

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANILO LEAL ROCHA

IDENTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E DO PARVOVÍRUS SUÍNO EM
FETOS SUÍNOS NATIMORTOS E MUMIFICADOS PROVENIENTES DE GRANJAS
NO BRASIL

CURITIBA
2008

DANILO LEAL ROCHA

IDENTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E DO PARVOVÍRUS SUÍNO EM
FETOS SUÍNOS NATIMORTOS E MUMIFICADOS PROVENIENTES DE GRANJAS
NO BRASIL


Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias, setor
de Ciências Agrárias, Universidade Federal
do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de mestre em Patologia.
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Camilo
Alberton

CURITIBA
2008

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"IDENTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E DO PARVOVÍRUS SUÍNO EM FETOS SUÍNOS NATIMORTOS E MUMIFICADOS PROVENIENTES DE GRANJA NO BRASIL"** apresentada pelo Mestrando **DANILO LEAL ROCHA**, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou o candidato Armelado para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

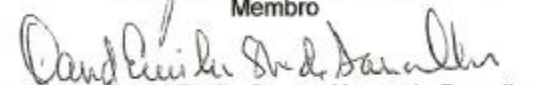
Curitiba, 25 de novembro de 2008.



Prof. Dr. Geraldo Camilo Alberton
Presidente/Orientador



Prof. Dr. José Lucio dos Santos
Membro



Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos
Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por sempre iluminar a minha trajetória.

A minha família, em especial, meus pais, grandes mestres de minha vida. Aos meus irmãos, Fabrício e Érika, meus sobrinhos, Gabriel e Alice e minha cunhada, Petula, obrigado pelo amor e apoio. Obrigado a todos meus familiares que apesar da distância, tenho certeza que torcem por minha felicidade.

A minha princesa, Fernanda, e a sua família que me acolheram com muito carinho e amor.

A Daniella Sponchiado pela amizade e “trabalho de cupido”!

Ao amigo Cristiano pelo auxílio na tradução para o inglês.

Ao professor Dr. Geraldo Camilo Alberton pela credibilidade a minha pessoa, apoio, compreensão, conhecimentos, orientações e amizade.

Aos professores Dr. João Scandolera e Dr^a Elizabeth Santin por integrarem o comitê de orientação.

Ao professor Dr. José Lúcio dos Santos e Sr^a. Maria dos Santos pelo apoio, desde aluno da UFV e também nesta nova conquista. Ao orgulho de fazer parte da equipe Microvet.

A toda a equipe do Microvet, em especial, ao Prof. PhD Walter Guimarães, Dra. Klédna Reis, Mayka Rabello, João, Cristiane, Simone, Alessandra pelo apoio nos exames e orientações na dissertação.

A TOPIGS do Brasil pela oportunidade e o orgulho de trabalhar nesta equipe por 5 anos.

A Universidade Federal do Paraná pela oportunidade.

A todos os amigos, professores, funcionários da Universidade Federal do Paraná que me proporcionaram muita alegria nestes anos de convivência.

A todos muito obrigado!

RESUMO

A suinocultura brasileira tem atingido resultados zootécnicos e econômicos de alta competitividade, sendo o Brasil, um importante país no cenário mundial na produção e comercialização de produtos suínos. Para isto, investimentos em qualidade genética do plantel, nutrição, programas de vacinação, instalações, qualificação de técnicos, entre outros, são fundamentais. Por outro lado, esta inserção no cenário globalizado também gera desafios sanitários presentes na suinocultura mundial. Entre estes, o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) é um agente infeccioso que têm sido associado a diversas enfermidades com impacto na produção de suínos mundial. Entre estas enfermidades, a síndrome da refugagem multissistêmica e falhas reprodutivas foram reproduzidas de forma experimental e têm sido estudadas em diferentes países no mundo. No Brasil poucos estudos foram realizados sobre a participação do PCV2 relacionados à falhas reprodutivas, sendo a maioria dos estudos relacionada à síndrome da refugagem multissistêmica. Este fato pode ser um dos motivos pelo qual o PCV2 não tem sido considerado em granjas com falhas reprodutivas no Brasil. Nestas granjas, o parvovírus suíno (PVS), agente viral há muito tempo conhecido pelo potencial em causar falhas reprodutivas, tem sido investigado. O objetivo deste estudo foi investigar, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a presença do PCV2 e do PVS em fetos suínos natimortos e mumificados provenientes de diferentes granjas no Brasil. Os fetos foram coletados entre junho de 2006 a junho de 2008 nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo estas enviadas ao laboratório para realização dos exames. Todas as amostras foram examinadas com controle negativo e positivo. Entre as 147 amostras investigadas, 83 (56,5%) foram positivas para pelo menos um destes agentes virais. O PCV2 foi detectado em 50,3% das amostras enquanto que co-infecção com o PCV2 e o PVS foi detectada em 6,2% das amostras investigadas. Estes resultados sugerem que o PCV2 deve ser incluído na lista de diagnóstico diferencial em granjas com falhas reprodutivas mesmo em unidades sem a manifestação clínica da síndrome da refugagem multissistêmica.

