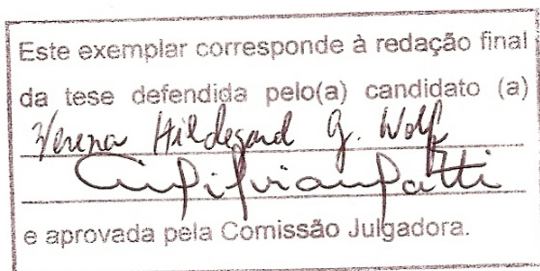


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA



Verena Hildegard Gyárfás Wolf

**PESQUISA DA PRESENÇA DE PARVOVÍRUS SUÍNO (PVS) EM
TECIDOS DE FETOS DE SUÍNOS**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual Campinas para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de concentração em Microbiologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

CAMPINAS, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

W831p

Wolf, Verena Hildegard Gyárfás

Pesquisa da presença do parvovírus suíno (PVS) em tecidos de fetos de suínos / Verena Hildegard Gyárfás Wolf. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Maria Silvia Viccari Gatti.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Feto. 2. Mortalidade fetal. 3. Aborto. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Técnicas imunoenzimáticas. I. Gatti, Maria Silvia Viccari. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Detection of porcine parvovirus (PPV) in swine fetal tissues.

Palavras-chave em inglês: Fetus; Fetal mortality; Abortion; Polymerase chain reaction; Immunoenzyme techniques.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maria Silvia Viccari Gatti, Antonio Fernando Pestana de Castro, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, José Antonio Jerez, Dagmar Ruth Stach Machado.

Data da defesa: 30/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 30 de junho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

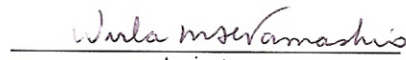
Prof(a). Dr(a) Maria Silvia Viccari Gatti


Assinatura

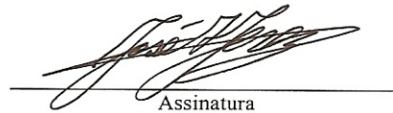
Prof. Dr. José Fernando Pestana de Castro

Assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro


Assinatura

Prof. Dr. José Antonio Jerez


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Dagmar Ruth Stach Machado


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Maria Lúcia Barbosa de Oliveira Rácz


Assinatura

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Assinatura

DEDICATÓRIAS

AOS MEUS PAIS, Thomas Gyárfás (*in memorian*),
e Irmgard Johanna Erika Gyárfás (*in memorian*),
por toda a atenção, incentivo, amor e carinho
sempre presentes.

Aos meus irmãos, Hanna, Stefan e Andreas,
que mesmo de longe, conseguiram sempre me
encorajar nesta jornada.

À minha filha Marina, pela doçura e compreensão,
mesmo com minha ausência.

Ao Rogério, que me proporcionou a valiosa
oportunidade de aprimorar
meus conhecimentos e de ser feliz.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Por abrir as portas de seu laboratório,

Por ter permitido que eu realizasse o meu sonho,

Por compreender as minhas limitações,

Pelo exemplo de dedicação e seriedade em seu trabalho e pela orientação desta tese,

...quero agradecer de forma especial à minha orientadora Profa. Maria Silvia Viccari Gatti.

AGRADECIMENTOS

...Pela força maior que consegui sentir nestes anos, DEUS.

...À Universidade Estadual de Campinas, onde realizei todas as etapas deste estudo.

...Aos meus eternos amigos do Laboratório de Virologia, Sandra, Daniele e Rovilson, pois sem as palavras de credibilidade e incentivo, este projeto não seria finalizado.

...À Ana do Laboratório de Virologia, por sua alegria de viver e respeito.

...Aos colegas do Laboratório de Virologia, Ismar e Silvério, pelas indagações e coleguismo.

...À amiga e colega Márcia Bizinotto, pelos bons momentos compartilhados, pelas angústias repartidas, pela fé na vida.

...À Profa. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IB/Unicamp, por ter me orientado na busca de respostas desde o meu primeiro momento na Unicamp.

...Ao mestre, Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, do Departamento de Genética e Evolução/IB/Unicamp, por me acolher em seu laboratório e permitir que eu desenvolvesse minhas pesquisas em virologia animal.

...À Profa. Iara Maria Silva de Luca e a sua técnica Telma Marsarioli, do Departamento de Histologia e Embriologia/IB/unicamp, pelas valiosas instruções no paciente percurso pela histologia.

...Aos Professores Paulo Pinto Joazeiro e Áureo Tatsumi Yamada, do Departamento de Histologia e Embriologia/IB/Unicamp, que me encantaram pela imunohistoquímica e a quem devo grande parte dos frutos deste trabalho. Ainda, de novo ao Prof. Paulo pelas valiosas contribuições na pré-banca.

...Ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão, do Departamento de Ciências Exatas/ ESALQ/USP, por conceder seu tempo em me auxiliar na avaliação dos nossos resultados.

...À Profa. Dra Dagmar Ruth Stach Machado, do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IB/Unicamp, por ter tornado a Imunologia ainda mais fascinante para mim.

...Aos Professores Tomomasa Yano e Domingos da Silva Leite, pelo auxílio na utilização de seus equipamentos.

...À Dra. Nilce Correa Meirelles, do Departamento de Bioquímica/IB/Unicamp, por seu afeto e atenção.

...Às colegas de profissão e da virologia animal, Regina, Renata, Lia, Maria Célia e Gonçalves, minha admiração pela escolha.

...À Profa. Clarice Weiss Arns, do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IB/Unicamp, por momentos de valioso apoio.

...À Dra. Maria Nazaré Torres Simões Lisboa, que me deu a oportunidade de admirar os suínos e buscar o bem-estar destes animais.

...À Izabel Muniz e Cristina Atanásio, colegas de desafios na suinocultura e coleta de amostras.

...À querida Cristina Durau, a quem eu tenho muito carinho e gratidão por ter convivido.

...À amiga Keila, pelo companheirismo e as muitas horas inesquecíveis de estudo para o ingresso na pós-graduação.

...À Carol, do laboratório de Genoma Funcional no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp, pois com sua agilidade e presteza, facilitou as minhas descobertas na biologia molecular.

...À Ana, do bem conhecido serviço de xérox do Instituto de Biologia, que sempre atende a todos com carinho e dedicação.

...À Janaina, moça entusiasmada e que me auxiliou muito para transpor os desafios na biologia molecular.

...À Helena Zerlotti Wolf Grotto e Cleide Zerlotti Wolf, mulheres de fibra e dignidade, às quais sempre serei grata.

...À Maria Clara do Laboratório de Virologia, pela ajuda na finalização deste projeto.

...À companheira, aluna e agora colega de profissão Nivia, por sempre buscar a harmonia e valorização de suas relações.

...Às colegas pioneiras do curso de Medicina Veterinária da Fundação de Ensino Superior de Bragança Paulista, Raquel e Ana Carla, que souberam me compreender nos momentos mais difíceis e pela amizade nestes anos.

...Às mais recentes amigas da Faculdade de Jaguariúna, Raquel, Maria Fernanda, Ana Carolina, Luis Gustavo, Carlos, Rogério, Paulo, Luciane, Karen, Alessandra, Rita, Silvana e Juliana, pelo contínuo apoio e motivação.

...Às colegas mais recentes do curso de Medicina Veterinária da Fundação de Ensino Superior de Bragança Paulista, Denise, Rita, Ana Rita e Karin pela credibilidade.

...Aos dirigentes e gestores da Faculdade de Jaguariúna e Fundação de Ensino Superior de Bragança Paulista, que na finalização deste trabalho, foram compreensivos com minhas ausências.

...À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado, e que me conduziu para o doutorado.

...À todos aqueles, que pela longa jornada na pós-graduação, mas que neste momento não estão na minha memória recente, meus agradecimentos, pois mesmo que de forma discreta, foram parte integrante na realização deste projeto e deixaram sua contribuição.

RESUMO

A qualidade reprodutiva de fêmeas de suínos é determinada pelos índices de retorno ao cio, tamanho da leitegada, abortos, natimortalidade e mumificação fetal, entre outros itens. Parvovírus suínos (PVS) pela passagem transplacentária em porcas, podem levar à morte fetos em diferentes idades gestacionais, sendo associados aos índices elevados de mumificação fetal no início da gestação quando esses não são imunocompetentes. Em estágios mais tardios da gestação, fetos imunocompetentes podem sobreviver à infecção por PVS e esses vírus são isolados de fetos abortados e natimortos. De granjas tecnificadas, com vacinação contra a parvovirose, foram coletadas amostras de 39 fetos com idade gestacional acima de 70 dias, com o objetivo de associar PVS a problemas reprodutivos de fêmeas. A imunocompetência dos fetos foi comprovada já que 93,4% deles foi positivo na inibição da hemaglutinação. Por imunoperoxidase, a proteína estrutural VP2 de PVS foi detectada por anticorpo monoclonal no citoplasma de células isoladas e individualizadas de pulmão (macrófagos alveolares), em múltiplas células do músculo cardíaco e em células estromais de timo (retículo-epiteliais), tanto de fetos natimortos como abortados. Não houve diferença estatisticamente significativa nesses achados entre fetos natimortos e abortados, mas tecidos do pulmão e do timo foram significativamente mais positivos que o coração. Por *nested*-PCR para o gene da proteína não estrutural NS-1 de PVS foram analisadas 108 amostras de tecidos de fetos natimortos, abortados e mumificados. O DNA viral foi detectado em 82,4% das amostras, sem diferença significativa para o tipo de feto, determinando que a parvovirose suína não deva ser caracterizada apenas como doença da mumificação fetal. A frequência de identificação de PVS foi maior no pulmão (96,99%) e coração (93,33%) que no baço (54,91%), rim (69,56%) e timo (66,0%). Nos fetos com morte estimada entre 70 a 99 dias de gestação a detecção por *nested*-PCR foi maior (94,76%) que naqueles com 100 ou mais dias (55,57%). Houve diferença significativa na detecção de PVS em tecidos de fetos oriundos de porcas com menor (92,28%) e maior (65,43%) número de partos, o que sugere uma maior ocorrência da transmissão transplacentária em porcas mais jovens, submetidas a um menor número de vacinações. Mesmo em animais com anticorpos o DNA viral foi detectado, mostrando que a infecção ocorreu e se manteve independente da imunocompetência do feto. Ainda, nossos dados mostram que PVS estão associados tanto com a mumificação fetal, como com abortos e natimortalidade em suínos.

Palavras chave: fetos suínos, natimortalidade, aborto, mumificação, imunoperoxidase, *nested*-PCR.

ABSTRACT

Swine female reproductive quality is mainly measured by return to estrus, litter size, abortion, stillbirth and mummies. Porcine parvovirus (PPV) transplacental infection is associated to fetal death at different gestational age, and mostly with fetal mummification due to absence of fetal immunocompetence in early pregnancy. In late gestational age, immunocompetent fetuses can survive the PPV infection and the virus may be isolated from stillbirth and aborted animals. From commercial vaccinated swine herds, thirty nine fetuses over 70 days of gestational age, so immunocompetent, were separated for analysis. The application of hemagglutination inhibition test confirm fetal immunocompetence in 93,4% of the samples. Viral antigen was detected in isolated individual cells of the lung (alveolar macrophage), in multiple myocardial cells and in stromal cells of the thymus (epithelial-reticular), by immunoperoxidase staining using an anti-VP2 monoclonal antibody. These results were observed in stillbirth and aborted fetuses. There was no statistically significant difference for PPV infection in stillbirth and aborted fetuses, but lung and thymus were significantly more positive than the heart. The presence of virus in fetal tissues was analyzed by nested-PCR assay for the NS-1 gene of PPV in stillbirth, aborted fetuses and mummies. The viral DNA was detected in 82.4% of the samples, with no significant difference in the type of fetus, determining that the porcine parvovirus should not be characterized only as a disease of fetal mummification. Using nested-PCR assay, the frequency of identification of PPV was higher in the lung (96,99%) and heart (93,33%) than in the spleen (54,91%), thymus (66,0%) and kidney (69,5%). Fetuses which death estimated age more than 100 days old were less positive to PPV and a significant difference in PVS detection was detected in tissues from fetuses from sows with lower (92.28%) and highest (65.43%) number of parturitions. This suggests for a higher susceptibility of transmission in younger sows, submitted to a fewer vaccinations. PPV DNA detection was independent of antibody presence in fetuses. Fetus immunocompetence did not prevent the infection by PPV and these viruses are associated with abortion, stillbirth and mummies.

Key words: porcine fetuses, stillbirth, abortion, mummies, immunoperoxidase, *nested-PCR*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fetos de suínos mumificados em diferentes idades gestacionais (da mesma fêmea) e um feto natimorto com aspecto normal.	34
Figura 2	Fetos de suínos natimortos de diferentes partos, com idade gestacional acima de 70 dias. Aspecto de escurecimento em três dos fetos (A, B e C) e dois fetos com aspecto normal (D e E).	34
Figura 3	Células de rim de suíno (SK-6) após 48 horas de cultivo não infectadas (A) e infectadas com parvovírus suínos (B). 40X.	52
Figura 4	Imunoeletrofotomicrografia de parvovírus suínos semi-purificados em sacarose (240.000x). Barra: 50nm.	53
Figura 5	Eletroforese em gel de 12,5% de poliacrilamida-SDS de parvovírus suíno (NADL-2) (1 e 2). PM - Padrão de Peso Molecular.....	55
Figura 6	<i>Western Blotting</i> de parvovírus suínos e marcação com anticorpo monoclonal anti-VP2 viral (67,5kDa).	55
Figura 7	Imunofluorescência em células SK-6 infectadas com PVS após 24hs de infecção (marcação nuclear) (400x) (A) e após 36hs de infecção (marcação nuclear e citoplasmática granular difusa) (500x) (B).....	57
Figura 8	Imunoperoxidase em células SK6 infectadas com PVS após 24hs de infecção, (marcação nuclear) (setas) (200x) (A) e após 36-48h de infecção (marcação nuclear e citoplasmática granular difusa) (1000x) (B). Contra coloração com Hematoxilina de Harris.....	57
Figura 9	Imunoperoxidase positiva para PVS em células isoladas no espaço alveolar (setas) de pulmão de suínos abortados com 90 dias.....	58
Figura 10	Imunoperoxidase positiva para PVS em células do músculo cardíaco (seta) de feto de suíno natimorto (A). Controle negativo da reação (B).....	59
Figura 11	Imunoperoxidase positiva para PVS em células estromais (seta) de timo de feto natimorto de suíno (400x).....	59
Figura 12	Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase para o parvovírus suíno.....	61
Figura 13	Gel de agarose a 2% da digestão enzimática com EcoRI de DNA plasmidial de amplificado de amostra de parvovírus de fetos suínos.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prova de Inibição da Hemaglutinação (IH) para a pesquisa de anticorpos anti-parvovírus suínos em amostras de líquido torácico de fetos suínos natimortos (NM), abortados (Ab) e mumificados (Mu).....	53
Tabela 2	Testes de imunoperoxidase em pulmão, coração e timo de fetos suínos natimortos e abortados, e idade fetal estimada para cada feto.....	60
Tabela 3	Testes de <i>nested</i> -PCR para o gene da proteína NS-1 de parvovírus suínos em fetos suínos e seus tecidos.....	62
Tabela 4	Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em <i>nested</i> -PCR para PVS em tecidos de fetos natimortos (NM), abortados (Ab) e mumificados (Mu).....	63
Tabela 5	Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em <i>nested</i> -PCR para PVS, em diferentes tecidos de 28 fetos de suínos.....	63
Tabela 6	Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em <i>nested</i> -PCR para PVS em tecidos fetais de suínos, em relação à idade gestacional estimada dos fetos.....	64
Tabela 7	Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em <i>nested</i> -PCR para PVS em tecidos fetais de suínos, com relação à ordem de parto das porcas.....	64
Tabela 8	Títulos de anticorpos por inibição de hemaglutinação (IH) e frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em <i>nested</i> -PCR para PVS em tecidos fetais de suínos.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação dos 39 fetos suínos quanto a sua apresentação clínica (NM=natimorto; Ab=abortado; Mu=mumificado), sua idade fetal e ordem de parto da porca.....	33
Quadro 2	Seqüências de nucleotídeos dos iniciadores para amplificação da proteína não estrutural NS-1 do parvovírus suíno (SOARES et al., 1999).....	47
Quadro 3	Alinhamento da seqüência do produto de <i>nested</i> -PCR de pulmão de feto natimorto, com amostra Kresse de PVS (programa <i>BLASTN</i> 2.2.3).....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Medidas de densidade, título hemaglutinante e concentração de proteína das frações coletadas da purificação do parvovírus suíno, por ultracentrifugação em gradiente de CsCl.....	55
-----------	---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Classificação dos 39 fetos suínos, de acordo com sua apresentação clínica.....	85
	Classificação dos 39 fetos suínos, de acordo com a idade gestacional.....	85
	Classificação dos 39 fetos suínos, de acordo com a ordem de parto das porcas.....	85
APÊNDICE B -	Número do feto de suíno e testes a que foram submetidos para a detecção de PVS (IH = Inibição da Hemaglutinação, IP = Imunoperoxidase indireta, <i>nested</i> -PCR=Reação em cadeia da polimerase).....	86
APÊNDICE C -	Títulos da prova de Inibição da Hemaglutinação (IH) em líquidos torácicos de fetos suínos.....	87
APÊNDICE D -	Resultados das Reações em Cadeia da Polimerase (primeiro ciclo de amplificação e segundo ciclo de amplificação <i>n</i> -PCR) para o gene da proteína não estrutural NS-1 de Parvovírus suíno, em amostras de tecidos de fetos de suínos.....	88
APÊNDICE E -	Artigo - Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	abortado
CsCl	cloreto de cério
DAB	diaminobenzidina
dg	decigrama
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECP	efeito citopático típico
EDTA	sal dissódico do ácido etileno-diamino tetracético
HA	hemaglutinação
IgG	imunoglobulina G
IH	inibição de hemaglutinação
IF	imunofluorescência
IP	imunoperoxidase
kDa	kilo Dalton
M	mol
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
Mu	mumificado
MVM	parvovírus murino
<i>nested</i> -PCR	reação em cadeia da polimerase
nm	nanômetro
NM	natimorto
NS-1	proteína não estrutural 1
ORF	região aberta de leitura
PBS	solução tamponada de fosfato
PCV2	circovírus suíno tipo 2
<i>PMWS</i>	<i>postweaning multisystemic wasting syndrome</i>

PRRSV	vírus da síndrome reprodutiva e respiratória do suíno
PVC	parvovírus canino
PVS	parvovírus suíno
rpm	rotações por minuto
SK-6	célula de rim de suíno
SN	sobrenadante
STB	soro fetal bovino
TCID	dose infectante em cultura de célula/volume
UHA	unidades hemaglutinante
UI	unidades internacionais
VP1	proteína estrutural 1
VP2	proteína estrutural 2
VP3	proteína estrutural 3
μL	microlitro
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVO.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Perfil das granjas selecionadas e caracterização dos fetos de suínos.	31
3.2	Coleta de amostras de líquido torácico fetal e de soros (leitões e fêmeas).....	32
3.3	Amostras de tecidos.....	35
3.4	Produção de antígeno de PVS	35
3.5	Prova de Hemaglutinação (HA).....	36
3.6	Prova de Inibição da Hemaglutinação (IH).....	37
3.6.1	Tratamento das amostras de líquidos torácicos e soros.....	37
3.6.2	Reação de Inibição da Hemaglutinação	38
3.7	Determinação do título viral em cultura celular.....	38
3.8	Semipurificação e purificação do parvovírus suíno	39
3.9	Expansão do hibridoma CRL 1745 e reatividade do anticorpo monoclonal para a proteína VP2 do PVS.....	40
3.10	Imunomicroscopia eletrônica direta.....	42
3.11	Imunocitoquímica de células SK-6 infectadas com parvovírus suíno	42
3.11.1	Imunofluorescência (IF) em células SK-6.....	42
3.11.2	Imunoperoxidase (IP) em células SK-6	43
3.12	Imunohistoquímica de tecidos fetais.....	44
3.12.1	Imunoperoxidase em tecidos fetais	45
3.13	Reação em cadeia da polimerase (<i>nested-PCR</i>).....	46
3.13.1	Extração do DNA viral.....	46
3.13.2	Reação de amplificação.....	47
3.14	Clonagem de produto de <i>nested-PCR</i>.....	48

3.14.1	Ligação e transformação.....	49
3.14.2	Extração do DNA plasmidial e digestão enzimática.....	49
3.14.3	Reação de sequenciamento.....	50
3.15	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Produção de antígeno de PVS.....	52
4.2	Pesquisa de anticorpos anti-PVS por inibição da hemaglutinação em fetos suínos.....	52
4.3	Semipurificação e purificação de PVS, caracterização da partícula viral e reatividade do Mab anti-VP2 viral.....	53
4.4	Imunocitoquímica em células SK-6.....	56
4.5	Imunohistoquímica em amostras de tecidos de fetos suínos.....	58
4.6	Reação em cadeia da polimerase	61
4.7	Clonagem e sequenciamento.....	65
5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICES.....	85

1. INTRODUÇÃO

A carne suína tem ampliado sua participação na dieta dos brasileiros, especialmente com a introdução de raças melhoradas para produção do suíno tipo carne. Essa nova posição diminui os riscos do consumo de um alimento rico em gordura, assegurado também pela introdução de técnicas de qualificação de carcaças. Os índices de produção nacional da carne suína têm apresentado elevação significativa, mais pelo aumento da produtividade do que ao alojamento de matrizes. Isso indica forte modernização do setor e trajetória de redução do rebanho de subsistência nos últimos anos. A produção industrial passou de 2,4 milhões de cabeças em 2004 para 31,8 milhões em 2007, com uma produção de carne de 3.026 mil toneladas (ABIEPCS, 2007).

É relevante também a participação da carne suína na balança comercial. Nos últimos nove anos o volume de exportação passou de 5.777 para 63.002 toneladas. Os Estados com maior participação nesse processo são Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, também pelo fato da maior tradição e concentração na produção suína ocorrer nestes Estados das regiões Sul e Sudeste (53,51%). Porém, novas regiões têm ampliado sua produção como a do Centro-Oeste, inclusive com participação nas exportações de carne suína, em especial para países da Europa, Ásia e Emirados Árabes (ABIEPCS, 2007).

Com o objetivo de contribuir para melhorar a qualidade e rentabilidade da produção suína, diversos aspectos têm sido estudados. Dentre eles, destacam-se os problemas reprodutivos manifestados clinicamente pela fêmea suína, sua relação com o sistema de manejo e características do rebanho (CLARK, 1996). Distúrbios reprodutivos em suínos são ocorrências comuns em criações comerciais em todo o mundo. Os sinais clínicos a eles associados são decorrentes de doença na porca e/ou o comprometimento do feto. As fêmeas manifestam a doença reprodutiva pela falha na concepção, reabsorção embrionária e retorno de cio, mumificação fetal, aborto em diversas fases da gestação, parto com poucos leitões (leitegadas pequenas), partos prematuros ou atrasados, presença de número excessivo de fetos natimortos, nascimento de leitões débeis e ocorrência de elevada mortalidade de leitões na maternidade (DIAL et al., 1992; CLARK, 1996).

