, (2003). Virological kinetics and immunological responses to a porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of pigs at different ages. *Vaccine*, 21, pp. 1952–1957.
- van Dinten, L.C., Rensen, S., Gorbalenya, A.E., and Snijder, E.J. (1999). Proteolytic processing of the open reading frame 1b-encoded part of arterivirus replicase is mediated by nsp4 serine protease and is essential for virus replication. *J Virol*, 73, pp. 2027–2037.
- van Dinten, L.C., Wassenaar, A.L.M., Gorbalenya, A.E., Spaan, W.J.M., Snijder, E.J., (1996). Processing of the equine arteritis virus replicase ORF1b protein: identification of cleavage products containing the putative viral polymerase and helicase domains. *J Virol*, 70, pp. 6625–6633.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2009). The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163-positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection. *Arch. Virol.* 154, pp. 1939–1943.

- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, P.L., Nauwynck, H.J. (2008). Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, pp. 2943–2953.
- van Gucht, S., van Reeth, K., Pensaert, M. (2003). Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. *J Clin Microbiol*, 41, pp. 960–966.
- van Marle, G., Dobbe, J.C., Gultyaev, A.P., Luytjes, W., Spaan, W.J., Snijder, E.J., (1999). Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96, pp. 12056–12061.
- van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M. (1996). Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet Microbiol*, 48, pp. 325–335.
- van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M. (2001). Clinical effects of experimental dual infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by swine influenza virus in conventional and colostrum-deprived pigs. *J Vet Med*, 48, pp. 283–292.
- van Vugt, J.J., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., Botner, A., (2001). High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity. *J Gen Virol*, 82, pp. 2615–2620.
- Veit, M., Matczuk, A.K., Sinhadri, B.C., Krause, E., Thaa, B. (2014). Membrane proteins of arterivirus particles: structure, topology, processing and function. *Virus Res.*, 194, pp. 16-36.
- Venteo, A., Rebollo, B., Sarraseca, J., Rodriguez, M.J., Sanz, A. (2012). A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J Virol Methods*, 181, pp. 109-113
- Vezina, S.A., Loemba, H., Foutnier, M., Dea, S., Archibault, D. (1996). Antibody production and blastogenesis response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res.* 60, pp. 94–99.
- Villarreal, L.P., Delfilippis, V.R., Gottlieb, K.A., (2000). Acute and persistent viral life strategies and their relationship to emerging diseases. *Virology*, 272, pp. 1-6.
- Vu, H.L., Kwon, B., Yoon, K.J., Laegreid, W.W., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A. (2011). Immune evasion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through glycan shielding involves both glycoprotein 5 as well as glycoprotein 3. *J Virol*, 85, pp. 5555–5564.
- Wagstrom, E.A., Chang, C.C., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (2001). Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am. J. Vet. Res.* 62, pp. 1876–1880.
- Wang, R., Nan, Y., Yu, Y., Yang, Z., Zhang, Y.J. (2013a). Variable interference with interferon signal transduction by different strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 166, pp. 493–503.

- Wang, R., Nan, Y., Yu, Y., Zhang, Y.J. (2013b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus Nsp1beta inhibits interferon-activated JAK/STAT signal transduction by inducing karyopherin α 1 degradation. *J Virol.* 87, pp. 5219–5228.
- Wensvoort, G., de Kluyver, E.P., Luitze, E.A., den Besten, A., Harris, L., Collins, J.E., Christianson, W.T., Chladek, D., (1992). Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J Vet Diagn Invest*, 4, pp. 134–138
- Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol, J.M.A., ter Laak, E.A., Bloemraad, M., de Kluyver, E.P., Kragten, C., van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsena, J.M., Moonena, P.L.J.M., Zetstra, T., de Boera, E.A., Tibbena, H.J., de Jongb, M.F., Veldc, P., Greenlandc, G.J.R., van Gennepe, J.A., Voetsd, M.T., Verheijdene, J.H.M., Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 13, pp. 121–130.
- Wernike, K., Bonilauri, P., Dauber, M., Errington, J., LeBlanc, N., Revilla-Fernández, S., Hjulsager, C., Isaksson, M., Stadejek, T., Beer, M., Hoffmann, B. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: interlaboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction detection methods. *J Vet Diagn Invest.* 24, pp. 855-866
- White, M.E.C. (1992a). The clinical signs and symptoms of blueeared pig disease (PRRS). *Pig Vet J*, 28, pp. 62–68.
- White, M.E.C. (1992b). PRRS: Clinical update. *Pig Vet J* 29, pp. 179–187.
- Wieringa, R., de Vries, A.A., van der Meulen, J., Godeke, G.J., Onderwater, J.J., van Tol, H., Koerten, H.K., Mommaas, A.M., Snijder, E.J., Rottier, P.J.M., (2004). Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. *J Virol.* 78, pp. 13019–13027.
- Wills, R., Gray, J., Fedorka-Cray, P., Yoon, K.J., Ladely, S., Zimmerman, J.J. (2000b). Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol*, 71, pp. 177–192.
- Wills, R.W., Doster, A.R., Galeota, J.A., Sur, J.H., Osorio, F.A. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Clin Microbiol*, 41, pp. 58–62.
- Wills, R.W., Osorio, F.A., Doster, A.R. (2000a). Susceptibility of selected non-swine species to infection with PRRS virus. *Proceedings of the American Association of Swine Practitioners*, pp. 411-413
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., Hoffman, L.J., McGinley, M.J., Hill, H.T., and Platt, K.B. (1997a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion. *Vet. Microbiol.* 57, pp. 69–81.
- Wills, R.W., Zimmerman, J.J., Yoon, K.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Hill, H.T., Platt, K.B., Christopher-Hennings, J., and Nelson, E.A. (1997b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55, pp. 231–240.
- Wissink, E.H., Kroese, M.V., van Wijk, H.A., Rijsewijk, F.A., Meulenber, J.J., Rottier, P. J. (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol*, 79, pp. 12495– 12506.
- Wissink, E.H.J., van Wijk, H.A.R., Kroese, M.V., Weiland, E., Meulenber, J.J., Rottier, P.J.M., van Rijn, P.A., (2003). The major envelope protein, GP5, of a European porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralization epitope in its N-terminal ectodomain. *J Gen Virol*, 84, pp. 1535–1543.