Palavras-chave: Suínos. Circovírus suíno tipo 2. Parvovírus suíno. Falhas reprodutivas. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

The Brazilian pig industry has achieved high competitiveness zootechnic and economic results, being Brazil, an important country swine production and trade of pig products. For that, investments in quality genetic breed, nutrition, vaccine programs, facilities, technician's quality and others are essential. On the other hand, this insertion in the globalization scenery brings health challenges present at the world pig industry. Among these, the porcine circovirus type 2 (PCV2) is an infection agent that has been associated to several diseases with impact on the world pig industry. Among these diseases, the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and reproductive failure were experimentally reproduced and have been studied in several countries around the world. In Brazil, few studies were made about the relation between PCV2 and reproductive failure, being the majority of studies concentrated in PMWS. This fact could be one of the reasons why the PCV2 has not been associated with the reproductive failure on farms in Brazil. On those farms, the porcine parvovirus, a viral agent long known for its potential to cause reproductive failure, has been investigated. The objective of this present study was to investigate, through polymerase chain reaction (PCR), the presence of PCV2 and PPV in porcine stillbirths and mummies fetuses from different farms in Brazil. The fetuses were collected between June 2006 and June 2008 in the South, Southeastern and Midwestern regions. All the samples were examined with positive and negative control. Out of 147 samples, 83 (56,5%) were positive for at least one of the viral agents investigated. The PCV2 was detected in 50,3% of the samples while co-infection with PCV2 and PPV were detected in 6,2% of the investigated samples. These results suggest that PCV2 must be included in the differential diagnostic list in farms with reproductive failure even on farms without the clinical manifestation of postweaning multisystemic wasting syndrome.

Key-words: Swine. Porcine circovirus type 2. Porcine parvovirus. Reproductive failure. Polimerase chain reaction.

LISTA DE TABELAS E FIGURA

TABELA 1 – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS AMPLIFICAÇÕES DE PATÓGENOS VIRAIS E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	35
TABELA 2 – PRESENÇA DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) E DO PARVOVÍRUS SUÍNO (PVS) EM 147 AMOSTRAS DE FETOS MUMIFICADOS E NATIMORTOS PROVENIENTES DE 39 GRANJAS DO BRASIL ENTRE 06/2006 A 06/2008.....	35
FIGURA 1 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 (PCV2) E PARVOVÍRUS SUÍNO (PVS) DE FRAGMENTOS DE CORAÇÃO E PULMÃO DE FETOS SUÍNOS NATIMORTOS E MUMIFICADOS.....	36

RELAÇÃO DE SIGLAS

- DNA – ácido desoxirribonucléico
IHC – Imunohistoquímica
ISH – *in situ* hibridização
ORF – *open reading frame* (região aberta de leitura)
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PCV2 – Circovírus suíno tipo 2 ou Porcine Circovirus type 2
PMWS – Postweaning multisystemic wasting syndrome
PVS – Parvovírus suíno
PPV – Porcine parvovirus
SRM – Síndrome da refugagem multissistêmica

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA – Associação do circovírus suíno tipo 2 a falhas reprodutivas.....	10
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 ETIOLOGIA	12
1.3 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO	13
1.4 IMUNIDADE	14
1.5 FALHAS REPRODUTIVAS	15
1.6 DIAGNÓSTICO	18
1.7 PREVENÇÃO	20
1.8 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	23
2 ARTIGO CIENTÍFICO – Identificação do circovírus suíno tipo 2 e do parvovírus suíno em fetos suínos natimortos e mumificados provenientes de granjas no Brasil.....	30
RESUMO	31
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO	38
AGRADECIMENTOS	38
REFERÊNCIAS	39

REVISÃO DE LITERATURA

A formatação desta revisão de literatura está de acordo com as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná

ASSOCIAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 A FALHAS REPRODUTIVAS

1.1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira está entre as maiores e mais importantes no mundo. Os resultados zootécnicos e custo de produção atingidos na atividade conferem ao Brasil posição de destaque. O investimento em melhoramento genético, nutrição, programas de vacinação, manejo, instalações, atualização técnica, entre outros, são fundamentais. Por outro lado, esta globalização da atividade faz com que o Brasil também enfrente desafios sanitários presentes na suinocultura mundial. Entre estes desafios, a síndrome da refugagem multissistêmica (SRM) tem sido descrita em vários países do mundo com grande impacto econômico na produção de suínos (SEGALÉS et al., 2005). No Brasil esta enfermidade, usualmente denominada circovirose, foi relatada pela primeira vez no ano de 2000 no estado de Santa Catarina (ZANELLA, 2001).