Diversas causas são apontadas como desencadeantes de falhas reprodutivas: fatores nutricionais, comportamentais, *stress* ambiental e interferências genéticas. Estes fatores,

agrupados como relacionados ao manejo, induzem, em geral, problemas reprodutivos em proporções consideradas aceitáveis dentro da produção comercial de suínos (HEMSWORTH, BARNETT, 1990; MAHAN, 1990; DIEKMAN, GREEN, 1992; CLARK, 1996). Para a natimortalidade em suínos são apontados alguns aspectos que podem ter uma relação direta com este sinal clínico, como a duração da gestação, ordem e tamanho da leitegada, local de fixação do feto no útero e até mesmo o comprimento uterino (DIAL et al., 1992; SCHNEIDER, WENTZ, BORTOLOZZO, 2001).

No entanto, em diversas ocasiões são observadas falhas reprodutivas em frequência maior, sugerindo a presença de outro fator desencadeante ou a associação de mais de um deles. Nestes casos, como desencadeantes estariam diversos agentes infecciosos entre vírus e bactérias. Citando representantes bacterianos tem-se sorovares de *Leptospira interrogans*, *Brucella suis* e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (KIRKBRIDE, ADARAGH, 1978; BROLL et al., 1993; GENOVEZ et al., 1995). Entre os vírus, os mais encontrados são herpesvírus suíno, associados à doença de Aujeszky; cardiovírus como agente da encefalomiocardite suína (KIRKBRIDE, ADARAGH, 1978; DEA, BILODEAU, MARTINEAUS, 1991; KOENEN, VANDERHALLEN, 1997); parvovírus suíno (MENGELING et al., 1991; HUYSMAN et al., 1992; BERSANO et al., 1995) e vírus da influenza suína. Os vírus da síndrome reprodutiva e respiratória do suíno (PRRSV) e circovírus suíno tipo 2 (PCV2) também foram incluídos como sendo causadores de problemas reprodutivos (WENSVOORD et al., 1991; PLANA et al., 1992; CLARK, 1996; ALBINA, 1997; MALDONADO et al., 2005).

As fêmeas suínas manifestam as falhas reprodutivas de acordo com o tipo de agente infeccioso envolvido e com a fase do ciclo reprodutivo em que ocorre a infecção. No entanto, apesar da manifestação clínica ser um bom indicativo da presença de doença no rebanho, um mesmo sinal clínico pode ser atribuído a mais de um agente infeccioso (; HOLLER, 1994; SOBESTIANSKY et al., 1999; MALDONADO et al., 2005).

Floss (1993) relata que aproximadamente 38% dos abortos diagnosticados em suínos seriam atribuídos a causas infecciosas. Em 1978, KIRKBRIDE e ADARAGH analisando 824 casos de abortos em suínos nos Estados Unidos da América (EUA), concluíram pela participação de agentes bacterianos em 16,5% dos casos e de agentes virais em 22% deles. Destes, 4,9% foram positivos para parvovírus suíno (PVS). Posteriormente, a análise de fetos mortos de cem leitegadas também dos EUA, mostrou uma prevalência de 33% do antígeno de

PVS nos pulmões desses animais, com o uso do teste de imunofluorescência direta (MENGELING et al., 1991). Estudo etiológico realizado em fetos abortados e natimortos de criações na Suíça relata PVS em 29,2% dos casos, valor, inclusive, superior àquele por causas de origem bacteriana. Nesse caso os autores utilizaram como métodos a imunoeletromicroscopia e a detecção de anticorpos específicos ou imunofluorescência indireta (BROLL et al., 1993).

No Brasil, levantamentos epidemiológicos completos dessa natureza não estão bem estabelecidos. Porém, estima-se que a participação de agentes infecciosos em distúrbios reprodutivos seja de grande importância, merecendo, portanto, a atenção de diferentes setores ligados à saúde animal (BERSANO et al., 1993; GENOVEZ et al., 1995, SCHNEIDER, WENTZ, BORTOLOZZO, 2001).

Apesar da identificação de PVS há vários anos em criações do Brasil, para o qual é recomendado o uso rotineiro de programas vacinais nas fêmeas de criações industriais, fetos mumificados, o sinal clínico mais típico associado à parvovirose, tem ocorrências acima dos níveis considerados aceitáveis (2%) em criações tecnificadas (MENGELING, 1992; MACHUCA et al., 1999). Com relação ao aborto, onde uma frequência de até 3% é considerada aceitável, são encontrados índices mais elevados em granjas comerciais, da mesma forma que a natimortalidade acima de 5%. Por se tratar de granjas tecnificadas, estes índices sugerem a interferência de agentes infecciosos (GOUVEIA, GOMEZ, REIS, 1984; RODRIGUEZ et al., 2003).

A partir de observações pessoais baseadas na sintomatologia, aspecto dos fetos e análises de produtividade de fêmeas suínas em granjas comerciais, é objetivo deste projeto pesquisar a presença de PVS em fetos mortos, advindos de fêmeas com três tipos de falhas reprodutivas: a natimortalidade, o aborto e a mumificação.

A observação macroscópica de fetos mortos que são abortados ou expulsos no momento do parto, mostra uma ampla variabilidade, desde uma aparência normal até uma desidratação completa, conhecida como mumificação fetal (BROLL et al., 1993). Segundo Dial e colaboradores (1992), natimortos são leitões que, ainda vivos no início do parto, morrem durante o mesmo (tipo II = morte intra-parto). No entanto, para finalidade de registros em granjas de criação comercial, são apontados como natimortos também os fetos que morrem antes do parto, em geral ao redor de 90 dias da gestação (tipo I = morte pré-parto). A

caracterização anatomopatológica de fetos natimortos pode ser útil para inferir o momento de morte do feto. Alterações congestivas e hemorrágicas de órgãos e tegumento, combinado ao acúmulo de líquido avermelhado nas cavidades corpóreas e pericárdio, são freqüentemente observadas em fetos suínos abortados e natimortos, mas que raramente se correlacionam com um diagnóstico específico (JOO et al., 1977; HOLLER, 1994). Sendo assim, pela simples observação do aspecto do feto suíno morto, não é possível determinar com precisão a causa de sua morte, estando seu aspecto mais relacionado com o momento de morte intra-uterina do que com o fator teratogênico envolvido (SOBESTIANSKY et al., 1999).

A detecção, por imunodifusão, de imunoglobulinas da classe IgG nos líquidos cavitários ou em sobrenadantes de macerados de órgãos fetais de suínos acima de 70 dias, evidencia a relação entre agentes infecciosos com casos de aborto e natimortalidade (BROLL et al., 1993). Dada a placentação do tipo epiteliocorial na porca, diversas camadas epiteliais, entre a circulação materna e o feto, impedem a passagem de macromoléculas, inclusive dos anticorpos maternos. Logo, a presença de imunoglobulinas fetais em quantidades detectáveis só é possível em fetos que foram infectados e imunocompetentes, pois indicam resposta imune humoral fetal (CHANIAGO et al., 1978; GRADIL, JOO, MOLITOR, 1990). No entanto, sabe-se que essa técnica detecta anticorpos totais e não específicos a um tipo de agente. Ainda, casos de infecção intra-útero, antes do período de imunocompetência (ao redor de 70 dias) podem não ser revelados. Assim, a identificação do agente infeccioso por testes específicos torna-se importante, não só pela variabilidade dos patógenos envolvidos em problemas reprodutivos, como também por seus diferentes padrões de virulência, como demonstrado para PVS e outros agentes (MENGELING; CUTLIP, 1976; MENGELING, LAGER, VORWALD, 1994; WILHELM et al., 2005). Além do mais, medidas de controle das doenças devem ser específicas e, se possível, prontamente introduzidas no rebanho para evitar a disseminação e perdas econômicas de grande extensão.

PVS têm diâmetro aproximado de 20nm e simetria icosaédrica. São vírus não envelopados com peso molecular total de $5,3 \times 10^6$ daltons. Incluídos na família *Parvoviridae*, subfamília *Parvovirinae*, fazem parte do gênero *Parvovirus*, que inclui vírus que infectam mamíferos e aves, sendo em geral, espécie-específicos. As partículas virais são compostas por proteínas (60 subunidades) e DNA de fita simples, com aproximadamente 5,0Kb. As proteínas

estruturais a eles associadas são VP1 (83kDa), VP2 (64kDa) e VP3 (60kDa) (MOLITOR, JOO, COLLETT, 1983), essa última originada da clivagem proteolítica de vinte resíduos da região aminoterminal da VP2. Cada vírion contém poucas subunidades de VP1, sendo a VP2 e VP3 as proteínas predominantes. A simplicidade estrutural e ausência de envoltório e constituintes lipídicos contribuem para a alta resistência destes vírus à inativação pelo éter e clorofórmio; sua estabilidade em pH 3 a 9 e a 56°C por 60 minutos. Essas características fazem dos PVS um dos vírus mais resistentes quando fora de seus hospedeiros (FIELDS et al., 1996).

As densidades em cloreto de cézio da partícula viral são de 1,38 a 1,395g/ml (partículas, completas) ou de 1,30g/ml (partículas incompletas). Há similaridades e diferenças quanto a concentração de cada proteína estrutural nessas partículas, com VP1 equivalendo a aproximadamente 10% do total da partícula viral tanto em partículas completas como nas incompletas, VP2 como proteína *major* em partículas incompletas e partículas de densidade 1,39g/ml a VP3 é predominante (MOLITOR; JOO; COLLETT, 1983). Em gradiente de sacarose PVS apresentam densidade de 110 - 122 g/ml (FIELDS et al., 1996).

PVS também codificam uma proteína não estrutural, denominada NS-1, de aproximadamente 84kDa, com provável atividade sobre a replicação e regulação para o início da transcrição viral (FIELDS et al., 1996), atuando na ligação covalente e não-covalente ao DNA como helicase, endonuclease de sítio específico, ATPase, além de outras funções. Sítios de afinidade da NS-1 têm sido identificados ao longo do genoma viral, em particular nas regiões de origem da transcrição (*ori*). Um efeito citotóxico da NS-1 é atribuído aos parvovírus autônomos, sendo que a atividade desta proteína parece estar, pelo menos em parte, relacionada com esse efeito (VANACKER; ROMMELAERE, 1995).

Estudos da organização genômica de PVS revelaram duas regiões de leitura abertas (ORF) que praticamente se estendem por todo o genoma viral. A ORF da terminação 5' codifica a proteína não estrutural NS1 e a outra para as proteínas VP1 e VP2 do capsídeo viral (RANZ et al., 1989). Há alto grau de identidade nos genomas de cepas de PVS com diferentes graus de patogenicidade, como as amostras Kresse e NADL-2. Contudo, em PVS isolados de casos de falhas reprodutivas foram identificadas diferenças nas regiões codificadoras das proteínas VP1 e VP2 quando comparadas à amostra NADL-2, comumente utilizada como antígeno vacinal (MENGELING; CUTLIP, 1976; BERGERON; HÉBERT; TIJSEN, 1996). O

seqüenciamento parcial do gene da proteína VP2 revelou variabilidade genética entre isolados de PVS (SOARES et al., 2003).

Apesar da alta proximidade genotípica das amostras virulentas e avirulentas de PVS, esses vírus são divididos, quanto à sua patogenicidade, em quatro grupos distintos: não patogênicos (representados pelas cepas NADL-2 e KBSH), patogênicos para fetos não imunocompetentes e levando-os à morte (cepas NADL-8, e IAF-76), patogênicos para fetos imunocompetentes, causando também dermatite (cepa Kresse - altamente patogênica, IAF-A54) e amostras entéricas (MENGELING, PEJSAK, PAUL, 1984; KRESSE et al., 1985; HERBERT et al, 1996). Há estudos, porém, que caracterizam a cepa NADL-8 como de alta virulência (LAGER, MENGELING, LIU, 1992), o que pode significar alterações do perfil anteriormente manifestado pelos parvovírus em suínos, como já descrito para outros parvovírus infectando outras espécies animais.

Com exceção de algumas amostras entéricas isoladas de fezes de suínos no Japão, diferenças antigênicas não foram detectadas entre amostras de PVS, quando se utilizou antissoros policlonais homólogos e heterólogos (FIELDS et al., 1996). Recentemente, a atividade neutralizante de anticorpos de fêmeas de suínos infectadas com cepas virulentas e cepas vacinais, foi observada perante cepas vacinais, mas não contra todas as cepas virulentas, o que sugere a existência de uma nova variante antigênica, ou tipo viral (ZEEUW et al., 2007). A mesma cepa de vírus, quando analisada a seqüência de aminoácidos de sua proteína VP1, mostrou ser uma nova linhagem (ZIMMERMANN et al., 2006).

A replicação e montagem de PVS ocorrem no núcleo das células infectadas, sendo que há requerimento por células em atividade mitótica, pois requerem enzimas celulares da fase S tardia do ciclo celular para sua replicação. Essa característica pode ser a responsável pelas severas alterações e danos celulares observados quando de infecções intrauterinas. Como consequência de seu restrito requerimento celular, esses vírus têm, em geral, limitado espectro de alvos celulares, e baixa atividade patogênica em animais adultos (MENGELING, 1992).

Quando PVS são inoculados em sistemas *in vitro* induzem um efeito citopático (ECP) com picnose e lise celular. Culturas primárias e secundárias de células de rim de fetos ou neonatos de suínos são usadas com maior freqüência no cultivo desses vírus, como as linhagens PK15 e SK6. Porém, outras linhagens celulares como de testículo de suíno (ST) e de trompa de Falópio (PFT), podem ser utilizadas (MENGELING, 1975; BERSANO et al, 1995).

A infecção transplacentária por PVS pode ocorrer já no início do período gestacional (MENGELING, 1975). Em porcas infectadas por via oral, esses vírus levam de 23 a 32 dias para atravessarem a placenta (JOO, DONALDSON-WOOD, JOHNSON, 1976a). Em marrãs expostas a PVS pelas vias intranasal e oral, para verificar a infecção transplacentária e sua consequência nos fetos, vírus e antígeno viral foram detectados em embriões de fêmeas necropsiadas 21-23 dias após a exposição, indicando a passagem transplacentária já com menos de 20 dias (MENGELING, PAUL, BROWN, 1980).

Apesar de seu poder patogênico em suínos estar limitado a embriões e fetos, a infecção pelo PVS em fêmeas gestantes pode apresentar variações quanto à manifestação clínica, na dependência do período gestacional (dias) em que ocorrer a infecção primária. Assim, quando ela se dá no início da gestação, ocorre morte com reabsorção fetal. Em infecções mais tardias (terço médio da gestação, ao redor de 35 a 75 dias) tem-se a mumificação dos fetos. Fetos imunocompetentes (acima de 70 dias) apresentam grande variabilidade quanto a manifestação clínica, na dependência da virulência da amostra, podendo ocorrer a morte antes do parto ou os animais nascerem normais, porém débeis e sorologicamente positivos para PVS (MENGELING, CUTLIP, 1975; MENGELING, 1992). Assim, considerando-se todo o rebanho de fêmeas de granjas comerciais, é possível a ocorrência simultânea de mais de um dos sinais clínicos relacionados a problemas reprodutivos associados apenas a parvovírus. A imunotolerância de fetos aos PVS, quando a infecção se dá antes de sua imunocompetência, poderia levar a uma infecção persistente. Em tecidos de fetos infectados com amostra virulenta ao redor dos oitenta dias de gestação, detecta-se o DNA viral por hibridização *in situ*, mesmo na presença de anticorpos (LIEBERMANN et al., 1988; GRADIL, JOO, MOLITOR, 1990).

Infecções em cachacos e em fêmeas não prenhes em geral não causam sinais clínicos. Porém, estes animais são também responsáveis pela circulação dos vírus na granja. Na epizootiologia da parvovirose são consideradas como vias de eliminação, além do feto propriamente dito, as fezes, urina, secreções e saliva dos animais infectados (LIEBERMANN et al., 1988), além do sêmen (GRADIL et al., 1990). As vias de transmissão mais comuns são a oronasal e a transplacentária e PVS mantém sua infectividade por meses em secreções e excretas de animais com infecção aguda (BROWN, PAUL, MENGELING, 1980; MENGELING, 1992). Acredita-se que utensílios e ambientes contaminados por PVS são de importância na sua manutenção e transmissão, dada sua alta estabilidade. Apesar de todos os

animais de um rebanho serem suscetíveis à infecção com PVS, fêmeas e machos jovens são apontados como os mais sensíveis e o distúrbio reprodutivo acaba por ser mais evidenciado pelas marrãs (LIEBERMANN et al., 1988; OBALDIA, 1991; HUYSMAN et al., 1992).

PVS têm sido isolados de diversos tecidos de animais infectados, com maior frequência para pulmões e tecidos linfóides de fetos mumificados (MOLITOR, JOO, COLLETT, 1983; BERSANO et al., 1995). O tecido pulmonar tem sido o de escolha para análises pelo fato de ser facilmente coletado, mesmo de fetos mumificados, como também por apresentar menor auto-fluorescência, quando examinado por testes de fluorescência (MENGELING, 1992). Porém, outros tecidos devem ser explorados nas pesquisas do antígeno viral, pois contêm tanto quanto, ou mais vírus que o pulmão, logo após a exposição do animal. Acredita-se, inclusive, que a morte fetal seja consequência da ampla disseminação dos vírus no organismo (MENGELING, CUTLIP, 1976; WILHELM et al., 2005). De lesões de pele e fezes diarréicas de suínos também foram isolados PVS (KRESSE et al., 1985; CHOI et al., 1987).

Estudos das alterações histomorfológicas em tecidos podem ser feitos em fetos em bom estado de conservação, preferencialmente naqueles com mais de 60 dias de gestação. Mesmo não representando alterações patognomônicas, no caso de animais positivos para PVS o achado histomorfológico mais frequente é o infiltrado linfoplasmocitário, tanto em rim, como em cérebro e miocárdio. Também é digno de nota, a presença de células de citoplasma amplo no pulmão, possivelmente oriundas da descamação epitelial nos alvéolos ou representando macrófagos residentes (BROLL et al., 1993; BANKS, 1993).

Casos de miocardite não supurativa em leitões foram associados a infecções por PVS em exame de miocárdios com lesão inflamatória testados por hibridização *in situ* (BOLT et al., 1997). A infecção cardíaca pode ter relação com o nascimento de leitões débeis.

Testes de imunofluorescência têm sido usados tanto em estudos do processo de replicação dos PVS em cultivos celulares, como para identificar células infectadas em pulmão de fetos (LUCAS, NAPTHINE, 1971). Esses vírus hemaglutinam eritrócitos de diferentes espécies animais (homem, cobaio, camundongo, rato, gato, aves e macaco, mas o teste de hemaglutinação (HA) com hemácias de cobaio é o mais usado na pesquisa de PVS em fetos (JOO, DONALDSON-WOOD, JOHNSON, 1976b; MENGELING, 1992; CAPPELLARO et al., 1995). Testes imunoenzimáticos tem sido indicados para a detecção de PVS em tecidos fetais e comparações com testes de imunofluorescência direta e testes de hemaglutinação

mostraram sua superioridade em termos de especificidade e sensibilidade (JENKINS, 1992). Os testes imunoenzimáticos também foram empregados, com bons resultados, tanto na detecção de anticorpos em animais adultos logo após a infecção (aproximadamente 5 dias), na avaliação do aumento no título de anticorpos, quando são comparados soros pareados. Esses testes apresentam sensibilidade equivalente à inibição da hemaglutinação (IH) (WESTENBRINK, VELDHUIS, BRINKHOF, 1989).

A utilização de testes sorológicos para pesquisa de anticorpos específicos para PVS é prática comum em fêmeas de granjas de suínos no Brasil, com os objetivos de detectar e/ou quantificar a imunidade humoral, estudar sua disseminação, além do monitoramento sorológico de um rebanho (RODRIGUEZ et al., 2003). O tipo de teste mais utilizado é a IH, apesar da soroneutralização (SN) apresentar maior sensibilidade (JOO; DONALDSON-WOOD, JOHNSON, 1976c). Em estudo com 608 soros de fêmeas não vacinadas realizado no Estado de Minas Gerais em 1982, a IH identificou 55,3% das amostras com anticorpos para PVS. Neste mesmo trabalho os autores mostram também uma correlação de 78,1% entre a presença de anticorpos e o relato de sinais clínicos associados a problemas reprodutivos (mumificação fetal, retorno de cio e leitegadas pequenas em número) (GOUVEIA, GOMEZ, REIS, 1984). Bersano e colaboradores em 1993, também relatam a detecção de anticorpos para PVS em 96,12% das porcas examinadas em 25 granjas do Estado de São Paulo sem histórico de vacinação. Contudo, em rebanhos onde é praticada a vacinação, a IH não é eficaz na diferenciação de anticorpos vacinais daqueles oriundos da infecção. Já o uso da proteína recombinante não estrutural NS1 de PVS em testes imunoenzimáticos, permite essa diferenciação, por reagir apenas com anticorpos gerados em animais naturalmente infectados (QING et al., 2006).

Técnicas imunohistoquímicas utilizando anticorpos monoclonais são altamente específicas e, além de permitirem a detecção do antígeno viral em tecidos fixados e processados adequadamente, permitem a observação de alterações histológicas decorrentes da infecção viral (KATZ, DEUSEN, 1985). Algumas destas técnicas também possibilitam levantamentos retrospectivos (BOURNE, 1983). Sua aplicação em tecidos fixados advindos de fetos abortados e natimortos de suínos e de outras espécies animais, já mostrou bons resultados (SCHULTHEISS, COLLINS, CARMAN, 1993; LAROCHELLE, MAGAR, 1995).

A partir de 1991, testes por reações em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores para a região codificadora da VP2 de PVS, tanto em cultivos celulares como em tecidos de fetos experimentalmente infectados, foram estabelecidos (MOLITOR et al., 1991). No Brasil, o uso dessa metodologia já foi relatada, utilizando oligonucleotídeos similares em células SK6 infectadas por PVS (CARLAN, ROEHE, OLIVEIRA, 1997). Posteriormente, foi aplicada uma *nested-PCR*, desenvolvida com iniciadores direcionados para a amplificação do gene da proteína NS1, mais conservada entre os diferentes PVS, que foi eficaz na detecção do genoma viral em diferentes tecidos de fetos (SOARES et al., 1999).

Até recentemente, dado o reconhecimento do envolvimento de PVS em fêmeas gestantes e seus problemas reprodutivos, muitas investigações centravam-se na detecção desses vírus. Porém, pesquisas envolvendo circovírus cuíno tipo 2 (PCV2) associados com a Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado – *Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)*, demonstram a presença tanto desses vírus como também dos PVS em vários casos clínicos de campo. Nesses casos, a confirmação se deu tanto pelo isolamento dos dois vírus, como também por imunohistoquímica (ELLIS, KEAKOWKA, LAIRMORE, 1999). A reprodução experimental da PMWS pela infecção isolada de PCV2 e pela co-infecção PCV2 e PVS, apresenta uma maior severidade em animais infectados com os dois vírus (ALLAN et al., 1999). Em outra investigação, PVS associados ou não a PCV2, estavam presentes em amostras de rim de suínos de abate, com e sem lesão de nefrite intersticial multifocal (DROLET et al., 2002). O PCV2 também está associado a problemas reprodutivos, com prevalência de 27% em fetos abortados, natimortos, mumificados e leitões neonatos sem vitalidade (RITZMANN et al., 2005).