- Wootton, S., Yoo, D., (2003). Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol*, 77, pp. 4546–4557.
- Wyckoff, A.C., Henke, S.E., Campbell, T.A., Hewitt, D.G., VerCauteren, K.C., (2009). Feral swine contact with domestic swine: a serologic survey and assessment of potential for disease transmission. *J. Wildl. Dis.* 45, pp. 422–429.
- Xiao, S., Jia, J., Mo, D., Wang, Q., Qin, L., He, Z., Zhao, X., Huang, Y., Li, A., Yu, J., Niu, Y., Liu, X., Chen, Y. (2010). Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS One*, 5, pp. e11377.
- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P. (2004) The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J Virol.* 78, pp. 5923–5933.
- Yaeger MJ, Prieve T, Collins J, Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Benfield, D, (1993). Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod*, 1, pp. 7–9.
- Yaeger, M. (2002). The diagnostic sensitivity of immunohistochemistry for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lung of vaccinated and unvaccinated swine. *J Vet Diagn Invest*, 14, pp. 15–19.
- Yeske, P. (2009) Winter 2007-2008: A practitioner's experience with PRRS. *Proc AASV*. Dallas, Texas. pp. 455-457.
- Yoo, D., Song, C., Sun, Y., Du, Y., Kim, O., Liu, H.C. (2010). Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 154, pp. 48–60.
- Yoon, K.J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A. (2003). Diagnosis. In J Zimmerman, K-J Yoon, eds. *The PRRS Compendium*, (2^a ed.). Des Moines, IA: National Pork Board, pp. 59–74.
- Yoon, K.J., Wu, L.L., Zimmerman, J.J., Hill, H.T., Platt, K.B. (1996). Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol*, 9, pp. 51–63.
- Yoon, K.J., Zimmerman, J.J., Swenson, S.L., McGinley, M.J., Eernisse, K.A., Brevik, A., Rhinehart, L.L., Frey, M.L., Hill, H.T., Platt, K.B. (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J Vet Diagn Invest*, 7, pp. 305-12.
- Yoon, S.H., Kim, H., Kim, J., Lee, H.K., Park, B., Kim, H. (2013). Complete genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: perspectives on their temporal and spatial dynamics. *Mol Biol Rep*, 40, pp. 6843-6853
- Yuan, S., Murtaugh, M.P., Faaberg, K.S., (2000). Heteroclitite subgenomic RNAs are produced in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology*, 275, pp. 158–169.
- Yuan, S., Murtaugh, M.P., Schumann, F.A., Mickelson, D., Faaberg, K.S., (2004). Characterization of heteroclitite subgenomic RNAs associated with PRRSV infection. *Virus Res*, 105, pp. 75–87

- Yuan, S., Nelsen, C.J., Murtaugh, M.P., Schmitt, B.J., Faaberg, K.S., (1999). Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res*, 61, pp. 87–98,
- Yun, S.I., Lee, Y.M. (2013). Overview: replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Microbiol*, 51, pp. 711–723.
- Zhang, H., Guo, X., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., Wang, X. (2012). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates the transcription of interferon alpha/beta (IFN-alpha/beta) in monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC). *Vet Microbiol*. 159, pp. 494–498.
- Zhou, S.H., Cui, S.J., Chen, D.M., Zhang, F.C., Li, J., Zhou, S., Oh, J.S. (2009). Development and validation of an immunogold chromatographic test for on-farm detection of PRRSV. *J Virol Methods*, 160, pp. 178–184.
- Zhou, Y.J., Hao, X.F., Tian, Z.J., Tong, G.Z., Yoo, D., An, T.Q., Zhou, T., Li, G.X., Qiu, H.J., Wei, T.C., Yuan, X.F. (2008). Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transbound Emerg Dis*, 55, pp. 152–164.
- Ziebuhr, J., Snijder, E.J., and Gorbalenya, A.E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol*, 81, pp. 853–879.
- Zimmerman J.J., Karriker, A.L., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (2012). *Diseases of Swine*. In: Zimmerman, J.J., Benfield, D.A., Dee, S.A., Murtaugh, M.P., Stadejek, T., Stevenson, G.W., Torremorell, M. *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)*. (10^a ed): Wiley-Blackwell, pp. 461-486.
- Zimmerman JJ, Yoon K-J, Pirtle EC, *et al.*, (1997). Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet Microbiol*, 55, pp. 329-336
- Zimmerman, J.J. (2007) PRRS virus transmission. *Proc AASV*. Orlando, Florida. pp. 479-484
- Zuckermann, F.A., Garcia, E.A., Luque, I.D., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F. (2007). Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet Microbiol*. 123, pp. 69-85