O controle de doenças em suínos é fundamental para a produtividade dos rebanhos, redução dos custos de produção e qualidade de seus produtos e, conseqüentemente, lucratividade na pecuária, principalmente dentro do processo de globalização dos mercados internacionais, que vem substituindo as barreiras alfandegárias pelas sanitárias.

Estudos que definam nos rebanhos brasileiros a relação de PVS com problemas reprodutivos em granjas de criações comerciais se fazem necessários, para definir por ações de controle que viessem a minimizar as perdas advindas desta infecção.

2. OBJETIVO

Verificar a presença de PVS em fetos de suínos de criações comerciais, associada a problemas reprodutivos como natimortalidade, aborto e mumificação.

Para isso, foram adotadas as seguintes estratégias metodológicas:

- Detectar anticorpos anti-PVS pela inibição da hemaglutinação em líquidos torácicos;
- Em cortes de pulmão, coração e timo detectar a proteína VP2 de PVS por imunohistoquímica;
- Detectar o genoma de PVS em tecidos fetais como pulmão, coração, baço, timo e rim por *nested*-PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Perfil das granjas selecionadas e caracterização dos fetos de suínos

Foram selecionadas 15 granjas comerciais de criação de suínos com rebanhos de fêmeas de no mínimo 200 animais em produção, na maioria com um número superior a 500 animais. Em todas as granjas os animais eram híbridos de raças européias (Large White, Landrace, Yorkshire), criados em sistema confinado, recebendo arraçamento controlado. O manejo incluía o sistema “tudo dentro tudo fora” (*all-in all-out*), com o desmame dos leitões ocorrendo com 18-21 dias e inseminação artificial. Todas tinham um bom controle sanitário, com vacinação das fêmeas para diversos agentes bacterianos e virais, incluindo aqueles relacionados com problemas reprodutivos e eram negativas para a Doença de Aujeszky. Os esquemas de vacinação seguiam a recomendação dos fabricantes.

As granjas, no entanto, apresentavam alterações em pelo menos um dos parâmetros usados para avaliar a qualidade reprodutiva das fêmeas, isto é: 1. retorno de cio acima de 10%; 2. leitegadas com menos de 10 leitões nascidos vivos; 3. natimortalidade acima de 5%; 4. ocorrência de fetos mumificados acima de 2% e/ou, 5. índice de aborto acima de 3%. Também foram consideradas, em alguns casos, por apresentarem partos atrasados, ou seja, além da data prevista de 114 ± 2 dias de gestação.

No total foram incluídos no estudo 39 fetos mortos, individualizados, mesmo que originários da mesma criação e de uma mesma fêmea em partos distintos. Os fetos eram provenientes de 15 criações diferentes, sendo oito do Estado de São Paulo, quatro do Estado de Minas Gerais e três do Estado do Paraná.

Os fetos foram observados quanto ao seu aspecto geral externo e foram medidos da base da cauda até a inserção da cabeça (*crown-rump measure*), pela curvatura espinal, para estimativa da idade fetal. Fetos com malformações, raramente observados, foram descartados do estudo.

Para a classificação dos fetos foram utilizados parâmetros visuais: fetos com desidratação e enegrecimento generalizado foram considerados como tipicamente

mumificados (Mu) (Figura 1). Fetos natimortos (NM) apresentavam-se normais ou edemaciados e parcialmente escurecidos; nestes, um acúmulo de líquido avermelhado nas cavidades corpóreas era evidente, tanto na cavidade torácica como abdominal (Figura 2). Fetos abortados (Ab) foram aqueles que não apresentaram alteração visível após a expulsão. Além disso, foi observada a ordem de parto da porca para cada feto, considerando-se duas classes: porcas com até três partos e com quatro ou mais partos.

Para a realização das análises estatísticas, os fetos foram agrupados de acordo com três critérios (APÊNDICE A):

1. apresentação clínica (NM, Ab, Mu);
2. idade gestacional estimada do feto (grupo A = fetos com 70 a 99 dias, e grupo B = fetos com 100 ou mais dias);
3. ordem do parto da porca (grupo J = porcas com 1 a 3 partos, e grupo V = porcas com 4 ou mais partos).

3.2 Coleta de amostras de líquido torácico fetal e de soros (leitões e fêmeas)

Foram coletados os conteúdos totais dos líquidos fetais encontrados no tórax de 30 fetos. Os líquidos foram clarificados por centrifugação a 3500 rpm (*Eppendorf* 5402 rotor F45-18-11) por 5 minutos a 4°C e armazenados a - 20°C até o momento de uso nos testes de Inibição de Hemaglutinação (IH).

Também foi coletado sangue por venipunção da jugular de leitões recém-nascidos que não mamaram o colostro, e de fêmeas adultas vacinadas para PVS, para controle dos ensaios. Após formação do coágulo e centrifugação a 2000 rpm (*Eppendorf* 5402 rotor F45-18-11) por 5 minutos a 4°C, os soros foram armazenados a - 20°C até o momento de uso nos testes de IH.

Quadro 1: Caracterização de 39 fetos suínos quanto a sua apresentação clínica (NM = natimorto; Ab = abortado; Mu = mumificado), sua idade fetal (dias) e ordem de parto da porca. Campinas, 2008.

Número Feto	Apresentação (feto)	Idade fetal (dias)	Ordem de parto (porca)
1	NM	100	6
2	Mu	*	1
3	NM	*	1
4	NM	*	5
5	NM	100	5
6	NM	105	4
7	Mu	81	4
8	Ab	75	5
9	Ab	90	5
10	Ab	90	4
11	Ab	90	5
12	NM	110	8
13	NM	80	5
14	NM	90	7
15	Ab	80	3
16	NM	90	3
17	NM	90	5
18	Ab	90	6
19	Ab	87	6
20	Ab	78	4
21	NM	80	3
22	NM	90	3
23	NM	100	3
24	Mu	70	*
25	NM	93	*
26	NM	93	3
27	Mu	87	3
28	Mu	81	4
29	NM	114	2
30	Mu	80	2
31	NM	105	1
32	NM	90	1
33	NM	96	5
34	NM	84	3
35	Ab	87	3
36	Ab	72	3
37	NM	102	6
38	NM	102	6
39	Mu	70	3

* = dado não obtido ou desconhecido



Figura 1: Fetos de suínos mumificados em diferentes idades gestacionais (da mesma fêmea) e um feto natimorto com aspecto normal (Campinas, 2008).

A B C D E



Figura 2: Fetos de suínos natimortos de diferentes partos, com idade gestacional acima de 70 dias. Aspecto de escurecimento em três dos fetos (A,B e C) e dois fetos com aspecto normal (D e E) (Campinas, 2008).

3.3 Amostras de tecidos

Fragmentos de timo, coração, pulmão, baço e rim, coletados em cortes com medida mínima de 0,5 cm de espessura e máxima de 1 cm, foram fixados em formaldeído tamponado a 10 %. Após imersão em fixador por 18-24 horas, em volume de 10x o volume do tecido, foram lavados em água corrente por várias vezes para retirada do fixador e colocadas em álcool etílico 70°GL até o processo de inclusão em parafina.

Fragmentos de mesma origem também foram submetidos a congelamento rápido em nitrogênio líquido, em microtubos criogênicos, livres de pirogênio, RNase e DNase. Após o congelamento estes foram armazenados a -70°C até o momento da extração do DNA viral e reação em cadeia da polimerase (*nested*-PCR).

3.4 Produção de antígeno de PVS (BERSANO et al., 1995)

Para a produção do antígeno viral foi utilizada a cepa padrão de PVS NADL-2, adquirida da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Concórdia, SC.

A linhagem celular utilizada para a propagação de PVS foi a SK-6 (*swine kidney cells*) mantida em meio de cultura Eagle MEM, acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10% e suspensão de antibióticos (1.000 UI de penicilina e 1000 mg de estreptomicina, para cada 100ml de meio de cultura, equivalendo a 1% do meio final). Em todas as etapas estas células foram incubadas em estufa úmida a 37 C, com umidade regulada em 85% e gás carbônico a 5%. Sub-culturas da linhagem celular foram obtidas pela dissociação das monocamadas com confluência de 90-100% com tripsina-versene.

Monocamadas semiconfluentes de SK6 (próximas a 70%) inoculadas com 100TCID₅₀ do inóculo viral foram mantidas por 3 horas em estufa úmida a 37 C, com agitações periódicas. Após descartar o inóculo acrescentou-se meio de manutenção (Eagle MEM com 2% de SFB), mantendo-se as condições de cultivo já citadas. Por microscopia de luz invertida e quando da presença do efeito citopático típico (ECP) para PVS (arredondamento e

desprendimento celular) em 40-50% das células, procedeu-se à tripsinização da monocamada e o conteúdo celular foi distribuído em duas garrafas de mesmo volume, acertando-se o volume final com Eagle MEM com 5% de soro fetal bovino e solução a 1% de antibióticos. Após mais dois dias de cultivo e a observação de destruição de no mínimo 80% da monocamada celular, as garrafas foram congeladas e descongeladas por três vezes. O conteúdo total foi centrifugado por 10 minutos a 8,000 xg a 4 °C (Hitachi CF 15D2, rotor RT15A6) e o sobrenadante resultante foi armazenado a -20°C. Uma alíquota foi titulada por hemaglutinação (HA), com resultado de 1:512.

3.5 Prova de Hemaglutinação (HA) (JOO; DONALDSON-WOOD; JOHNSON, 1976b)

A técnica de HA foi utilizada para a titulação do sobrenadante de células SK6 infectadas com PVS e para a sua quantificação viral nos processos de purificação e semipurificação.

O sangue de cobaio foi obtido por punção cardíaca e armazenado a 5° C em frasco contendo solução de Alsever.

Em microplacas de 96 poços de fundo em “U”, foram adicionados 50µl por poço das diluições seriadas dos vírus (1:2 até 1:4096 em PBS 0,01M pH 7,4). Igual volume de hemácias de cobaio, lavada por três vezes em PBS e diluídas a 0,8%, foi adicionado a cada poço. Após 60 minutos em temperatura ambiente título hemaglutinante foi determinado como o inverso da maior diluição capaz de produzir a completa aglutinação dos eritrócitos de cobaio.

3.6 Prova de Inibição da Hemaglutinação (IH)

O teste de Inibição da Hemaglutinação (IH) foi aplicado nos líquidos torácicos dos fetos, com a finalidade de pesquisar a presença de anticorpos para PVS. Para essa prova foram utilizadas quatro unidades hemaglutinantes (4UHA).

A suspensão de eritrócitos foi preparada da mesma maneira que para a prova de HA.

3.6.1 Tratamento das amostras de líquidos torácicos e soros

Os líquidos torácicos fetais e os soros, em volumes de 200µl, foram inativados em banho-maria a 56 C durante 30 minutos. Para os líquidos torácicos seguiu-se com a adição de 200µl de suspensão de eritrócitos de cobaia a 10%. Após agitação leve, a mistura permaneceu por 4 horas a 4 C, sendo periodicamente homogeneizada. A suspensão foi centrifugada a 6,000 xg a 4 C (*Eppendorf* 5402 rotor F45-18-11) por 10 minutos e o sobrenadante separado para o teste de IH. As amostras foram considerados como diluídas a 1:2.

A volumes de 100µl dos soros de leitões recém-nascidos e de fêmeas vacinadas para o PVS (controle positivo), foram acrescidos 800µl de suspensão de Kaolin a 25% (diluído em PBS 0,01M pH 7,4), para remoção de auto-hemoaglutininas e inibidores inespecíficos da aglutinação. Durante a incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi agitada com vigor a cada dez minutos. Seguiu-se com centrifugação a 6,000 xg por 10 minutos, para então acrescentar ao sobrenadante 100µl de suspensão de eritrócitos de cobaia a 10%. Após agitação leve, seguiu-se o descrito para os líquidos torácicos. Estes soros foram considerados como diluídos a 1:10.

3.6.2 Reação de Inibição da Hemaglutinação (GOUVEIA; GOMEZ; REIS, 1984)

A prova de IH foi realizada em placas de microtitulação de fundo em “U”. Aos líquidos torácicos e soros diluídos de 1:2 a 1:1024 foram acrescentados 4UHA do antígeno hemaglutinante e suspensão de eritrócitos de cobaia a 0,8%. Soro de referência positivo (fêmeas vacinadas para PVS) e soro de referência negativo (leitões recém-nascidos desprovidos de colostro), como também o antígeno de 4UHA, foram testados ao mesmo tempo. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

Considerou-se o título inibidor da hemaglutinação como sendo a maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação dos vírus aos eritrócitos de cobaia.

3.7 Determinação do título viral em cultura celular

Suspensão de PVS obtidos como descrito em 3.4., com título hemaglutinante de 1:512 foi escolhida para estes ensaios. A mesma foi diluída na razão 10, a partir de 1:10 em Eagle MEM.

Suspensão de células SK6, contendo 2×10^5 células por ml em meio Eagle MEM com 10% de SFB e antibióticos foi distribuída (um ml) em placas de 24 poços. Após 6 horas de incubação a 37°C, e uma monocamada celular semiconfluente ($\pm 70\%$), as células não aderidas foram retiradas por lavagem tripla com PBS 0,01M pH 7,4. Em cada quatro concavidades acrescentou-se 200ul de cada diluição da suspensão viral, mantendo-se poços como controle do ensaio. Após 3 horas de incubação, o inóculo foi descartado e em todos os poços adicionou-se Eagle MEM com 5% de SFB e antibióticos. As placas foram incubadas nas mesmas condições e a cada 12 horas as monocamadas foram observadas por microscopia de luz invertida. Após 48 horas e com ECP de pelo menos 50% em duas diluições, o resultado foi anotado e o teste interrompido.

Aplicando a fórmula do método de Spearman-Kärber foi calculada a diluição de vírus que quando inoculada em quantidade de 200ul por poço, causaria efeito citopático em 50% das células. O resultado obtido foi $1TCID_{50} = 10^{2,5} / 200ul$.

Esta suspensão viral foi utilizada nos testes de imunocitoquímica com o anticorpo monoclonal CRL1745 para a proteína VP2 do PVS (item 3.11).

3.8 Semipurificação e purificação do parvovírus suíno

Sobrenadantes de células SK6 infectadas com PVS, e com título hemaglutinante de no mínimo 1:64, foram submetidos a uma etapa de concentração com cloreto de cálcio na concentração final de 50mM, após alcalinização da suspensão até pH 8,5 com Tris (Hidroximetil Amino Metano) (MOLITOR; JOO; COLLETT, 1983). A mistura foi mantida sob agitação lenta por 14-16 horas a 4°C e em seguida foi centrifugada a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C (Hitachi rotor RT15A6). O precipitado obtido foi ressuspenso com 1ml de Tampão TE (Tris 50mM.EDTA, 25mM, pH 8,7) e em seguida sonicado, em amplitude de 50% e realizando três ciclos com pulso de três segundos e parada de cinco segundos. Após nova centrifugação a 3000 rpm por um minuto a 4°C (*Eppendorf* 5402 em rotor F45-18-11), o sobrenadante foi armazenado a -20°C até que fosse realizada a ultracentrifugação em cloreto de cézio ou sacarose.

Para a semipurificação o concentrado de vírus (1ml) foi colocado sobre suspensões de 40% (2ml) e 20% (6ml) de sacarose preparada em Tris Cálcio (Tris 100mM.CaCl² 1,5mM pH 7,4). Após ultracentrifugação a 274,355 xg (*Beckmann L8-80M* rotor SW41 Ti).a 4°C por 16 horas o precipitado foi ressuspenso em 250ul de PBS 0,01M pH 7,2 e dialisado por 16 horas no mesmo tampão a 4°C, sob agitação. Para a purificação esse concentrado foi misturado a uma solução de cloreto de cézio de densidade 1,40g/ml, ajustada para uma densidade final de 1,32g/ml. A solução foi submetida a ultracentrifugação por 18 horas a 182.000 x, a 4°C (*Beckmann L8-80M* rotor SW41 Ti) e em seguida o conteúdo total (10ml) foi coletado em frações de aproximadamente 0,5ml, com auxílio de seringa de vidro. As frações foram

submetidas à pesagem tripla para determinação de suas densidades. Confirmada a formação de gradiente, as frações foram dialisadas em tampão TE a 4°C sob agitação por 16 horas.

O precipitado da semipurificação e cada fração da purificação foram analisados por HA e suas concentrações protéicas foram estimadas em espectrofotômetro (*Beckmann DU-600*) a 260 e 280nm (KALCKAR, 1947).

3.9 Expansão do hibridoma CRL 1745 e reatividade do anticorpo monoclonal (Mab) para a proteína VP2 de PVS

A expansão do hibridoma de código CRL 1745, depositado na ATCC (*American Type Cell Culture*) e desenvolvido pelos pesquisadores KATZ e DEUSEN, 1985, foi feita em camundongos Balb/c com 87 dias de idade (CEMIB/Unicamp). Reação inflamatória prévia na cavidade abdominal foi obtida pela aplicação de óleo mineral (Nujol). O hibridoma foi descongelado e suspenso em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino e incubado em estufa úmida a 84%, 5% de CO₂ e 37°C por dois dias. Por via intraperitoneal 0,5 x 10⁶ células/ml foram aplicadas (0,5 ml) nos camundongos. Na presença de distensão abdominal foi realizada a coleta de ascite e o conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos a 4°C (*Eppendorf* 5402 em rotor F45-18-11).

O hibridoma foi testado para secreção de imunoglobulinas da classe IgG realizando-se a concentração por centrifugação do produto sobrenadante do ascite em tubos Centricon. O sobrenadante diluído em NaCl 0,15M na razão 2 (1:2 a 1:64) foi submetido ao teste de Ouchterlony em agar Noble 1% (Difco), utilizando soro de coelho anti IgG de camundongo. A leitura do teste indicou linha de precipitação até a diluição 1:32.

Os testes para verificar reatividade e especificidade do anticorpo obtido foram os ensaios imunoenzimáticos do tipo *Dot-blot* e *Western Blot*. PVS purificado foi utilizado como antígeno nessas reações.

Para o ensaio de *Dot-blot* a membrana de nitrocelulose (Hybond C-Amersham Life Science) foi imersa em solução bloqueio a 3% de soro fetal bovino em PBS-T (PBS 0,01M, Tween-20 0,05%, pH 7,2) por 60 minutos. O antígeno diluído de 1:2 a 1:10 em Tampão

carbonato-bicarbonato 0,2M pH 9,6 foi aplicado em volumes de 10 μ l. A reação do anticorpo monoclonal (1:100 em PBS-T) com o antígeno foi revelada com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (KPL), Diaminobenzidina (DAB-Sigma) e peróxido de hidrogênio (30 volumes). Foram incluídas nos testes amostras de parvovírus canino (PVC - amostra vacinal MERIAL) e parvovírus murino (MVM – CEMIB/Unicamp), diluídas para a mesma concentração protéica que o PVS. Como controle positivo foi utilizado o próprio anticorpo monoclonal adsorvido na membrana, diluído 1:50 em Tampão carbonato-bicarbonato 0,2M pH 9,6.

Para o ensaio do *Western Blotting* PVS purificado foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida-bis-acrilamida a 12,5%, juntamente com o padrão de alto peso molecular 14,3 - 200KDa (GIBCO BRL 1001-018). Após corrida eletroforética em tampão TrisHCl-Glicina pH 8,3 e 1% de SDS o gel foi corado com Coomassie Blue R (0,25%). O gel foi submetido à agitação em tampão Tris-Glicina pH 8,2 e metanol (5:1) por 60 minutos antes de sua transferência para a membrana de nitrocelulose (Hybond C-Amersham Life Science). Para controle do processo de transferência, a parte da membrana com o marcador de peso molecular foi corado com Ponceau S 0,5% em ácido acético a 1%.

A imunomarcação com o anticorpo monoclonal foi realizada após bloqueio da membrana de nitrocelulose em leite desnatado a 5% diluído em TBS-T (Tris HCl 0,1M pH 7,5, NaCl 0,9%, Tween 20 0,1%) por 120 minutos em temperatura ambiente. A reação com anticorpo diluído 1:100 em TBS-T foi mantida por 120 minutos em estufa úmida a 37°C e a reação antígeno-anticorpo foi revelada com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates) mais Diaminobenzidina (DAB-Sigma) diluído em 5ml de Tampão Tris 0,05M pH 7,6 e peróxido de hidrogênio (30 volumes).

3.10 Imunomicroscopia eletrônica direta

Uma mistura (25µl) de PVS semipurificado e anticorpo monoclonal foi colocada em ágar a 2% e sobre esta uma grade de cobre recoberta com película suporte de Formvar e camada de carbono. Após reação por 18hs a 4°C, a grade recebeu solução contrastante de ácido fototúngstico a 2% pH 6,4 e foi observada em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss – LEO960).

3.11 Imunocitoquímica de células SK6 infectadas com parvovírus suíno

Antes de iniciar os testes de imunohistoquímica o anticorpo monoclonal anti-PVS foi testado em células SK-6 infectadas com PVS por imunofluorescência e imunoperoxidase. Foram avaliados a qualidade e o tipo de marcação obtido e foram determinadas as diluições mais adequadas para uso neste tipo de ensaio.

3.11.1 Imunofluorescência em células SK-6 (IF) (MENGELING, 1972).

Células SK-6 em lâminas teflonadas (*Dynatech*) foram infectadas com PVS, mantendo-se as condições anteriormente citadas. Lâminas controle sem PVS foram mantidas em suporte independente.

Em intervalos periódicos (18, 24, 36 e 48 horas) pós-infecção (pi), as lâminas foram avaliadas quanto a intensidade de ECP. Após descarte do meio de cultura, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 0,01M pH 7,2 e depois fixadas com acetona PA (*Merck*) gelada por 10 minutos. Após secagem ao ar as lâminas foram lavadas duas vezes no mesmo tampão e incubadas por 30 minutos na temperatura ambiente, com o anticorpo monoclonal diluído 1:25 e 1:50. Como controle foram incubadas lâminas com soro negativo de camundongo Balb/c

diluído 1:25. Seguiram-se duas lavagens de 10 minutos cada com PBS 0,01M pH 7,2 e depois incubação com anticorpo conjugado com fluoresceína (anti IgG de camundongo produzido em carneiro) diluído 1:320 em solução 1:750 de Azul de Evans. Terminada a incubação de 40 minutos em ambiente protegido da luz as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 0,01M pH 7,2, de 10 minutos cada, seguindo duas lavagens rápidas (um minuto) com água destilada. Para a montagem utilizou-se glicerina em Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,25M pH 8,5 (9:1), cobrindo com lamínula de vidro.

A leitura do teste foi feita em microscópio com luz ultravioleta (Zeiss Standard 20-EPI iluminação).

3.11.2 Imunoperoxidase (IP) em células SK-6 (SOLIMAN et al., 1997)

Em placas de 24 poços com lamínulas de vidro foi distribuído 1ml da suspensão de células SK6 em meio Eagle MEM contendo 10% de SFB e antibióticos em cada poço. Após seis horas de incubação em estufa a 37 C com umidade controlada em 85% e 5% de CO₂ a monocamada semiconfluente (~50%) foi lavada três vezes com PBS 0,01M pH 7,2. Em seguida, 200µl do inóculo viral (100TCID 50%= 10^{2.5}) foram adicionados e após 3 horas o mesmo foi descartado e 1ml de meio Eagle MEM com 5% de SFB e antibióticos foi acrescentado. Placa controle de células foi mantida nas mesmas condições. As placas foram colocadas em estufa 37 C, nas mesmas condições, por até três dias. Lamínulas foram coletadas 12, 24 e 36 horas pós-infecção. As células foram lavadas com PBS 0,01M pH 7,2 e fixadas com 300µl de acetona 80% por 30 minutos a 4 C. Descartada a acetona foi adicionado 1,0 ml de etanol 70° e as lamínulas foram mantidas a 4 C nas placas até o momento do teste de IP.

Para a reação de IP as lamínulas foram lavadas com PBS-T por três vezes, em intervalos de 5 minutos. Em seguida a reação foi incubada 15 minutos em temperatura ambiente com peróxido de hidrogênio 30 volumes, diluído a 3% em PBS-T. Repetiu-se três lavagens como as anteriores e com incubação por 18 horas a 4 C em câmara úmida com o anticorpo monoclonal anti-PVS diluído 1:100 em PBS-T. Após três lavagens com PBS-T e

incubação por 60 minutos em temperatura ambiente com SFB a 3% em PBS-T, e outra sequência de lavagens, foi feita a incubação com anti IgG total de camundongo conjugado com peroxidase (*Southern Biotechnology Associates*) por 180 minutos, na mesma temperatura. Após três lavagens a reação foi revelada com 5mg de Diaminobenzidina (DAB-Sigma) diluído em 5ml de Tampão Tris 0,05M pH 7,6 e acrescido de 40µl de peróxido de hidrogênio 30 volumes. Após um período de 15 minutos em ambiente protegido da luz, as lamínulas foram lavadas rapidamente com PBS, antes de iniciar a coloração das células com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, passando depois rapidamente em solução saturada de carbonato de lítio.

O processo de desidratação das células foi feito com um banho de dois minutos em álcool 70°GL e mais dois minutos em álcool 80°, 90° e 100°GL. Para a montagem foram empregadas lâminas de vidro e Entelan (*Merck*).

Após a secagem ao ar, a observação foi realizada em microscópio ótico em aumentos de 200 e 400 vezes.

No teste foram incluídas lâminas controle da reação, tanto para o anticorpo monoclonal como para o anticorpo conjugado e para o DAB. Também foi adicionada lâmina com células SK-6 infectada onde não foi aplicado nenhum reagente utilizado no teste de IP.

3.12 Imunohistoquímica de tecidos fetais

Nesse ensaio foram utilizados apenas tecidos de fetos natimortos e abortados, que não apresentavam alterações autolíticas evidentes no exame macroscópico e que, microscopicamente apresentavam boa integridade estrutural.

Os fragmentos selecionados de tecidos de fetos (pulmão, coração, timo) foram desidratados em banhos sucessivos de 30 minutos cada, em álcool etílico a 80°GL, 95°GL e 100°GL por três vezes. Em seguida, procedeu-se a um banho de 15 minutos em álcool-xilol (1:1) e a diafanização com xilol absoluto por 30 minutos. A parafinação inicial foi feita com parafina fundida (54-56°C) com xilol (1:1) por 30 minutos, passando depois para parafina pura

por duas horas. A microtomia compreendeu cortes em série de 5micra usando navalha descartável. Foram aderidos sobre lâminas de vidro e seladas com Poli-L-lisina (*Sigma*), secas em estufa 37-40°C por, no mínimo, 2 horas.

3.12.1 Imunoperoxidase em tecidos fetais (SHI; KEY; KALRA, 1991)

A desparafinação e hidratação dos cortes foram realizadas com dois banhos iniciais de 15 minutos cada em xilol absoluto, seguidos por série decrescente de álcool etílico (álcool absoluto duas vezes, 95°GL, 80°GL, 70°GL) por cinco minutos cada. Finalizou-se o processo mantendo-se os cortes em água destilada por cinco minutos.

Em banho de gelo, as lâminas embebidas em Tampão Citrato de Sódio 0,01M pH 6,0 foram submetidas a um processo de exposição de sítios em forno microondas (Panasonic NN7809), em três ciclos de três minutos cada, na potência máxima, trocando-se o tampão e o banho de gelo a cada ciclo. Após resfriamento e passagem rápida em água destilada, os cortes sofreram uma lavagem inicial em Tampão TS (NaCl 0,15M. Tris HCl 0,05M pH 7,6) por cinco minutos em temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação em peróxido de hidrogênio a 0,3% em tampão TS e novamente uma lavagem de cinco minutos no mesmo tampão, foram aplicados 100ul de solução bloqueio sobre cada corte (SFB a 3% e soro de coelho 3% em TS) por 30 minutos. As lâminas foram mantidas em câmara úmida na temperatura ambiente e após lavagem rápida com TS, os cortes foram cobertos com o anticorpo monoclonal, diluído 1:100 em solução bloqueio e mantidos por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Após lavagens com TS em duas etapas de 15 minutos cada, as lâminas foram incubadas por 120 minutos com anticorpo anti IgG de camundongo, conjugado com peroxidase (*Southern Biotechnology Associates*) diluído 1:1000 em TS. Lavadas novamente em TS, as reações foram reveladas com 6mg de DAB (Diaminobenzidina *SIGMA*) em 10ml de Tris 0,05M e 100µl de peróxido de hidrogênio 3% por aproximadamente 15 minutos, encerrando o procedimento com água destilada.

Controles negativos para todos os materiais da reação foram incluídos no teste, incluindo-se tecidos de leitões normais, livres de PVS.

A contracoloração foi feita com Hematoxilina de Harris (DINÂMICA) por 30 segundos e depois um banho rápido em solução saturada de carbonato de lítio (*Merck*).

A desidratação que precedeu a montagem foi iniciada com álcool 95°GL por três minutos, três banhos em álcool absoluto, por cinco minutos cada, e um banho de xilol também por cinco minutos. Repetiu-se o banho de xilol e para a montagem utilizou-se lamínulas de vidro aderidas com Entelan (*Merck*).

A observação foi realizada em microscópio ótico em aumentos de 100x, 200x, 400x e 1000x.

3.13 Reação em cadeia da polimerase PCR e *nested*-PCR

As amostras de tecido coletadas de fetos e armazenadas a -70°C , como também monocamadas de células SK6 infectadas com PVS, foram os materiais analisados nesse ensaio. Foram seguidas as recomendações de Soares et al, 1999.

3.13.1 Extração do DNA viral

Para a obtenção de lisado celular células SK6 foram congeladas e descongeladas por três vezes e posteriormente clarificadas por centrifugação a 2000xg (Hitachi CF14D2) por 20 minutos a 4°C . Os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20°C até sua utilização.

Fragmentos de tecidos de pulmão, coração, baço, timo e rim foram macerados com auxílio de seringa de vidro estéril com êmbolo e agulha 40x16 e 25x0,8mm. O macerado foi ressuspensão a 20% em PBS 0,01M pH 7,4. A mistura foi congelada e descongelada por três

vezes e depois clarificada a 2000xg (Hitachi CF14D2) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi armazenado a -20°C até sua utilização.

A um volume de 130µl das suspensões de células ou macerados de tecidos foram acrescentados 40µl de Tampão TNE (Tris.HCl 100mM pH7,4, NaCl 100 mM, EDTA 20mM pH 8,0), 20µl de SDS 10% e 10µl de solução de proteinase K (10mg/ml). Após homogeneização e incubação por 18 horas em banho-maria a 37°C, igual volume de uma mistura de fenol destilado/clorofórmio (1:1) foi acrescentado. Após agitação vigorosa em Vortex por 10 minutos e centrifugação por 10 minutos a 11.600xg (*Eppendorf* 5402 Rotor F45-18-11) a 4°C a fase aquosa foi coletada e a ele foram adicionados 200µl de clorofórmio gelado, repetindo-se o procedimento anterior. O DNA viral foi precipitado com 200µl de etanol 95^o GL a -20°C por 18 horas. Após igual centrifugação o precipitado foi seco a vácuo (*Speed-vac*), que foi ressuspensão em 25µl de água desmineralizada estéril.

3.13.2 Reação de amplificação

Foram utilizados quatro iniciadores que amplificam o gene da proteína não estrutural NS-1 de PVS. Os iniciadores indicados como P1 e P2 foram utilizados na primeira reação (*primers* externos) e P3 e P4 na segunda reação de amplificação (*primers* internos) (Quadro 2).

Quadro 2. Sequências de nucleotídeos dos iniciadores para amplificação da proteína não estrutural NS-1 de parvovírus suíno (SOARES et al., 1999).

Iniciadores	Sequências de nucleotídeos
P1	5`- ATA CAA TTC TAT TTC ATG GGC CAG C – 3`
P2	5`- TAT GTT CTG GTC TTT CCT CGC ATC – 3`
P3	5`- TTG GTA ATG TTG GTT GCT ACA ATG C – 3`
P4	5`- ACC TGA ACA TAT GGC TTT GAA TTG G – 3`

Os iniciadores foram diluídos em água desmineralizada na concentração final de 100uM e estocados nas combinações P1+P2 e P3+P4. Para a PCR (primeira reação) foi utilizada a combinação de 2,5µl do combinado de P1+P2, 0,2µl da enzima Taq polimerase (5U/ml - *Pharmacia*), 2,5µl do tampão que acompanha a enzima (500mM KCl, 15mM MgCl₂, 100mM TrisHCl pH 9,0), 0,5µl das quatro bases nitrogenadas (4dNTP 100mM cada - *Pharmacia*) e 17µl de água desmineralizada estéril livre de RNase e DNase, compondo assim o *master mix*. A este, foram adicionados 2µl de DNA extraído.

Na segunda reação (*nested-PCR*) foi utilizado apenas 1µl de produto da primeira amplificação, a combinação P3+P4 e manteve-se a mesma proporção dos demais componentes da reação.

A amplificação enzimática iniciou-se com aquecimento por cinco minutos a 95°C, seguido de trinta e cinco ciclos compostos por denaturação a 95°C por trinta segundos (30''), anelamento a 55°C por trinta segundos (30'') e extensão a 72°C por sessenta segundos (60''). A finalização se deu a 72°C por dez minutos.

Os produtos do PCR (*amplicons*) foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1,5% na primeira amplificação e a 2% na segunda amplificação. Após imersão em brometo de etídio foram observados os resultados em transiluminador com luz ultravioleta (UV).

Como controle negativo utilizou-se água estéril, incluindo-se no mínimo um controle negativo para cada oito amostras testadas. Como controle positivo utilizou-se a amostra de PVS NADL-2 após cultivo em células SK6.

3.14 Clonagem de produto de *nested-PCR*

Partindo de fragmentos de aproximadamente 137pb obtidos após a segunda amplificação de DNA de PVS de amostras obtidas de pulmão de fetos natimortos, foi realizada a clonagem e posteriormente seqüenciamento dos insertos obtidos.

3.14.1 Ligação e transformação

Para a ligação do produto de *nested*-PCR foi utilizado o vetor *pGEM-T Easy Vector Systems (Promega)*. O produto para inserção foi previamente eluído e purificado em lâ de vidro após recorte do gel de agarose. A mistura da reação compreendeu 3µl do inserto, 0,3µl do plasmídio, 1µl da T4 DNA ligase, 5µl do tampão da enzima (60mM TrisHCl pH 7,8, 20mM MgCl₂, 20 mM DTT, 1mM ATP 10% PEG), completando com água até o volume final de 10µl. Após duas horas de incubação a 4°C, foram adicionados 40µl do Tampão de Transformação (1MKCl, 0,3M CaCl₂, 0,5M MgCl₂, PEG10%) e esta mistura foi colocada em contato com células competentes de *Escherichia coli* (DH5α), previamente preparadas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CEBMEG/Unicamp. Manteve-se em repouso por 30 minutos em gelo para introdução do vetor por choque térmico e mais 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 500µl de meio de cultura LB (triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio) e incubou-se a 37°C por 50-60 minutos. Durante este período, placas com meio LB sólido com ampicilina receberam 60µl de X-Gal (20mg/ml) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosideo). Nestas placas foram inoculados 150µl da suspensão de célula bacteriana transformada e incubadas a 37°C por 18 horas. Observou-se então a presença de colônias bacterianas de coloração azul (possivelmente sem inserto) e colônias brancas. Algumas colônias brancas foram selecionadas e colocadas individualmente em tubos contendo 3ml de meio LB com 3µl de ampicilina (50mg/ml), que em seguida foram submetidos à agitação por 16 horas a 37°C.

3.14.2 Extração do DNA plasmidial e digestão enzimática

Cada clone selecionado foi transferido (1,4ml) para novo tubo e após centrifugação a 13.000 rpm (*Eppendorf* 5402 em rotor F45-18-11) por 60 segundos o sobrenadante foi descartado e mais 1,4ml da cultura foram adicionados para mais uma centrifugação.

Descartado novamente o sobrenadante, foi feita a extração por lise alcalina de acordo com as indicações do fabricante (*kit* colunas *QIAGEN*), modificado pelo Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Unicamp). O precipitado foi ressuspenso em vortex com 300µl de uma solução contendo 50mM TrisHCl pH8,0, 10mM de EDTA e RNase (100ug/ml), recebendo após 300µl de solução com 200mM de NaOH e SDS 1%. Depois de um repouso por cinco minutos, 300µl de uma terceira solução contendo 3M de acetato de potássio pH5,5 foi acrescentada e misturada por inversão suave. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 13.000 rpm (*Eppendorf* 5402 em rotor F45-18-11) por 15 minutos e ao precipitado obtido foram adicionados 400µl de isopropanol. Nova centrifugação resultou em um precipitado que recebeu 600µl de etanol 70% gelado (4°C) e foi misturado por inversão cuidadosa, antes da última centrifugação. O DNA final seco ao ar foi ressuspenso em 20µl de água desmineralizada estéril.

O procedimento de digestão do DNA plasmidial com a enzima *EcoRI* iniciou-se com a mistura de 2µl de DNA com 0,3µl da enzima, mais 3,0µl do tampão *OPA* (*One-Phor-All Buffer PLUS – Pharmacia*) e 9,7µl de água. Após 16 horas a 37°C, o resultado foi avaliado em gel de agarose a 2% antes das amostras serem remetidas para reação de sequenciamento.

3.14.3 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram todas realizadas no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp, sob orientação e colaboração do Prof. Marcelo Menossi.

Conforme instruções recebidas, para todas as reações foi utilizado o *kit BIG DYE* (*Applied Biosystem*). A primeira etapa da reação compreendeu amplificação do produto da construção com 800ng de DNA plasmidial, 5pMoles de oligonucleotídeos dos iniciadores apropriados e 3µl de mistura de reação *Big Dye Terminator* (*ABI-PRISMA*), em um volume final de 15µl.

O perfil de amplificação foi de 96°C por 1 minuto e 30s seguido de 25 ciclos a 96°C por 12s, 50°C por 6s e 60°C por 4 minutos. Os produtos das reações foram purificados adicionando-se 80µl de isopropanol 75⁰ GL fresco incubados à temperatura ambiente por 20 min. As reações foram centrifugadas por 30 min a 13000 rpm e aos precipitados foram adicionados 250µl de isopropanol 75⁰ GL. Novamente, após mistura as reações foram centrifugadas por 20 min a 13000rpm. Repetiu-se a adição de 250µl de isopropanol ao precipitado e a centrifugação se deu por apenas 10min a 13000rpm. Os precipitados, após serem secos a vácuo por 5 min, foram ressuspensos em 15µl de TSR (*Template Susspension Reagent-Perkin Elmer*) e mantidos a 4°C até a análise no seqüenciador *ABI PRISM 310*.

A análise do seqüenciamento obtido com seqüências conhecidas da proteína NS-1 de PVS depositadas no *GenBank do NCBI-National Center for Biotechnology Information*, utilizou-se primeiramente o programa *VecScreen* para exclusão da seqüência própria do vetor e posteriormente o programa *BLASTN 2.2.3 (Basic Local Alignment Search Tool)* para análise do alinhamento (ALTSCHUL et al., 1997).

3.15 Análise estatística

Nos resultados de IP foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para análise de variância não paramétrica.

Para os resultados em *nested-PCR* o modelo foi ajustado utilizando-se a teoria de modelos lineares generalizados propostos por Nelder e Wedderburn, 1972, com o procedimento de GLIMMIX do software SAS. O modelo considerou os efeitos fixos da apresentação clínica dos fetos, amostras de tecidos de fetos, idade gestacional dos fetos, ordem de parto das porcas e os resultados na prova de IH, assim como o efeito de medidas repetidas no feto.

Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Produção de antígeno de PVS

A metodologia para a produção de antígeno de PVS (cepa NADL-2) na linhagem SK-6 foi adequada (Figura 3). A partir da observação de ECP e posterior teste do sobrenadante celular em HA detectou-se títulos virais de até 512.

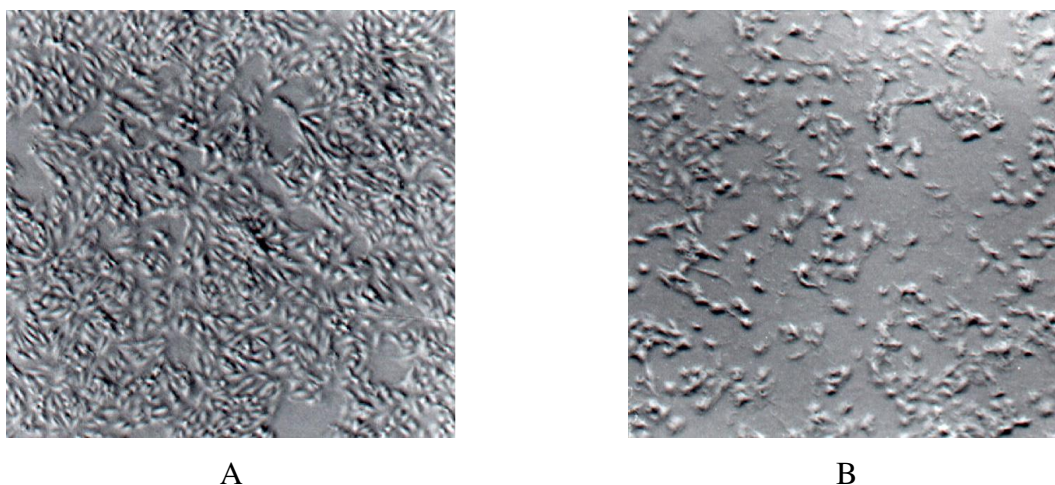


Figura 3: Células de rim de suíno (SK-6) após 48 horas de cultivo não infectadas (A) e infectadas com parvovírus suínos (B) 40X.

4.2 Pesquisa de anticorpos anti-PVS por inibição da hemaglutinação em fetos suínos

Foram testadas 30 amostras de líquido torácico para a presença de anticorpos anti-PVS, de fetos com idade gestacional estimada acima de 70 dias (APÊNDICE B). Foram considerados como positivos líquidos com títulos maiores ou iguais a 16. Do total de amostras analisadas apenas duas (6,6%) foram negativas na prova de IH (APÊNDICE C). As amostras positivas apresentaram títulos inibidores da hemaglutinação de 32 até 1024, sendo que 18 delas (60%) eram de fetos natimortos, sete (23,3%) de fetos abortados e três (10%) de fetos mumificados. A maioria (64,2%) das amostras de líquidos torácicos positivos, independentemente da classificação dos fetos, apresentou títulos entre 32 a 128. Os maiores títulos de anticorpos (256-1024) foram encontrados em fetos natimortos (Tabela 1).

Tabela 1: Prova de Inibição da Hemaglutinação (IH) para a pesquisa de anticorpos anti-parvovírus suínos em amostras de líquido torácico de fetos suínos natimortos (NM), abortados (Ab) e mumificados (Mu).

Classificação dos fetos	Título da IH para anticorpos anti-PVS			Total de Positivos IH
	Negativo	≤ 128	≥ 256 e ≤ 1024	
NM (n=19)	01	10	08	18
Ab (n=08)	01	05	02	07
Mu (n=03)	-	03	-	03
Total de fetos (n= 30)	02	18	10	28

4.3 Semipurificação e purificação de PVS, caracterização da partícula viral e reatividade do Mab anti-VP2 viral.

Os precipitados obtidos no processo de semipurificação em sacarose, após dosagem relativa de proteínas e determinação de seus títulos em HA, foram submetidos à imunomicroscopia eletrônica, frente ao anticorpo monoclonal (Mab) anti-VP2 de PVS. Foram observadas partículas virais típicas de PVS, com aproximadamente 22nm de diâmetro, completas e incompletas (Figura 4).

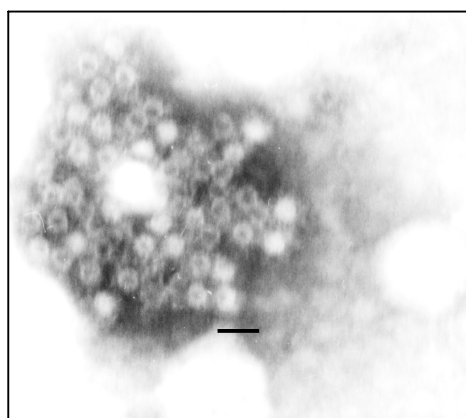


Figura 4: Imunoeletrofotomicrografia de parvovírus suínos semi-purificados em sacarose (240.000x). Barra: 50nm.

No gráfico 1 estão os resultados da purificação do sobrenadante de células infectadas com PVS, em cloreto de cério. As frações com densidades próximas às esperadas para PVS (entre 1,22 e 1,25g/ml) foram testadas em HA e suas concentrações protéicas foram estimadas.

A fração E, com densidade de 1,24g/ml, foi utilizada no ensaio imunoenzimático tipo *Dot-Blot*, frente a amostras de PVS e de parvovírus de outras espécies animais (item 3.9), para determinar a reatividade e especificidade do anticorpo monoclonal anti-PVS. Como resultado obteve-se reação positiva apenas para PVS.

A fração D, que apresentou maior concentração protéica e também maior título hemaglutinante, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, adicionada de SDS. Após eletroforese, o gel também foi submetido ao *Western blotting*. Nesse caso o objetivo foi determinar a especificidade do Mab para a VP2 viral. Como resultado obteve-se um perfil constituído por três bandas protéicas de pesos moleculares de 75,9kDa, 67,5kDa e 57,9kDa (teste de regressão linear pelo programa Image Master Total Lab 1.11 Amersham Pharmacia Biotech AB SE-751-84) sendo uma delas nitidamente em maior concentração (Figura 5). Essas proteínas equivalem às proteínas estruturais do PVS VP1, VP2 e VP3, respectivamente. Após transferência para membrana de nitrocelulose e imunomarcagem com o anticorpo monoclonal anti-PVS, ocorreu reação positiva apenas para a proteína de 67,5kDa (Figura 6), correspondente à proteína VP2 do PVS.

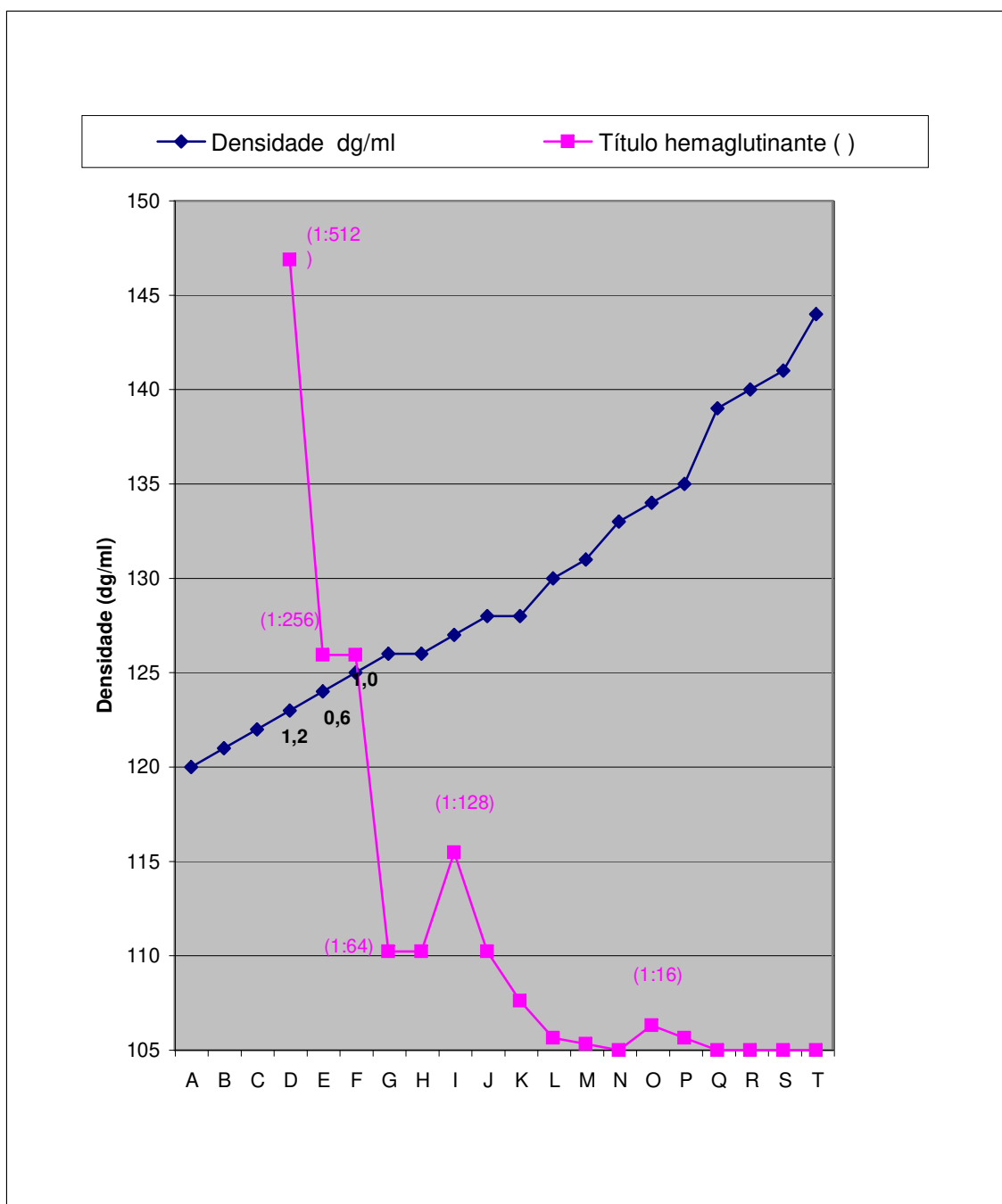


Gráfico 1: Medidas de densidade, título hemaglutinante e concentração de proteína* das frações coletadas da purificação do parvovírus suíno, por ultracentrifugação em gradiente de CsCl.

* As medidas de concentração de proteínas (em mg/ml) estão apontadas nas frações com maior título hemaglutinante.

OBS: Nas frações A, B e C não foram realizados testes de hemaglutinação.

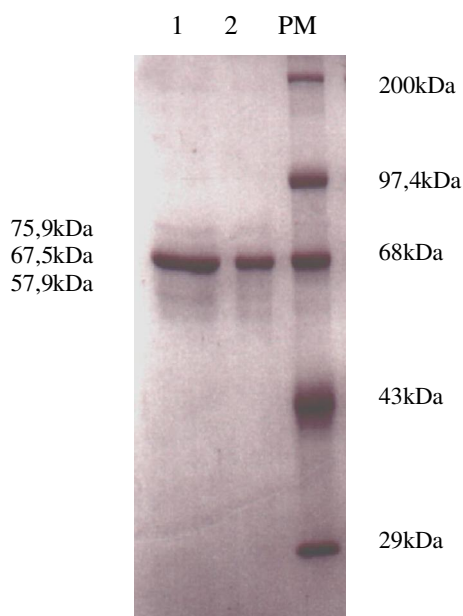


Figura 5: Eletroforese em gel de 12,5% de poliacrilamida-SDS de parvovírus suíno (NADL-2) (1 e 2). PM - Padrão de Peso Molecular.

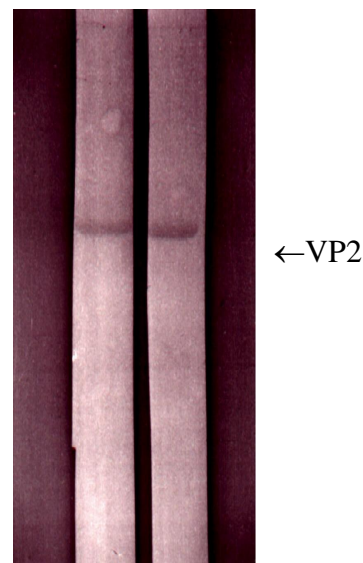
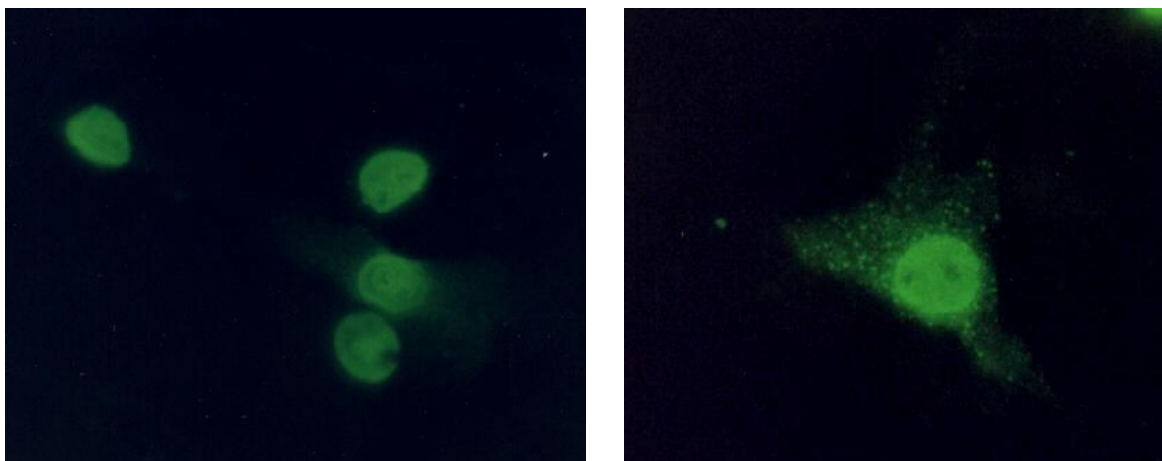


Figura 6: *Western blotting* de parvovírus suíno e marcação com o anticorpo monoclonal anti-VP2 viral (67,5 kDa).

4.4 Imunocitoquímica em células SK-6

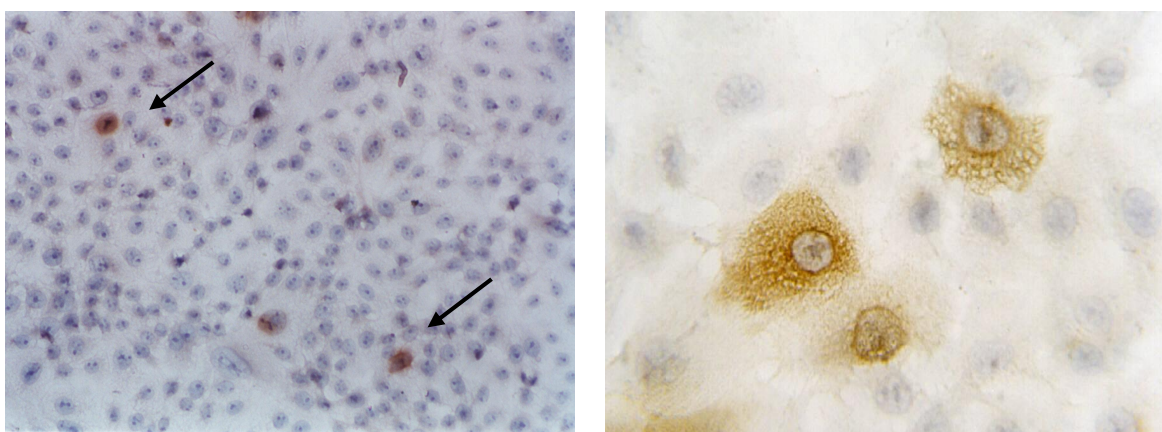
A reação de imunofluorescência indireta utilizando o Mab anti-PVS células SK-6 infectadas com NADL-2, resultou em marcação intensa e homogênea no núcleo, nos ensaios com 12-24 horas de infecção. Com a progressão da infecção celular, evidenciou-se uma marcação perinuclear que progrediu para todo o citoplasma, que se mostrou granular e dispersa (Figuras 7). Resultados idênticos foram observados nos testes de imunoperoxidase em células SK6 infectadas com NADL-2 (Figura 8).



A

B

Figura 7: Imunofluorescência em células SK-6 infectadas com parvovírus suíno (NADL-2) após 24hs de infecção (marcação nuclear) (400x) (A) e após 36hs de infecção (marcação nuclear e citoplasmática granular difusa) (500x) (B).



A

B

Figura 8: Imunoperoxidase em células SK-6 infectadas com parvovírus suíno (NADL-2), após 24hs de infecção (marcação nuclear) (setas) (200x) (A) e após 36-48hs de infecção (marcação nuclear e citoplasmática granular difusa) (1000x) (B). Contra coloração com Hematoxilina de Harris.

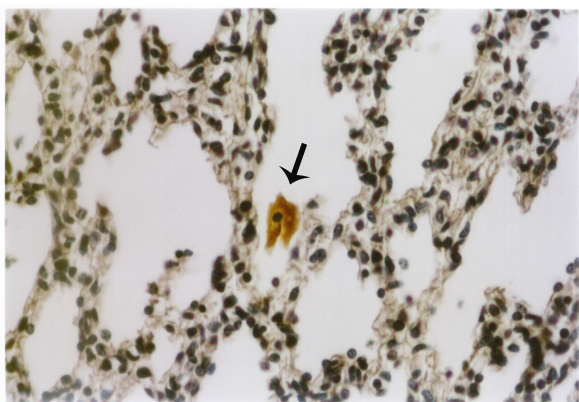
4.5 Imunohistoquímica em amostras de tecidos de fetos suínos

Tecidos de pulmão, coração e timo de quinze fetos foram selecionados com base em sua melhor conservação estrutural, mediante prévia coloração de Hematoxilina-Eosina (APÊNDICE B) e foram submetidos ao teste de Imunoperoxidase indireta (IP) (item 3.12.1) para a detecção de antígeno VP2 de PVS.

Os testes em pulmão revelaram marcação citoplasmática densa de coloração amarelo-marrom em células isoladas, localizadas nos alvéolos pulmonares, saco alveolar, ou, às vezes, na luz bronquiolar. Estas células apresentavam um amplo citoplasma de contorno irregular, com núcleo central identificado pela contra-coloração. A localização e morfologia celular indicam tratar-se de células fagocitárias (macrófagos) ou de pneumócitos tipo II descamados (Figura 9).

Em tecidos de coração, a imunomarcação estava presente em múltiplas células do músculo cardíaco (fibras cardíacas), visível mesmo em menor aumento (Figura 10).

Nos cortes de timo, a marcação citoplasmática foi notada em células dispersas pelo órgão, mas localizadas principalmente na porção medular (Corpúsculo de Hassal) (Figura 11). Estas células, com aparentes expansões citoplasmáticas, remetem às células estromais conhecidas como retículo-epiteliais, responsáveis pela sustentação dos linfócitos.

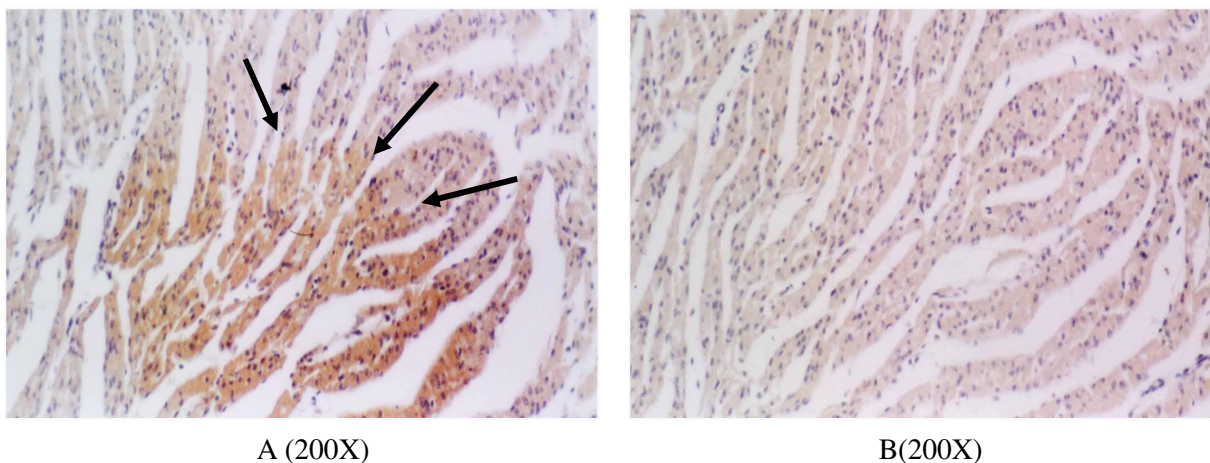


A (400x)



B (1000x)

Figura 9: Imunoperoxidase positiva para PVS em células isoladas no espaço alveolar (setas) de pulmão de suínos abortados com 90 dias.



Figuras 10: Imunoperoxidase positiva para PVS em células do músculo cardíaco (seta) de feto de suíno natimorto (A). Controle negativo da reação (B).

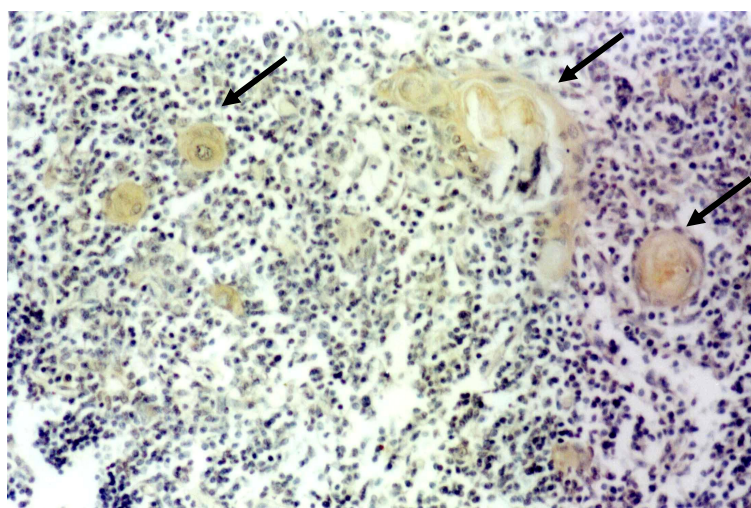


Figura 11: Imunoperoxidase positiva para PVS em células estromais (seta) de timo de feto natimorto de suíno (400x).

Dos quinze fetos analisados por IP, com idade gestacional variando de 78 a 110 dias, 11 (73,3%) foram positivos com marcação em células do pulmão, dois (16,6%) tiveram sua marcação em células do coração e sete (63,6%) no timo (Tabela 2). Considerando como positivo para a infecção por PVS o feto com pelo menos um tecido reativo em IP, foram confirmados sete fetos natimortos e cinco abortados, representando 80% dos fetos testados. A análise estatística dos resultados positivos para IP entre fetos natimortos e abortados para os

três diferentes tecidos, não mostrou diferença significativa ($p>0,05$). O mesmo ocorreu comparando apenas o tecido do pulmão para a presença do antígeno VP2 do PVS entre os dois grupos ($p>0,05$). A positividade dos diferentes tecidos, quando comparados entre si e independentemente do grupo de fetos, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre pulmão e timo e entre coração e timo ($p>0,05$), mas sim, entre pulmão e coração ($p<0,05$).

Tabela 2: Testes de imunoperoxidase em pulmão, coração e timo de fetos suínos natimortos e abortados, e idade fetal estimada para cada feto.

Classificação dos fetos	Idade fetal (dias)	Pulmão	Coração	Timo
Natimortos	100	+	-	-
	*	+	nt	-
	105	+	-	+
	110	+	+	+
	80	+	-	+
	90	-	-	nt
	90	+	-	+
	80	+	nt	+
	90	+	-	+
	90	+	nt	nt
Abortados	90	-	-	+
	80	-	-	nt
	78	-	-	nt
	90	+	-	-
	90	+	+	-
Positividade %		73,3	16,6	63,6

* dado desconhecido; + = marcação positiva; - = marcação negativa; nt = não testado

4.6 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores externos (P1 e P2) resultou em amplificado de 330pb no controle positivo (cepa NADL-2). O mesmo teste, quando aplicado em tecidos de fetos de suínos raramente foi positivo. A re-amplificação do produto obtido, mesmo que não visível após aplicação de brometo de etídeo, com os iniciadores internos (P3 e P4) (*nested*-PCR), resultou no fragmento esperado de aproximadamente 137pb para 82,4% dos tecidos testados (APÊNDICE D). Na figura 12 estão exemplificadas duas reações de amplificação com três tecidos distintos de feto de suíno natimorto (pulmão, coração e rim), por PCR (A) e *nested*-PCR (B) Como pode ser visto em B, apenas no tecido pulmonar foi possível verificar pela amplificação de um fragmento de 137 pb. Esta amplificação só foi possível após uma primeira amplificação realizada para as três amostras (A).

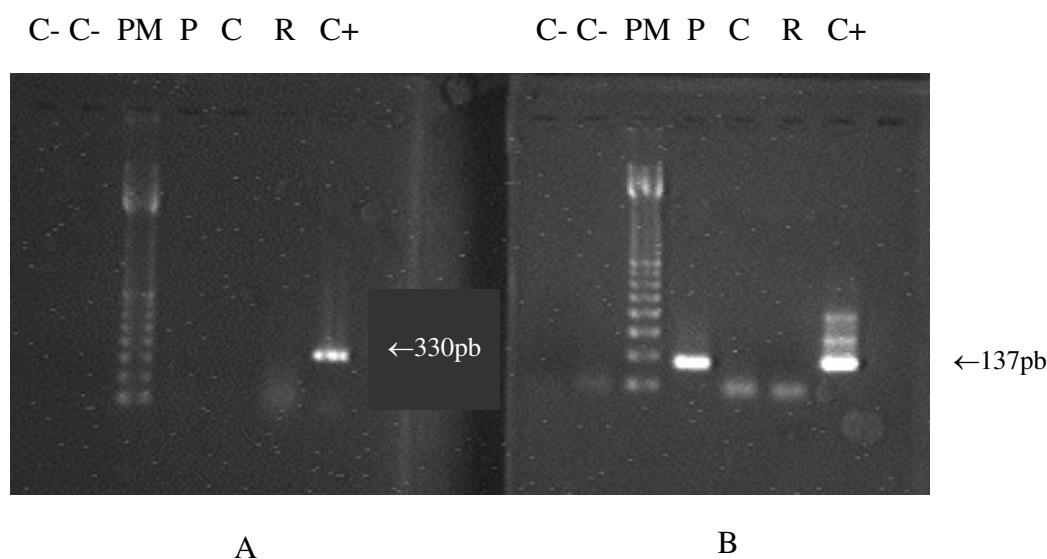


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose da reação em cadeia da polimerase para o parvovírus suíno.

A - Reação de amplificação com os iniciadores externos (P1 e P2)

B - Reação de amplificação com os iniciadores internos (P3 e P4) (*nested*-PCR)

C- : Controles negativos

PM: Padrão de peso molecular 100pb

P: pulmão de feto natimorto

C: coração de feto natimorto

R: rim de feto natimorto

C+: controle positivo - amostra de PVS NADL-2

Nestas reações foram testados 28 fetos, sendo que, para cada um deles, pelo menos dois tecidos diferentes foram analisados (APÊNDICE C), totalizando 108 amostras de tecidos. Considerando o feto positivo para a presença de PVS quando pelo menos um tecido resultasse na amplificação positiva, foram 27 (96,4%) positivos (Tabela 3). Apenas um feto foi negativo para o pulmão, sendo que o mesmo foi positivo para o coração. Além disso, apenas dois fetos foram positivos no pulmão e negativos para coração. Resumidamente, com exceção de dois fetos, o pulmão foi sempre positivo para PVS. Em 60,7% dos fetos, o genoma do PVS foi detectado em todos os tecidos analisados (APÊNDICE D).

Tabela 3: Testes de *nested*-PCR para o gene da proteína NS-1 de parvovírus suínos em fetos suínos e seus tecidos.

<i>nested</i> - PCR	Fetos (n=28)	Tecidos (n=108)	Pulmão (n=28)	Coração (n=28)	Baço (n=22)	Timo (n=14)	Rim (n=16)
Positivo	27	89	26	25	15	11	12
Negativo	01	19	2	3	7	3	4

Pela análise estatística dos resultados agrupados para os diferentes tipos de fetos, não foi verificada diferença significativa entre os grupos, considerando o conjunto dos tecidos positivos ($p>0,05$). Porém, a análise evidenciou maior tendência para a presença de PVS em fetos natimortos (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em *nested*-PCR para PVS em tecidos de fetos natimortos (NM), abortados (Ab) e mumificados (Mu).

Fetos	% de positivos (*)	DP
Ab	79.98 ^a	15.94
Mu	79.48 ^a	16.91
NM	87.43 ^a	6.59
p	0.90	

(*) Positivo para um ou mais tecidos

Médias com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Para os diferentes tecidos testados a frequência de identificação do genoma de PVS foi maior para o pulmão (96,99%) e o coração (93,33%), independentemente do grupo clínico (NM, Ab, Mu) (Tabela 5). Nesse caso, não foi verificada diferença estatisticamente significativa. O baço foi aquele com menor positividade para PVS em todos os fetos (54,91%) ($p>0,05$).

Tabela 5: Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em *nested*-PCR para PVS, em diferentes tecidos de 28 fetos de suínos.

Tecido fetal	% de positivos	DP
Pulmão	96.99 ^a	3.48
Coração	93.33 ^{ab}	5.93
Rim	69.56 ^{bc}	17.10
Timo	66.00 ^{bc}	18.28
Baço	54.91 ^c	16.76
p	0.05	

Médias com letras diferentes são estatisticamente significativas.

Nos fetos com 70 a 99 dias de gestação a presença do genoma viral foi maior (94,76%) quando comparada com aqueles com 100 ou mais dias de idade gestacional (55,57%) ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em *nested*-PCR para PVS em tecidos fetais de suínos, em relação à idade gestacional estimada dos fetos.

Idade fetal (dias)	% de positivos (*)	DP
A(70-99)	94.76 ^a	2.87
B(≥ 100)	55.57 ^b	23.77
p	0,03	

(*) Positivo para um ou mais tecidos

Médias com letras diferentes são estatisticamente significativas.

Tecidos de fetos oriundos de porcas com menor número de partos (1 a 3 partos) e daquelas com ordem de parto maior (4 a 8), foram positivos para PVS em 92,28% e 65,43%, respectivamente. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando maior presença do genoma viral em tecidos de fetos de porcas mais jovens (Tabela 7).

Tabela 7: Frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em *nested*-PCR para PVS em tecidos fetais de suínos, com relação à ordem de parto das porcas.

Ordem de parto	% positivos (*)	DP
J (1 a 3)	92.28 ^a	5.67
V(≥ 4)	65.43 ^b	11.34
p	0.03	

(*) Positivo para um ou mais tecidos

Médias com letras diferentes são estatisticamente significativas.

A maioria dos tecidos de fetos testados por *nested*-PCR também foi analisada para a presença de anticorpos específicos para PVS nos líquidos torácicos (APÊNDICE B). Nesse caso foram 21 fetos (91,3%) positivos. Quando comparados os dois grupos, com relação ao título de anticorpos pela IH (título zero a 1:64; títulos de 128 a 1024), não foi verificada diferença estatisticamente significativa (Tabela 8).

Tabela 8: Títulos de anticorpos por inibição de hemaglutinação (IH) e frequência (%) e desvio padrão (DP) de resultados positivos em *nested*-PCR para PVS em tecidos fetais de suínos.

Título em IH	% de positivo (*)	DP
<i>entre 0 - 64</i>	83.94 ^a	9.80
<i>Entre 128 - 1024</i>	81.23 ^a	8.73
p	0.80	

(*) Positivo para um ou mais tecidos.

Médias com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa.

4.7 Clonagem e sequenciamento

A construção do vetor foi realizada com produtos de *nested*-PCR eluídos e purificados de gel de agarose a 2%. A reação em cadeia da polimerase foi realizada para amostras de DNA extraído de tecido pulmonar de feto natimorto e feto mumificado.

Através da metodologia citada no item 3.14 de Material e Métodos, obteve-se clones de *Escherichia coli* DH5 α contendo o vetor pGEM-T Easy® (Promega). Pela digestão enzimática de DNA plasmidial com EcoRI, verificou-se a presença de insertos de aproximadamente 190pb (Figura 13) e a partir desse resultado selecionou-se duas amostras (3 e 8) para a reação de sequenciamento.

Após a observação dos eletroesferogramas obtidos, fez-se o alinhamento das seqüências utilizando o programa *BLASTN* 2.2.3 (números de acesso U44978, AY502114, AY686601).

Para ambas as amostras clonadas e seqüenciadas, o alinhamento apresentou uma identidade de 90% com as cepas de parvovírus suíno NADL-2 (não demonstrado) e Kresse (Quadro 3).

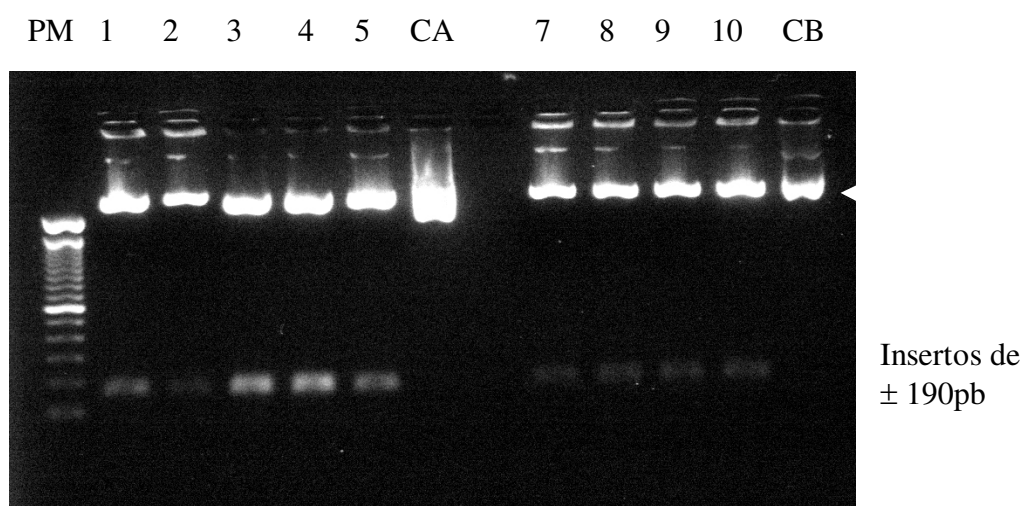


Figura 13: Gel de agarose a 2% da digestão enzimática com *EcoRI* de DNA plasmidial de amplificado de amostra de parvovírus de fetos suínos.

PM – Padrão peso molecular 100pb

1,2,3,4 e 5 – Insertos obtidos a partir de clonagem de produto de *nested*-PCR de pulmão de feto natimorto.

7,8,9 e 10 – Insertos obtidos a partir de clonagem de produto de *nested*-PCR de pulmão de feto mumificado.

CA e CB – Controle da extração de DNA plasmidial (Mini-prep)

Quadro 3: Alinhamento da sequência clonada de produto de *nested*-PCR de pulmão de feto natimorto, com amostra Kresse de PVS (programa *BLASTN* 2.2.3).

[gi|1255777|gb|U44978.1|PPU44978](#)

Parvovirus suíno (PVS) amostra Kresse, genoma completo, comprimento = 4948.

Score = 260 bits (131), Expect = 8e-67

Identidade = 183/202 (90%), Gaps = 2/202 (0%)

Fita = positiva / negativa

Amostra: 99 acctgaacatatggctttgaattgg-ttacttggttagagaagtttctgcttctcaat 158

PVS Kresse: 1671 acctgaacatatggctttgaattggtttacttggttagagaagtttctgcttctcaat 1612

Amostra: 159 ccatactaagtttttatttcgtacagtcattaaatggaaagttcaca-tggctgcattga 218

PVS Kresse: 1611 ccatattaagtttttattt-gtacagtcattaaatggaaagttcacattggctgcattgt 1553

Amostra: 219 agca-----accaaccaag-ggtg-aatgtgtgagcaagtatacttttctgtt 278

PVS Kresse: 1552 agcaaccaacattaccaaccaagt-ttgcaatgtgtgagcaattatacttttctgtt 1494

Amostra: 279 gatgctggcccatgaaatagaa 300

PVS Kresse: 1493 gatgctggcccatgaaatagaa 1472

5. DISCUSSÃO

Na suinocultura comercial a observação da produtividade de fêmeas é uma das maneiras de avaliar a qualidade reprodutiva e sanitária do rebanho. O número de leitões nascidos por parto e o número de leitões desmamados/porca/ano são critérios importantes nessa avaliação. Granjas com índices considerados insatisfatórios para as condições de criação estabelecidas têm que verificar os fatores de interferência direta sobre a qualidade reprodutiva das fêmeas, especialmente quando da cronicidade da falha reprodutiva associada à presença de agente infeccioso no rebanho. Quando ocorre a passagem transplacentária de patógenos virais, por exemplo, há o risco de reabsorção embrionária e leitegadas pequenas, como também a mumificação fetal, quando já teve início a mineralização do esqueleto, além de aborto e natimortalidade pré ou intra-parto, resultando em baixo número de leitões nascidos vivos (DIAL et al., 1992).

Um dos agentes virais associados a problemas reprodutivos é o parvovírus suíno (PVS), que ao infectar porcas leva à morte embionária, dano tecidual e/ou morte fetal, mesmo na ausência de sinais gerais nas fêmeas, como o aumento da temperatura corporal, diminuição do consumo de alimentos e/ou irritabilidade (MENGELING; PAUL; BROWN, 1980). Similarmente, em machos infectados por PVS patogênicos não são observadas alterações gerais e apenas conseqüências mínimas sobre a função reprodutiva, apesar da detecção viral no aparelho reprodutor e a transmissão do PVS ocorrer pelo sêmen (TRACKER et al., 1987).

Os primeiros relatos dessa associação indicam que a infecção no feto se dá ao redor de 25 dias pós-infecção, quando a porca adquire os vírus por via oral (JOO; DONALDSON-WOOD; JOHSON, 1976). Fêmeas não-imunes, que se infectam na primeira metade da gestação, apresentam muitos fetos mumificados no momento do parto, já que esses não são imunocompetentes (MENGELING; LAGER; VORWALD, 2000). Esta condição, no entanto, é pouco verificada na atualidade em granjas tecnificadas, dado o uso extensivo de vacinas com vírus inativados (CLARK, 1996). Em estágios mais tardios da gestação, PVS estão menos envolvidos com a morte de fetos dado sua imunocompetência (KRESSE et al., 1985; LAGER et al., 1992), apesar dos primeiros isolados desses vírus terem ocorrido a partir de fetos abortados e natimortos (CARTWRIGHT; HUCK, 1967).

Agentes virais como herpesvírus, influenzavírus e vírus da PRRS (Síndrome Respiratória Reprodutiva dos Suínos) que acometem a porca sistemicamente, estão mais relacionados com a natimortalidade e o aborto no terço final da gestação (KIRKBRIDE & ADARAGH, 1978; WENSVOORD et al., 1991; MALDONADO et al., 2005). Contudo, relatos recentes indicam novas variantes de parvovírus (ZEEUW et al., 2007; SOARES et al., 2003), como também o circovírus tipo-2 (RITZMANN et al., 2005) presentes nestes fetos.

O objetivo deste estudo foi verificar a associação de PVS em fetos de suínos de criações comerciais, quando da presença de natimortalidade, aborto e mumificação. Para a implementação das metodologias propostas, ou seja, IH, *nested*-PCR e imunohistoquímica, um conjunto de atividades e/ou técnicas de laboratório foram realizadas. Assim, o método de semipurificação de PVS, após cultivo da amostra na linhagem celular SK-6 e determinação de sua atividade hemaglutinante, permitiu a identificação por imunomicroscopia direta, com o anticorpo monoclonal anti-PVS CRL 1745, dois tipos de partículas virais conhecidos para PVS (FIELDS, 1996). Ainda, apesar da densidade das partículas em CICs ter sido diferente daquela relatada por outros autores (MOLITOR; JOO; COLLETT, 1983), as partículas virais purificadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, serviram para evidenciar as proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) desses vírus, como também a reatividade específica do anticorpo monoclonal para a proteína *major* VP2.

As fêmeas de suínos das granjas estudadas, todas elas tecnificadas, não apresentavam sintomas de infecção por PVS ou mesmo por outros agentes infecciosos relacionados a falhas reprodutivas. No entanto, os índices que determinam a qualidade reprodutiva estavam abaixo daqueles aceitáveis, já por um período de tempo, o que excluía a presença de surtos infecciosos. Assim, para os casos de fetos natimortos, abortados e mumificados, esses em baixa frequência, que ocorriam em fêmeas com ordem de partos diferentes e independente da vacinação, necessitavam ter sua etiologia determinada.

A IH é um método simples e pouco oneroso que permite determinar a etiologia das infecções virais. A presença de anticorpos nos fetos determina por imunocompetência e, tratando-se de infecção viral, altos níveis de imunoglobulinas da classe G (IgG) nos líquidos corpóreos ou sobrenadantes de macerados de órgãos são esperados (BROLL, et al., 1993). Nos fetos aqui analisados, a presença desses anticorpos foi comprovada por IH em 93,4% das amostras, com títulos similares aos encontrados quando da inoculação experimental intrauterina

com PVS (HOGG; LENGHAUS; FORMAN, 1977; LAGER; MENGELING; LIU, 1992). Estes achados em fetos natimortos e abortados, a princípio, não eram esperados, mas indicam infecção transplacentária pelo PVS e imunocompetência, ou seja, os fetos como capazes de desenvolver resposta imune humoral própria. Pelo tipo placentário da porca, onde as três camadas de tecido materno estão presentes, existe uma interface constante formada pelas células trofoblásticas embrionárias e as células do epitélio uterino, sem contato direto das células trofoblásticas com outras do organismo materno. Estas propriedades enquadram essas placentas como do tipo epiteliocorial, que oferecem maior barreira materno-fetal para a passagem de macromoléculas, incluindo as imunoglobulinas maternas para o feto (CARTER; ENDERS, 2004). Desta forma, o feto depende totalmente de seu sistema imune para responder a estímulos e iniciar sua resposta imune específica, quando ocorre a infecção intra-útero.

A imunocompetência dos fetos para PVS se dá ao redor de 58 dias da gestação (TIZARD, 2002). Considerando que anticorpos inibidores da hemaglutinação são detectados ao redor de 12 dias pós-infecção por PVS (HOGG; LENGHAUS; FORMAN, 1977), nos fetos em estudo a infecção teria ocorrido por via transplacentária e, no mínimo, a partir da metade da gestação (57 dias). Com exceção de dois dos fetos analisados, todos tinham títulos entre 32 a 1024 em IH.

A estimativa da idade em que ocorreu a morte dos fetos estudados foi de 70 a 114 dias. TLASKALOVA-HOGENOVA et al. (1994), afirmam que a imunização de fetos maiores que 55 dias leva ao aumento da resposta imune. No entanto, quando um antígeno persiste em baixos níveis a manutenção da resposta é alcançada (células de memória). Assim, os anticorpos seriam responsáveis pelo controle e também pela permanência da infecção nos fetos (ZINKERNAGEL; KELLY, 1997). A detecção neste estudo de PVS por *nested*-PCR em todos os fetos natimortos, positivos em IH para anticorpos específicos, confirma a presença do vírus independente do título de anticorpos. Ainda, esses títulos não interferem na carga viral, haja visto os resultados da *nested*-PCR (Tabelas 1 e 8).

Abortos representam a expulsão da leitegada antes do término do período normal de gestação (112 - 116 dias), onde os fetos já estão mortos ou isso ocorre logo após a expulsão. Esses casos ocorrem normalmente por falha maternal e, raramente, por falha embrionária e fetal (SOBESTIANSKY, et al. 1999). Neste estudo, os fetos abortados, com idade estimada entre 75 a 90 dias, foram coletados mortos e a presença de anticorpos específicos anti-PVS

nesses animais revela também imunocompetência. De acordo com Mengeling, 1992, a ausência ou apenas discretos sinais clínicos gerais nas fêmeas que apresentam aborto, diferenciam a infecção por PVS daquelas ocasionadas por outros agentes infecciosos. Nestes casos, haveria uma infecção aguda das porcas pelo PVS com sua disseminação intra-uterina (LAGER; MENGELING; LIU, 1992), ocasionando a morte de fetos em ambos os cornos uterinos, de forma a impedir a progressão da gestação. Neste estudo, dos oito fetos abortados apenas um foi negativo na IH (Tabela 1). Nesses animais, também o título de anticorpos não interfere para o resultado da *nested*-PCR (Tabela 8). Uma observação ainda com relação aos fetos abortados, mostra que 71,5% dos testes de *nested*-PCR foram positivos já no primeiro ciclo de amplificação (APÊNDICE D). Isso sugere uma carga viral maior, quando comparados fetos abortados com fetos mumificados e/ou natimortos. Concluindo, a IH é um método simples, pouco oneroso e eficaz na detecção de anticorpos anti-PVS em fetos natimortos, abortados ou mumificados de suínos.

Outro teste proposto para relacionar PVS e problemas reprodutivos em suínos foi a imunoperoxidase. Nesse caso, após os testes iniciais de padronização em células SK6 infectadas com PVS, e confirmação da reatividade e especificidade do anticorpo monoclonal, cortes de pulmão, coração e timo dos fetos em estudo foram analisados. A imunomarcação foi observada em células isoladas no pulmão (73,3% das amostras analisadas) (Figura 9) e em agrupamentos de células no coração (16,6%) e timo (63,6%). Não há publicações disponíveis que relatam o uso desta metodologia na detecção de PVS em fetos de suínos. Porém, alguns autores aplicaram a imunofluorescência a tecidos de animais inoculados experimentalmente ou a amostras de campo e também concluem pela identificação de células isoladas pulmonares do tipo macrófagos como locais de multiplicação viral (JOO, et al., 1977, MENDELING, et al., 1991). As células do músculo cardíaco apresentam-se em uma rede tridimensional que se interligam por junções (BANKS, 1993). Este padrão celular, corresponde à imunomarcação em múltiplas células vizinhas encontradas no coração (Figura 10). Esse padrão é mais fácil de ser visualizado do que aquele de células individuais do pulmão. No timo, células estromais, conhecidas como retículo-epiteliais, estão marcadas (Figura 11). Pelo fato do timo ser o primeiro órgão linfóide que se desenvolve nos fetos (TIZARD, 2002), deve também ser um dos alvos para os vírus em virtude de alta taxa de mitose celular, necessária para formação do tecido de sustentação para a

população de linfócitos T. Alta carga viral de amostra patogênica de PVS, foi detectada em timo e rim por real-time PCR (WILHELM, et al, 2005).

A replicação de PVS ocorre no núcleo celular, quando no final da fase S da mitose celular. Esta dependência celular está relacionada com aspectos da patogênese viral. Em suínos, está claramente definido o tropismo de PVS para os tecidos fetais no período gestacional e, no caso de animais adultos, para os tecidos linfóides e epitélio intestinal que também oferecem a mesma condição de permissividade (MURPHY, et al., 1999). Em 1988, Ridpath e Mengeling, verificaram por estudos *in vitro*, que a restrição de PVS a algumas células do hospedeiro é resultado de eventos intracelulares, e não da ligação na superfície celular. Porém, esta não parece ser a única condição que determina o tropismo tecidual em fetos. Para duas cepas patogênicas de PVS infectando fetos no final da gestação (*late term*), há diferenças no tropismo tecidual: para a amostra Kresse (altamente virulenta), o DNA dupla fita viral, portanto de vírus em multiplicação, é detectado em um maior número de tecidos (fígado, baço e cérebro) do que o DNA dupla fita da amostra NADL-8 (menos virulenta que Kresse), detectado apenas no fígado (ORAVEERAKUL; CHOI; MOLITOR, 1993).

Apesar da não análise estatística comparando a imunoperoxidase com os outros testes para a detecção de PVS em fetos de suínos, concluímos que, mesmo com a menor positividade para o coração, é nesse órgão que há maior facilidade de leitura, enquanto que o pulmão é aquele com maior positividade. Assim, seria sempre necessária a análise de pelo menos dois tecidos. De maneira geral, testes imunohistoquímicos têm a vantagem sobre testes moleculares como *nested*-PCR, pela possibilidade da identificação do local de multiplicação viral e visualização das lesões típicas associadas ao agente etiológico. Ainda como vantagem, tem o fato de não exigir equipamentos sofisticados para a sua realização. No entanto, a imunohistoquímica é laboriosa, relativamente onerosa e consome um tempo grande para a sua conclusão.

PVS foram detectados em 27 dos 28 fetos analisados por *nested*-PCR em cinco tecidos fetais diferentes (Tabela 3). Dado o grande número de fetos positivos no teste, foi recomendado o sequenciamento de algumas amostras, para confirmar que o produto da segunda amplificação (*nested*-PCR) equivaleria a PVS. Após confirmada a especificidade dos iniciadores a metodologia pode ser aplicada para todas as amostras em teste. Por ser um teste

de resposta rápida e específica, pouco oneroso e de fácil realização, pode ser o teste de escolha na detecção de PVS em grande número de amostras.

Não houve diferença significativa para a detecção de PVS entre fetos natimortos, abortados e mumificados (Tabela 4), porém, quando analisadas as diferenças quanto aos tecidos houve significância (Tabela 5). O pulmão e o coração apresentaram maior frequência para a presença do gene da proteína NS-1 do PVS, o que confirma dados anteriormente obtidos por Soares e colaboradores (1999). A maioria dos fetos foi analisada em até três ou mais tecidos (APÊNDICE D) e, em praticamente todos eles, a reação foi positiva. Apesar de não termos dados sobre a quantificação viral em cada tecido, o achado sugere para infecções por cepas patogênicas, dada a sua disseminação nos diferentes tecidos. Pela técnica de Real-Time PCR, Wilhelm e colaboradores (2005), relatam que cepas virulentas são encontradas em mais tecidos nos fetos infectados por via transplacentária, além da maior quantidade de vírus. Quando se analisa a frequência de resultados positivos em *nested*-PCR e a idade gestacional inferida dos fetos, no total de tecidos analisados, há diferença estatisticamente significativa (Tabela 6). Naqueles animais com até 99 dias de idade a frequência de positividade dos tecidos foi de 94,7% contra 55,5% dos animais acima de 100 dias de idade. Isso sugere por maior disseminação de PVS nos animais mais jovens, ou pela sua não permanência, em determinados órgãos, em função da atividade do sistema imune. Ressalte-se que mesmo com o *nested*-PCR positivo em todos os animais, a escolha do tecido para o teste é fundamental, já que apenas 55,5% dos tecidos de fetos mais velhos ainda mantinham o DNA viral intacto ou em níveis capazes de serem detectados por essa técnica (RIMSTAD; EVENSON, 1993). Também há diferença estatisticamente significativa para a detecção do DNA viral quando a análise foi feita em fetos oriundos de porcas com ordem de parto menor (92,28% de positividade) ou daquelas com quatro ou mais partos (65,43%) (Tabela 7). Isso pode estar associado ao número de vacinações a que as porcas são submetidas. A vacinação do rebanho suíno com vacinas de vírus inativado, aplicada já há tempos em criações comerciais, segue protocolos padronizados, com pelo menos uma dose antes da cobertura e outra durante a gestação. Para machos recomenda-se a imunização a cada seis meses. Os animais vacinados soroconvertem entre 5 a 6 dias (BROWN; PAUL; MENGELING, 1980). Porém, há relatos que essas vacinas não protegem contra a infecção de maneira eficaz para impedir a infecção do feto (HUYSMANN et al, 1992; BERGERON, HÉBERT e TIJSSEN, 1996). Esses últimos

autores relatam diferenças em cinco aminoácidos na região codificadora de VP1/VP2 na cepa Kresse e em outras cepas patogênicas, quando comparadas à cepa vacinal NADL-2. Também, identificam um dos resíduos na região mais acessível do capsídeo viral, que pode ter relação com o tropismo celular e, portanto, deve ser alvo da neutralização pelos anticorpos. Os experimentos de Lager, Mengeling e Liu (1992), mostram maior patogenicidade da cepa NADL-8 em fetos imunocompetentes infectados aos 72 dias, em relação à cepa Kresse. Logo, variantes antigênicas de PVS além da amostra vacinal, estão possivelmente em circulação nas diferentes granjas, infectando porcas e evadindo da resposta imune (ZEEUW, 2007). As fêmeas mais jovens, e com ordem de parto menor, teoricamente foram submetidas a um número menor de infecções anteriores. Nesses casos, a disseminação de PVS na própria porca e para os fetos é maior, já que se essas variantes antigênicas irão se evadir do sistema imune. Títulos de anticorpos vacinais após duas aplicações são considerados protetores e a não passagem transplacentária do PVS depende da presença de anticorpos neutralizantes. Estudos com isoladas de PVS de diferentes rebanhos precisam ser realizados quanto à região que codifica para VP2, buscando respostas para a variabilidade de cepas e sua circulação no país.

No presente estudo conclui-se que PVS estão associados a casos de falhas reprodutivas em rebanhos de suínos no Brasil, apesar da vacinação rotineira. Mesmo não tendo sido pesquisados outros agentes, os dados obtidos indicam a necessidade de mudanças quanto às vacinas utilizadas, buscando maior proteção dos fetos suínos.

6. CONCLUSÕES

- Não há diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de fetos (NM, Ab, Mu), para a presença do PVS, porém aponta uma tendência para uma frequência maior em fetos natimortos (Ac).
- O PVS foi detectado com maior frequência em pulmão (96,7%) e coração (93,3%) pelo *nested*-PCR, indicando o bloco cardio-respiratório como órgãos de eleição para a detecção viral.
- A alta homologia dos fragmentos clonados e seqüências gênicas do PVS, comprovam o *nested*-PCR padronizado para a detecção da região codificadora da proteína NS1 e a especificidade dos primers para o PVS.
- A detecção de anticorpos anti-PVS indicou a imunocompetência em 93,4% dos fetos analisados, confirmando sua idade fetal acima de 70 dias.
- A detecção do PVS nos tecidos independeu da presença e título de anticorpos anti-PVS presente nos fetos.
- A alta prevalência do PVS nos fetos imunocompetentes (*late-term*), sugere pela presença de uma cepa virulenta responsável pela morte fetal - *Indicado isolamento viral e caracterização molecular e antigênica*.
- O teste de imunoperoxidase evidenciou antígenos do PVS em especial no pulmão e timo de fetos suínos, mesmo na presença de anticorpos anti-PVS.
- Porém, a imunodeteção em múltiplas células no miocárdio, facilitam sua evidenciação no coração. Indica-se a aplicação da metodologia sempre em pelo menos dois tecidos, incluindo o pulmão e/ou timo.

CONCLUSÕES FINAIS

Parvovírus suínos estão associados a problemas reprodutivos em porcas de criações comerciais no Brasil, pela análise de fetos natimortos, abortados e mumificados obtidos de fêmeas dessas criações.

Ainda, como conclusões dessa investigação, tem-se:

1. A inibição da hemaglutinação é um método simples, pouco oneroso e eficaz na detecção de anticorpos anti-PVS em fetos natimortos, abortados ou mumificados de suínos.
2. A imunohistoquímica, apesar de laboriosa e relativamente onerosa, foi eficiente na detecção de antígenos de PVS em diferentes tecidos de fetos de suínos;
3. O *nested*-PCR foi a metodologia que identificou PVS em maior número de fetos, independente da sua classificação. A técnica é de fácil manuseio, pouco onerosa e indicada para estudos envolvendo grande número de amostras. Permite a detecção em amostras de fetos com menor grau de conservação tecidual.

REFERÊNCIAS

ABIPECS. Levantamento Sistemático da Produção e Abate de Suínos (LSPS) – Abipecs e Embrapa. <http://www.abipecs.org.br>, 2007.

ALLAN, G.M.; KENEDY, S.; McNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.Á.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 1, p. 1 – 11, 1999.

ALBINA, E. Epidemiology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS): an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 55, p. 309 - 316, 1997.

ALTSCHUL, S.F.; THOMAS, L.; MADDEN, A.A.; SCHÄFFER, J.Z.; ZHENG, Z.W.M.; DAVID, J.L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389 - 3402, 1997.

BANKS, W.J. **Applied Veterinary Histology**. 3ed, Mosby Year Book, 1993. p. 177 – 181; 289-292.

BERGERON, J.; HÉBERT, B.; TIJSSEN, P. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. **Journal of Virology**, v. 70, n. 4, p. 2508 - 2515, 1996.

BERSANO, J.G.; SCHOTTEN, M.H.S.; KROEFF, S.S.; BASTOS, G.M. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para parvovirus suíno no Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 6., São Paulo, SP. **Resumos**, p. 17, 1993.

BERSANO, J.G.; BASTOS, G.M.; SOARES, R.M.; KROEFF, S.S.; CATROXO, M.H.B.; SIMONI, I.C. Isolamento e identificação de parvovírus suíno (PVS) no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 62 (supl.), p. 37, 1995.

BOLT, D.M.; HÄNI, H.; MÜLLER, E.; WALDVOGEL, A.S. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, p. 107 - 118, 1997.

BOURNE, J.A. **Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods**. DAKO Corporation, 1983.

BROLL, S.; WALDVOGEL, A.S.; ROSSKOPF, M.; CORBOZ, L.; POSPISCHIL, A. Untersuchung zu infektiösen Ursachen für Aborten und Totgeburten beim Schwein in der Schweiz. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, p. 41 – 53, 1993.

BROWN, T.T.; PAUL, P.S.; MENGELING, W.L. Response of conventionally raised weanling pigs to experimental infection with a virulent strain of porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1221 - 1224, 1980.

CAPPELLARO, C.E.M.P.D.; BERSANO, J.G.; CATROXO, M.H.B.; MUELLER, S.B.K.; CARVALHO, O.M. Parvovirus-like particles in abortive fetuses of swine. 5a virológica, 1995.

CARLAN, M.C.; ROEHE, P.M.; OLIVEIRA, L.G. A reação da polimerase em cadeia na detecção do parvovírus suíno. **VIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, p. 223 - 224, 1997.

CARTWRIGHT, S.F.; HUCK, R.A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. **Veterinary Record**, v. 81, p. 196 - 197, 1967.

CHANIAGO, T.D.; WATSON, D.L.; OWEN, R.A.; JOHSON, R.H. Immunoglobulins in blood serum of foetal pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 1, p. 30 - 33, 1978.

CHOI, S.S.; MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; GUNTHER, R. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 15, p. 19 - 29, 1987.

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

DEA, S.A.; BILODEAU, R.; MARTINEAUS, G.P. Isolation of encephalomyocarditis virus among stillborn and post-weaning pigs in Quebec. **Archives of Virology**, v. 117, p. 121 - 128, 1991.

DIAL, G.D.; MARCH, W.E.; POLSON, D.D.; VAILLANCOURT, J.P. Reproductive failure: differential diagnosis. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 7ed. Ames: Iowa State University, 1992. p. 88 - 136.

DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1615 - 1627, 1992.

DROLET, R.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; RIBOTTA, M.; HIGGINS, R. Infectious agentes identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. **Veterinary Record**, v. 150, n. 5, p. 139-143, 2002.

ELLIS, J.; KEAKOWKA, S.; LAIRMORE, M. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 3 - 14, 1999.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A. In: _____. **Fields Virology**. 3ed. Lippincott: Raven Publishers, 1996. p. 2199 - 2220.

FLOSS, J.L. Infections causes of infertility in sows. **Agr. Public.** GO2315. 1993.

GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A.P.; BERSANO, J.G.; CARRASCO, S.; CARDOSO, M.V.; SOUZA, C.A.I. Causas bacterianas de abortamento em suínos examinados no Instituto Biológico, no período de 1985 a 1995. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 62, supl. 23, p. 1-98, 1995.

GOUVEIA, A.M.G.; GOMEZ, M.C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação para parvovírus suíno no Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 17 - 22, 1984.

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

GRADIL, C.; MOLITOR, T.; HARDING, M.; CRABO, B. Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 3, p. 359 - 362, 1990.

HEBERT, B.; DUBUC, R.; BERGERON, J.; MARSOLAIS, G.; TIJSSEN, P. Molecular basis of pathogenesis and tropism differences among porcine parvovirus strains. In: **14 th IPVS Congress. Proceedings**. Bologna Italy, 1996. p 122.

HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L. Behavioral responses affecting gilt and sow reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility** suppl. 40, p. 343 - 354, 1990.

HUYSMAN, C.N.; van LEENGOED, L.A.M.G.; de JONG, M.C.M.; van OSTA, A.J.M. Reproductive failure associated with porcine parvovirus in an enzootically infected pig herd. **Veterinary Record**, v. 131, p. 503 - 506, 1992.

HOGG, G.G.; LENGHAUS, C.; FORMAN, A.J. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, p. 539 - 549, 1977.

HOLLER, L.D. Diagnosis of swine abortion. **Journal of Swine Health and Production**, v. 2, n. 6, p. 29 - 31, 1994.

JENKINS, C.E. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues. **Journal of Virological Methods**, v. 39, p. 179 - 184, 1992.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. **Archives of Virology**, v. 51, p. 123 - 129, 1976a.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 422-424, 1976b.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. Rapid diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified foetuses. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 51-52, 1976c.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H.; CAMPBELL, R.S.F. Pathogenesis of porcine parvovirus infection: pathology and immunofluorescence in the foetus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, p. 383 - 391, 1977.

KALCKAR, H.M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 167, p. 461 - 475, 1947.

KATZ, J.B.; van DEUSEN, R.A. Radioimmunoassay of adjuvant-associated porcine parvovirus using a monoclonal antibody in a nitocellulose membrane system. **Journal of Virological Methods**, v. 12, p. 193 - 198, 1985.

KIRKBRIDE, C.A.; McADARAGH, J.P. Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 4, p. 480 - 483, 1978.

KOENEN, F.; VANDERHALLEN, H. Comparison of the pathogenic, antigenic and molecular characteristics of two encephalomyocarditis virus (EMCV) isolates from Belgium and Greece. **Research of Veterinary Science**, v. 62, p. 239 - 244, 1997.

KRESSE, J.I.; TAYLOR, W.D.; STEWART, W.W.; EERNISSE, K.A. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 525 - 531, 1985.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L.; LIU, W. Comparison of virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, n. 3, p. 245 - 248, 1992.

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R. Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin-fixed tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 540 - 543, 1995.

LIEBERMANN, H.; HILLE, G.; OEHME, G.; FERKO, B. Die Parvovirusinfektion des schweines (Literaturübersicht). **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, v. 42, n. 6, p. 890 - 904, 1988.

LUCAS, M.H.; NAPHTHINE, P. Fluorescent antibody technique in the study of three porcine viruses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 81, p. 111 - 117, 1971.

MACHUCA, M.A.; ARMOCIDA, A.D.; IDIART, J.R.; VENTURINI, M.C.; SANGUINETTI, H.R.; MASSONE, A.R.; Di LORENZO, C.; SALAS, L.; ECHEVERRIA, M.G.; BACIGALUPE, D.; PERFUMO, C.J. Stillborn piglets: anatomopathological

characterization and immunoserological studies in three intensive management farms. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 31, n. 2, p. 243 – 248, 1999.

MAHAN, D.C. Mineral nutrition of the sow : a review. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 2, p. 573 - 582, 1990.

MALDONADO, J.; SEGÁLES, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **The Veterinary Journal**, v. 19, n. 3, p. 454-456, 2005.

MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, p. 2239 – 2248, 1972.

MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: frequency of naturally transplacental infection and viral contamination of fetal porcine kidney cell culture. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 41, 1975.

MENGELING, W.L.; CUTLIP, R.C. Pathogenesis of utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 1173 - 1177, 1975.

MENGELING, W.L.; CUTLIP, R.C. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1393 - 1400, 1976.

MENGELING, W.L.; PAUL, P.S.; BROWN, T.T. Transplacental infection and embryonic death following maternal exposure to porcine parvovirus near the time of conception. **Archives of Virology**, v. 65, p. 55 - 62, 1980.

MENGELING, W.L.; PEJSAK, Z.; PAUL, P.S. Biological assay of attenuated NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 2403 - 2407, 1984.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; ZIMERMANN, J.K.; SAMARIKERMANI, N.; BERAN, G.W. A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 1, p. 33 - 35, 1991.

MENGELING, W.L. Porcine parvovirus infection. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 7ed. Ames: Iowa State University, 1992. p. 299 – 311.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 1391 - 1398, 1994.

MENGELING, W.L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A.C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, v. 60-6, p. 199-210, 2000.

MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; COLLETT, M.S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. **Journal of Virology**, v. 45, p. 842 - 854, 1983.

MOLITOR, T.W.; ORAVEERAKUL, K.; ZHANG, Q.Q.; CHOI, C.S.; LUDERMANN, L.R. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for detection of porcine parvovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 32, p. 201 - 211, 1991.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. Parvoviridae. In: _____. **Veterinary Virology**. 3ed. London: Academic Press, 1999. p. 343-356.

NELDER, J.A.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society, Series A**, v. 135, n. 3, p. 370 - 384, 1972.

OBALDIA, N. Outbreaks of porcine parvovirus disease in Panama. **Tropical Animal Health and Production**, v. 23, p. 181 - 185, 1991.

ORAVEERAKUL, K.; CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W. Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. **Archives of Virology**, v. 130, p. 377-389, 1993.

PLANA, J.; VAYREDA, M.; VILANOSA, J.; BASTONS, M.; ROSELL, R.; MARTINEZ, M.; SAN GABRIEL, A.; PUJOLS, J.; BADIOLA, J.L.; RAMOS, J.Á.; DOMINGO, M. Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. **Veterinary Microbiology**, v. 33, p. 203 - 211, 1992.

QING, L.; LV, J.; LI, H.; TAN, Y.; HÃO, H.; CHEN, Z.; ZHAO, J.; CHEN, H. The recombinant nonstructural polyprotein NS1 of porcine parvovirus (PPV) as diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated pigs. **Veterinary Research Communication**, v. 30, n. 2, p. 175 - 190, 2006.

RANZ, A.I.; MANCLUS, J.J.; DIAZ-AROCA, E.; CASAL, J.I. Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 2541 - 2553, 1989.

RIDPATH J.F., MENGELING, W.L. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. **Virus Research**, v. 10, n.1, p.17 - 27, 1988.

RIMSTAD, E.; EVENSEN, O. The identification of equid herpesvirus 1 in paraffin-embedded tissues from aborted fetuses by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 174 - 183, 1993.

RITZMANN, M.; WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; ETSCHMANN, B.; BOGNER, K.H.; SELBITZ, H.J.; HEINRITZI, K.; TRUYEN, U. Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets. **Deutsche Tierarztl Wochenschrift**, v. 112, n. 9, p. 348 – 351, 2005.

RODRIGUEZ, C.A.R.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, Estado do Pará. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 501 - 503, 2003.

SCHNEIDER, L.G.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Natimortalidade na suinocultura industrial. **Suplemento técnico da Revista CFMV**, ano VII, v. 23, p. 41-50, 2001.

SCHULTHEISS, P.C.; COLLINS, J.K.; CARMAN, J. Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 12 - 15, 1993.

SHI, S-R.; KEY, M.E.; KALRA, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 741-748, 1991.

SOARES, R.M.; DURIGON, E.L.; BERSANO, J.G.; RICHTZENHEIM, L.J. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay, using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS1. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 191-198, 1999.

SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; MARTINS, V.G.; BACCI, Jr. M.; FERNANDES, F.M.C.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. **Journal of General Virology**, v. 84, p.1505-1515, 2003.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N.; MORES, N.; OLIVEIRA, S.J.; CARVALHO, L.F.O.S.; MORENO, A.M.; ROEHE, P.M. **Clínica e Patologia Suína**. 2ed. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 1999. 464p.

SOLIMAN, A.K.; WATTS, D.M.; SALIB, A.W.; SHEHATA, A.E.D.; ARTHUR, R.R.; BOTROS, B.A.M. Application of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of arboviral antibodies. **Journal of Virological Methods**, v. 5, p. 147 –151, 1997.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária*. 6ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; MANDEL, L.; TREBICHAUSKY, I.; KOVARU, F.; BAROT, B.; STERZL, J. Development of immune responses in early pig ontogeny. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 43, p135 – 142, 1994.

VANACKER, J-M.; ROMMELAERE, J. Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanisms. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 291-297, 1995.

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.; BROEHUIJSEN, J.M.; MOONEN, P.L.J.M.; ZETSTRA, T.; de BOER, E.A.; TIBBEN, H.J.; de JONG, M.F.; van't VELD, P.; GROENLAND, G.J.R.; van GENNEP, J.A.; VOETS, M.; VERHEIJEN, J.H.M.; BRAAMSKAMP, J. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. **The Veterinary Quarterly**, v. 13, p. 121 - 130, 1991.

WESTENBRINK, F.; VELDHUIS, M.A.; BRINKHOF, J.M.A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus. **Journal of Virological Methodes**, v. 23, p. 169 - 178, 1989.

WILHELM, S.; ZEEUW, E.J.L.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Tissue distribution of two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 52, n. 7-8, p. 323 - 326, 2005.

ZEEUW, E.J.L.; LEINECKER, N.; HERWIG, V.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Study of virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 420 – 427, 2007.

ZINKERNAGEL, R. M.; KELLY, J. How antigen influences immunity. **Research Trends**, v.5/4, p. 114 – 120, 1997.

ZIMMERMAN, P.; RITZMANN, M.; SELBITZ, H-J.; HEINRITZI, K.; TRUYEN, U. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 295-301, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Classificação dos 39 fetos suínos, de acordo com a sua apresentação clínica.

Apresentação clínica	Número Total	%
NM	22	56,4
Ab	10	25,6
Mu	07	17,9

NM = natimorto; Ab = abortado; Mu = mumificado

Classificação dos 39 fetos suínos, de acordo com a idade gestacional.

Idade fetal	Número Total	%
Grupo A	27	69,2
Grupo B	09	23,0
Desconhecida	03	7,6

A = 70 a 99 dias ; B = $\geq$ 100 dias

Classificação dos 39 fetos suínos, de acordo com a ordem de parto das porcas.

Ordem de parto	Número Total	%
Grupo J	17	43,58
Grupo V	20	51,3
Desconhecida	02	5,1

J = porcas de 1 a 3 partos; V = porcas com 4 ou mais partos

APÊNDICE B

Número do feto de suíno e os testes a que foram submetidas para a detecção de parvovírus suíno (IH = Inibição da Hemaglutinação, IP = Imunoperoxidase indireta, *nested*-PCR = Reação em cadeia da polimerase).

Núm. Feto	IH	IP	<i>nested</i> -PCR
1	X	X	X
2	X		
3	X		
4	X	X	
5	X		X
6	X	X	X
7	X		X
8	X		X
9	X	X	X
10	X	X	X
11	X	X	X
12	X	X	X
13	X	X	X
14	X	X	X
15		X	
16	X		
17	X	X	
18	X		
19	X		
20		X	
21	X	X	X
22	X		X
23	X		X
24			X
25			X
26	X		X
27			X
28			X
29	X		X
30	X		X
31	X		X
32	X		X
33			X
34			X
35	X	X	X
36	X	X	X
37	X		
38	X		
39			X
Total	30	15	28

APÊNDICE C

Títulos da prova de Inibição da Hemaglutinação (IH) aplicada em líquidos torácicos de fetos suínos.

Núm. Feto	Título IH
1	1:64
2	1:32
3	1:128
4	1:256
5	1:256
6	1:128
7	1:128
8	1:256
9	1:64
10	1:128
11	1:128
12	1:64
13	1:128
14	NEGATIVO
16	1:128
17	1:32
18	1:64
19	1:64
21	1:512
22	1:512
23	1:256
26	1:128
29	1:256
30	1:128
31	1:512
32	1:256
35	1:1024
36	NEGATIVO
37	1:4
38	1:32

APÊNDICE D

Resultados das reações em cadeia da polimerase (primeira ciclo de amplificação e segundo ciclo de amplificação) para o gene da proteína não estrutural NS-1 de parvovírus suíno, em amostras de tecidos de fetos de suínos.

Núm. Feto	Pulmão		Coração		Baço		Timo		Rim	
	PCR	n-PCR	PCR	n-PCR	PCR	n-PCR	PCR	n-PCR	PCR	n-PCR
1	-	+	-	-	:	:	:	:	-	-
5	+	+	-	+	-	-	:	:	-	-
6	-	+	-	-	-	-	:	:	-	+
7	-	+	-	+	-	-	:	:	:	:
8	+	+	+	+	:	:	:	:	:	:
9	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
10	+	+	-	+	-	+	-	+	:	:
11	+	+	-	+	-	-	-	+	:	:
12	+	+	-	+	-	-	-	+	:	:
13	-	+	-	+	:	:	:	:	:	:
14	-	+	-	+	:	:	:	:	:	:
21	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
22	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
23	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	:	:	:	:	:	:
25	-	+	-	+	:	:	:	:	-	+
26	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
27	-	+	-	+	-	+	:	:	+	+
28	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
29	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
30	-	+	-	+	-	+	-	+	:	:
31	-	+	-	+	-	+	:	:	-	+
32	-	+	-	+	-	+	-	-	:	:
33	-	+	-	+	-	+	:	:	:	:
34	-	+	-	+	-	+	:	:	-	+
35	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
36	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
39	-	+	-	+	-	+	:	:	:	:
Total	7	26	2	25	2	15	0	11	2	12

+= reação positiva

- = reação negativa

: = amostra não testada

APÊNDICE E***Artigo*****Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses****Wolf, VHG^{1*}, Menossi, M², Mourão, GB³, Gatti, MSV¹**

Artigo aceito para publicação
Genetic and Molecular Research
2008

Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses

Wolf, VHG^{1*}, Menossi, M², Mourão, GB³, Gatti, MSV¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, C.P. 6109, State University of Campinas - Unicamp – 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Department of Genetics and Evolution, , Institute of Biology, C.P. 6109, State University of Campinas - Unicamp – 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

³Department of Exact Sciences, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of São Paulo - USP - 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil.

*Corresponding author: telephone and fax +55-19-32940849; email: verenagw@terra.com.br

Reproductive failures are still common grounds for complaint by commercial swine producers. Porcine parvovirus (PPV) is associated with different clinical reproductive signs. The aim of this study was to investigate PPV fetal infection at swine farms having ongoing reproductive performance problems. Viral presence in fetal tissues was determined by nested-PCR (n-PCR) assay directed to the conserved NS1 gene of PPV in aborted fetuses, mummies and stillborns. Fetuses show a high frequency of PPV infection (96.4 %) (n=28). In 60.7 % of the fetuses, PPV were detected in all tissue samples (lung, heart, thymus, kidney and spleen). Viral infection differed among fetal tissues, with a higher frequency in the lung and heart ($p < 0.05$). Fetuses with up to 99 days gestational age and from younger sows showed a higher frequency of PPV ($p < 0.05$). No significant difference in PPV presence was detected among the three clinical presentations. The results suggest that PPV remains an important pathogenic agent associated with porcine fetal death.

Key words: swine, porcine parvovirus, nested-PCR, abortion, stillbirth, mummification.

INTRODUCTION

Swine reproductive failures are often inconclusive about their origin. In early- and late- term fetal death, the involvement of infection should be investigated. Different infectious agents cause similar clinical signs and impair diagnosis (Clark, 1996; Kirkbride and McAdaragh, 1978). Clinical signs such as abortion, fetal mummification and stillbirth are common records by commercial swine producers and associated with porcine parvovirus infection throughout the world. Infection of sows with PPV by the oronasal route or via experimental infection of fetuses, does not result in significant clinical signs in the dam (Hogg *et al.*, 1977; Mengeling *et al.*, 2000). After viremia, the virus usually crosses the placenta and infects the developing conceptus due to predilection for actively dividing cells. In sows with specific circulating PPV antibodies, transplacental infection may be inhibited. However, spreading of the virus *in utero* could not be prevented by maternal antibodies (Lager and Mengeling, 1992).

Porcine parvovirus (PPV), a member of the subfamily *Parvovirinae* and genus *Parvovirus*, represents an autonomous replicative virus with a single-stranded DNA genome of about 5200 bp. The nonenveloped icosahedral virus of 18-25 nm is formed by three structural proteins (VP1-VP3) and one nonstructural protein (NS1). Two large open reading frames (ORFs) were identified, where the right ORF encodes the three capsid proteins and the left ORF encodes the NS1 protein. NS1 is highly conserved, with striking homology among

PPV species (Ránz *et al.*, 1989). Differences in pathogenesis among PPV strains were observed in experimental infections, mainly in late-term gestation when fetuses could survive to PPV infection due to immune response (Chaniago *et al.*, 1978; Lager and Mengeling, 1992). Clinical diagnosis of PPV infection has become more difficult after the proof of the late-term virulence capability of PPV.

Genetic variability of PPV isolates has been demonstrated in VP2 protein, and recent experimental studies suggest the presence of a new antigenic variant or type of PPV from field isolates (Soares *et al.*, 2003; Zeeuw *et al.*, 2007).

The classical methods to confirm fetal infection by PPV are virus isolation, tissue extract hemagglutination and the immunofluorescence test which detects viral antigen in lungs (Joo *et al.*, 1977; Mengeling *et al.*, 1991). The use of the hemagglutination-inhibiting (HIA) assay to detect anti-PPV specific antibodies has been reported in 56-70 day-old fetuses (Hogg *et al.*, 1977). Meanwhile, the detection of viral nucleic acid in fetuses, especially after natural transplacental infection, showed more reliable results (Molitor *et al.*, 1991; Soares *et al.*, 1999).

The detection of PPV in dead immunocompetent fetuses using the nested-PCR (n-PCR) directed to the conserved NS1 gene, could provide information about PPV infection and viral tissue distribution in swine reproductive diseases.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Twenty-eight dead fetuses were collected from ten commercial swine farms located in the three Brazilian states, São Paulo (n = 5), Minas Gerais (n = 3) and Paraná (n = 2), where these farms had an ongoing history of reproductive problems. The frequent grounds for complaint among the swine producers were return to estrus (> 10 %), stillbirth (> 5 %), abortion (> 3 %), mummification (> 2 %) and fewer liveborn piglets (< 10). At all the farms, inactivated vaccines were routinely used to prevent PPV infection in the pregnant pig.

The fetuses were classified according to clinical presentation as abortion (Ab), mummies (Mu) and prepartum stillbirth (Sb), originating from young (Y = 1-3 parturitions) and older sows (O = > 4 parturitions). The fetuses were also classified according to gestational age (estimated by crown-rump measure) into group A (70-99 days) and B ($\geq$ 100 days) (Table 1). Fetuses showed normal gross appearance, dark outer coloration with edema or typical mummification.

Sample, DNA extraction and amplification

A total of 108 tissue fragments of lung (L), heart (H), thymus (T), kidney (K) and spleen (S), were individually collected and frozen at -70°C until tested by nested-PCR assay (Table 1). To avoid cross-contamination between samples a new set of sterile instruments was used for each sample. Twenty-three samples of fetal thoracic fluids were collected to be assayed by hemagglutination inhibition assay (HIA).

The tissue samples and PPV prototype (strain NADL-2 EMBRAPA-Concórdia, Brazil) cultured in the swine kidney cell line SK6, were homogenized in 20 % (v/w) phosphate buffered saline (0.01 M, pH 7.4). The homogenates were frozen three times and clarified at 2000 x g for 20 min at 4°C. The extractions were carried out as follows: added to 130 µL tissue homogenate supernatant were 40 µL of TNE buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, pH8.0), 20 µL of 10 % SDS and 10 µL of proteinase K (Sigma 10 mg/mL). After overnight incubation at 37°C, DNA extractions were carried out with phenol/chloroform (1:1) and refrigerated centrifugation at 11,600 x g. Fresh chloroform was added and centrifugation repeated. DNA precipitation was performed with 95 % ethanol for 18 h at -20°C and pellets were diluted in 25 µL sterile distilled water and stored at -20°C until the nested-PCR reaction.

The amplification of the non-structural protein gene (NS1) by nested-PCR was carried out based on the procedure described by Soares *et al.* (1999) with the following modification: initial heating at 95°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for 60 s, and final extension at 72°C for 10 min. Nested- PCR products of 137 bp were electrophoresed in 2 % agarose gels in standard TBE (0.045 M Tris-borate, 1 mM EDTA) and stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide.

Cloning and sequence analysis

The nested-PCR amplified products of 137 bp from lungs of stillborns and mummies (n = 4) were excised from the gels, purified and cloned into the plasmid vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA). Sequencing was performed with the same primers used for DNA amplification (Soares *et al.*, 1999) using the *Big Dye*™ Terminator-cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The sequences were determined with the automated sequencer (ABI PRISM 310) according to the manufacturer's instructions. The four NS1 PPV sequences obtained from this study were aligned with three sequences from GenBank, using BLASTN 2.2.3 (Altschul *et al.*, 1997).

Hemagglutination inhibition assay (HIA)

Clarified and heat-inactivated fetal thoracic fluids were added to a 10 % guinea pig erythrocyte suspension at 4°C for four hours. Four hemagglutinating units of viral antigen prototype were added to serially diluted fluids. After sixty minutes incubation at room temperature, 0.8 % guinea pig erythrocyte suspension was added (Gouveia *et al.*, 1984; Rodriguez *et al.*, 2003). Total inhibition of hemagglutination reaction in positive controls determined the end point for HI titer. Titers $\geq 1:16$ were considered positive for the presence of anti-PPV specific antibodies. Sow sera were used as positive controls (HI titer 1:2048) and sera of colostrum-deprived piglets as negative controls.

Statistical analyses

The model was adjusted utilizing the theory of generalized linear models proposed by Nelder and Wedderburn (1972), using the GLIMMIX procedure of SAS software. Mathematical expectation of $E[Y_t]$ equal to μ_t , becomes the linear expression applied by natural logarithm, obtaining a linear predictor, linked function on μ_t by logit. Adjustment of the model was performed considering a binomial distribution of the results of nested-PCR, with mean μ and variance σ^2 having the logarithm a link function, $\text{Ln}(t)$, with t being the explanatory variable. The model considered the fixed effects of the clinical presentation (fetuses), fetal tissue samples, fetal age group, sow classes and HIA titer results, as well as the effect of repeated measures in the fetus ($n=26$) with a structure of autoregressive covariance of first order, beyond the random residual effect.

Both interaction effects were not significant ($P>0.10$) and could not be estimated due to inappropriate distribution of the data; they were excluded from the final analysis model. The least square means were compared with the Student t-test, shown in the original scale, for easier interpretation.

RESULTS

PPV detection in fetal tissues

The nested-PCR reaction yielded a 137 bp fragment, identifying the NS1 gene of PPV genome in 89 out of 108 tissue samples of dead fetuses (Figure 1).

From the 28 dead fetuses evaluated, 27 were positive for PPV presence (96.4 %). Fetuses were considered positive for viral presence when at least one tissue sample was positive by nested-PCR reaction. PPV detection in tissue samples did not differ significantly for the three clinical presentations ($p > 0.05$). Nevertheless, PPV tended to be more frequent in the prepartum stillborns than in mummies and aborted fetuses (Table 2).

In 60.7 % of the fetuses, PPV genome was detected in all tissue samples (lung, heart, spleen, thymus and kidney). PPV was detected more frequently in lung (96.99 %) and heart (93.33 %), regardless of the fetus class. The spleen was less positive (54.91 %) ($p < 0.05$) (Table 3).

In dead fetuses with 70-99 days of gestation, the frequency of positive results for viral genome was higher (94.76 %) than in older fetuses (55.57 %) ($p < 0.05$) (Table 4). Tissues from fetuses of younger sows when compared to tissues from fetuses of older sows, showed 92.28 % and 65.43 % of positive results, respectively ($p < 0.05$) (Table 5).

From 23 thoracic fluids tested by HIA, 21 samples (91.30 %) were positive for anti-PPV specific antibodies. Stillborns showed the greatest HIA titers. No statistical difference was detected in nested-PCR results among fetuses with lower and higher HIA titers (Table 6).

Sequencing of amplified DNA

The sequence analyses of products with 137 bp from amplified NS1 gene of PPV by nested-PCR, showed high homology (90 %) with NS1 sequence of PPV strains (accession numbers AY502114, AY686601, U44978). The four sequences were performed at least twice to avoid artifacts.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Clinical expression and reproductive performance dates are first used in the diagnosis of reproductive disease in swine herds. Similar clinical expressions give rise to doubts about origin. For pathogen identification and their epidemiology in reproductive problems, the application of laboratory diagnostic methods is necessary. Among the viral reproductive pathogens in swine, parvovirus is a recognized important infectious agent (Gouveia *et al.*, 1984; Soares *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2003). In naturally infected swine herds, molecular methods to confirm PPV infection are indicated due to specificity and samples containing low amount of virus. The use of nested-polymerase chain reaction directed to the conserved NS1 gene, was able to detect PPV genome in the dead fetuses of several swine farms demonstrating an ongoing history of reproductive failures.

PPV has a requirement to replicate in cells in a permissive S-phase of DNA mitosis, and infection is cytolitic. Small litter size and mummification are the most typical clinical findings when fetuses are infected up to about 70 days of gestation, especially during an acute outbreak (Choi *et al.*, 1987; Clark, 1996; Mengeling, 2000). The infection is detected in fetal tissues, mainly in the lungs. Fetal immune competence after sixty to seventy gestational days could lead to immune response and surveillance (Liebermann *et al.*, 1988; Clark, 1996). The HIA assay detected specific anti-PPV antibodies in almost all fetuses (90.4 %). Evidence of immunocompetence due to fetal infection were apparently unable to prevent viral replication and fetal death. In aborted, mummified and stillborn fetuses, PPV was found in similar high frequency, independent of fetal gross appearance. PPV genome was present in all tissue samples of 60.7 % of the fetuses. Similar to previous reports (Soares *et al.*, 1999), this study demonstrated that the lung showed a high frequency of viral genome in fetuses collected in commercial swine herds.

Cellular permissivity differs among PPV strains. Differences in pathogenicity between PPV NADL-8 and Kresse strains in late-term gestation have been described, indicating the Kresse strain as more virulent (Choi *et al.*, 1987; Oraveerakul *et al.*, 1993). Comparing relative virulence of the same two prototype strains in experimentally infected porcine fetuses at immune competence age showed that the NADL-8 strain causes more fetal mortality (Lager and Mengeling, 1992). Tissue tropism of PPV, replication in selective sites and quantity of virus produced, may explain the distinction in pathogenesis. Viral antigen and viral DNA replication in the brain were demonstrated only in late-term fetal infection with the Kresse strain (Choi *et al.*, 1987; Oraveerakul *et al.*, 1993). In this study, the replicative form of PPV genome was not demonstrated in tissue samples and PPV was not investigated in nervous tissue, but the viral genome was detected in many tissues, showing evidence of PPV spreading

and tissue damage in transplacentally infected fetuses from vaccinated sows. Although there is a great difference in pathogenicity between different PPV strains, they share an identical genomic organization and a high degree of sequence identity. Molecular studies of PPV DNA have been carried out and a small variability in capsid protein is responsible for distinct biological properties (Bergeron *et al.*, 1996). Recent studies indicated genetic diversity in field strains and distinct genotypes of PPV (Soares *et al.*, 2003). Pathogenic types of PPV have to be further investigated and antigenic variants may explain low neutralization antibody activity (Zeeuw *et al.*, 2007). As younger sows seem to be more susceptible to PPV infection, sample collections are recommended from dams with up to three parturitions. Besides that, lung and heart are indicated as tissues of choice for PPV detection and diagnosis purpose in fetuses, independent of their clinical presentation. Live attenuated vaccines are not available in Brazil. Therefore, field isolates from reproductive disturbances should be considered pathogenic.

The effect of viral agents on porcine reproductive performance is a worldwide concern, but the identification of pathogens shows regional differences and selected swine reproductive diseases. PPV is clearly associated with embryonic death and increased number of mummified fetuses, but it was not directly associated with abortion until recently (Mengeling *et al.*, 2000). Afterwards, in a study about abortifacient viruses in Spain, PPV infection was not identified in tissues of aborted fetuses and stillborn neonates, using an antigen capture Elisa test (Maldonado *et al.*, 2005). Also, the porcine reproductive and respiratory syndrome virus is not recognized as a reproductive pathogen in Brazil, and a complete study of the effect of porcine circovirus type 2 (PCV-2) on swine reproductive failures has not yet been conducted. The results indicate that PPV remains an important pathogenic infectious viral agent in porcine fetal death, even after immune competence. According to local management systems, fetal co-infection of PPV and PCV-2 cannot be ruled out. Epidemiology studies are desirable for these highly stable virions to reduce economic losses, as eradication programs are very difficult to conduct.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful for the sequence service performed by the “Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG” of the State University of Campinas (UNICAMP). We also wish to thank the farmers and veterinarians who participated in the study for their co-operation.

REFERENCES

1. Altschul, S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
2. Bergeron, J., Hébert, B., Tijssen, P., 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J. Virol.* 70, 2508-2515.
3. Chaniago, T.D.; Watson, D.L.; Owen, R.A.; Johnson, R.H. 1978. Immunoglobulins in blood serum of foetal pigs. *Aust. Vet. J.* 54 (1), 30-33.
4. Choi, S.S., Molitor, T.W., Joo, H.S., Gunther, R. 1987. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Vet. Microb.* 15, 19-29.

5. Clark K.L. 1996. Epidemiology and management of selected swine reproductive disease. *An. Rep. Scien.* 42, 447-454.
6. Gouveia, A.M.G., Gomez, M.C., Reis, R. 1984. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.* 4 (1), 17-22.
7. Hogg G.G., Lenghaus, C., Forman, A.J. 1977. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. *J. Comp. Path.* 87, 539-549.
8. Joo, H.S., Donaldson-Wood C. R., Johnson R. H. 1977. Pathogenesis of porcine parvovirus infection: pathology and immunofluorescence in the foetus. *J. Comp. Path.* 87, 383-391.
9. Kirkbride C.A., McAdaragh, J.P. 1978. Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172 (4), 480-483.
10. Lager K.M., Mengeling W. L., 1992. Comparison of the virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 245-248.
11. Liebermann, H., Hille, G., Oehme, G., Ferko, B. Die parvovirusinfektion des schweines (Literaturübersicht). 1988. *Arch. Exper. Vet. Med.*, 42, 890-904.
12. Maldonado J., Segalés J., Martínez-Puig, D., Calsamiglia M., Riera P., Domingo M., Artigas C. 2005. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. *Vet. J.* 169 (3), 454-456.
13. Mengeling W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C. 2000. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61 (1-3), 199-210.
14. Mengeling, W.L., Lager, K.M., Zimmerman, J.K., Samarikermani, N., Beran, G.W. 1991. A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 33-35.
15. Molitor T.W., Oraveerakul, K., Zhang, Q.Q., Choi, C.S., Ludermann, L.R. 1991. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for detection of porcine parvovirus. *J. Virol. Meth.* 32, 201-211.
16. Nelder, J.A., Wedderburn, R.W.M. 1972. Generalized linear models. *J. R. Statist. Soc. A* 135 (3), 370-384.
17. Oraveerakul K., Choi C.S., Molitor T.W. 1993. Tissue tropism of porcine parvovirus in swine. *Arch. Virol.* 130, 377-389.
18. Ránz, A.I., Manclus, J.J., Diaz-Aroca, E., Casal, J.I., 1989. Porcine parvovirus: DNA sequences and genome organization. *J. Gen. Virol.* 70, 2541-2553.
19. Rodriguez, C.A.R., Homem, V.S.F., Heinemann, M.B., Ferreira Neto, J.S., Richtzenhain, L.J., Soares, R.M. 2003. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, estado do Pará. *Arq. Inst. Biol.* 70 (4), 501-503.
20. Schneider, L.G., Wentz, I., Bortolozzo, F.P. 2001. Natimortalidade na suinocultura industrial. *Revista CFMV.* 23, 41-50.
21. Soares, R.M., Durigon, E.L., Bersano, J.G., Richtzenhain, L.J. 1999. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Meth.* 78, 191-198.
22. Soares, R.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Martins, V.G., Bacci Jr, M., Fernandes, F.M.C., Richtzenhain, L.J. 2003. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J. Gen. Virol.* 84, 1505-1515.

23. Zeeuw, E.J.L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H-J., Truyen, U. 2007. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Gen. Virol.* 88, 420-427.

Table 1. Number of animals in each clinical presentation, types and number of tissue samples, fetus classifications according to gestational age and number of sow parturitions.

Classes	Clinical presentation			Sows		Fetal gestational age		Fetal tissue samples				
	Ab	Mu	Sb	Y	O	A	B	L	H	T	K	S
Fetuses (n=28)	6	6	16	13	13	21	7	28	28	14	16	22

Y = 1-3 parturitions; O = > 4 parturitions; A = 70-99 days; B = $\geq$ 100 days; lung = L; heart = H; thymus = T, kidney = K and spleen = S.

Table 2. Mean (in percentage) and standard error (in parenthesis) of positive results by nested-PCR reaction for PPV detection in tissue samples of aborted, mummified and stillborn fetuses.

Fetuses	Positive n-PCR
Ab	79.98 ^a (15.94)
Mu	79.48 ^a (16.91)
Sb	87.43 ^a (6.59)
p value	0.90

Means with the same letter were not statistically different by Student *t*-test ($p > 0.05$).

Table 3. Mean (in percentage) and standard error (in parenthesis) of positive results by nested-PCR reaction for PPV detection, in different tissue samples from 28 dead fetuses.

Fetal tissue	Positive n-PCR
Lung	96.99 ^a (3.48)
Heart	93.33 ^{ab} (5.93)
Kidney	69.56 ^{bc} (17.10)
Thymus	66.00 ^{bc} (18.28)
Spleen	54.91 ^c (16.76)
p value	0.05

Means with the same letter were not statistically different by Student *t*-test ($p > 0.05$).

Table 4. Mean (in percentage) and standard error (in parenthesis) of positive results by nested-PCR reaction for PPV detection in fetal tissues, related to fetal gestational age.

Fetal gestational age	Positive n-PCR
A	94.76 ^a (2.87)
B	55.57 ^b (23.77)
p value	0.03

Means with different letter were statistically different by Student *t*-test ($p>0.05$).

Table 5. Mean (in percentage) and standard error (in parenthesis) of positive results by nested-PCR reaction for PPV detection in fetal tissues, related to sow class (number of parturitions).

Sow class	Positive n-PCR
Young	92.28 ^a (5.67)
Old	65.43 ^b (11.34)
p value	0.03

Means with different letter were statistically different by Student *t*-test ($p>0.05$).

Table 6. Mean (in percentage) and standard error (in parenthesis) of positive results by nested-PCR reaction for PPV detection in fetal tissues, related to HIA results in fetal thoracic fluids.

HIA	Positive n-PCR
Titer 0 – 1:64	83.94 ^a (9.80)
Titer 1:128 – 1:1024	81.23 ^a (8.73)
p value	0.80

Means with the same letter were not statistically different by Student *t*-test ($p>0.05$).

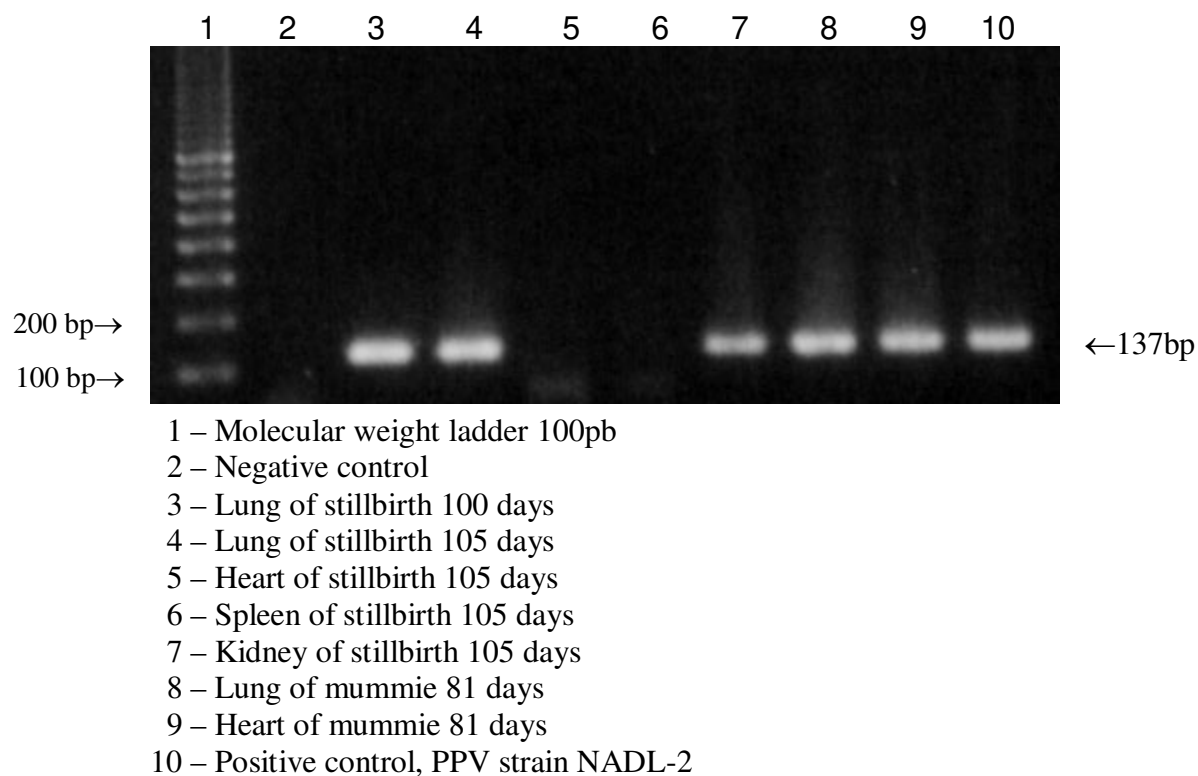


Figure 1: Polimerase chain reaction products (n-PCR) of eight fetal tissue samples on agarose gel eletrophoresis stained with ethidium bromide.