O agente infeccioso associado a esta síndrome é o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Este vírus tem sido associado a diversas enfermidades em suínos, entre estas a síndrome da refugagem multissistêmica (HARDING e CLARK, 1997), falhas reprodutivas (WEST et al., 1999), a síndrome da dermatite e nefropatia suína (ROSELL et al., 2000), o complexo de doenças respiratórias dos suínos (KIM et al., 2003) e ao aumento na mortalidade pré-desmama (BRUNBORG et al., 2007). Algumas destas foram reproduzidas de forma experimental, como a SRM (BALASCH et al., 1999; ELLIS et al., 1999) e as falhas reprodutivas (SANCHEZ et al., 2001; PENSAERT et al., 2004; SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005).

Estudos mais recentes têm demonstrado forte associação entre o PCV2 e as falhas reprodutivas, como os abortos, retornos ao cio, mumificação e mortes embrionárias e fetais (SANCHEZ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005; MATEUSEN et al., 2007; LEFEBVRE et al., 2008).

A inclusão do PCV2 como agente potencial em falhas reprodutivas foi iniciada após o isolamento deste agente em leitões natimortos de uma granja com histórico de baixa eficiência reprodutiva (WEST et al., 1999). Desde então, novos trabalhos nesta área tem sido publicados, entretanto, em números inferiores a SRM. No Brasil, estudos consideraram o PCV2 como patógeno viral de pouca importância

em casos de fetos natimortos, mumificados e abortados (MORENO et al., 2007; PESCADOR et al., 2007).

Esta revisão tem por objetivo apresentar estudos relacionados ao PCV2 com foco na discussão da participação deste agente em falhas reprodutivas.

1.2 ETIOLOGIA

O circovirus suíno faz parte da família *Circoviridae*. Esta família está dividida em dois gêneros: o gênero *Circovirus*, onde estão incluídos o circovirus suíno tipo 1 (PCV1), o circovirus suíno tipo 2 (PCV2), o vírus da doença do bico e das penas dos psitacídeos e o circovirus das pombas, e o gênero *Gyrovirus* que inclui somente o vírus da anemia dos frangos (TISCHER et al., 1982).

O PCV2 é um vírus pequeno (15-20nm), um dos menores genomas que infectam vertebrados, icosaédrico, não-envelopado e contém fita circular simples de ácido desoxirribonucléico (TISCHER et al., 1982). O genoma do PCV2 contém três genes principais, denominados ORFs (*open reading frames* ou regiões abertas de leitura). A *ORF1* codifica proteínas importantes para a replicação do DNA viral enquanto a *ORF2* codifica a proteína do capsídeo que é responsável pela indução de anticorpos protetores (NAWAGITGUL et al., 2000). O terceiro gene, *ORF3*, codifica proteínas não essenciais à replicação viral, entretanto, pode ser importante na patogenia por induzir apoptose (LIU et al., 2005). Estudos também demonstraram que amostras do PCV2 podem ser divididas em dois subgrupos ou genótipos, PCV2a ou PCV2 grupo 2 e o PCV2b ou PCV2 grupo 1, sendo a principal diferença observada na região da *ORF2* (GRAU-ROMA et al., 2008).

Ambos os genótipos foram associados à SRM e a falhas reprodutivas (HARDING et al., 2008; LEFEBVRE et al., 2008). Entretanto, alguns estudos relataram a possibilidade de haver diferença na virulência entre os genótipos PCV2a e PCV2b na manifestação da SRM (GRAU-ROMA et al., 2008; HARDING et al., 2008). No Brasil foram detectadas as presenças de ambos os genótipos (JANICE et al., 2008; REIS et al. 2008), sendo que, amostras de PCV2 brasileiras apresentaram semelhança genética de 97,1% (CHIARELLI et al., 2007). Nos EUA, Europa e Ásia também foram demonstradas ambos os genótipos (CHEUNG et al., 2007; HARDING et al., 2008).

Poucas informações sobre características físicoquímicas do PCV2 foram relatadas na literatura. Segundo O'DEA et al. (2008), o PCV2 foi inativado em cultura

de células PK-15 durante exposição ao calor de 80°C por 15 minutos. MARTIN et al (2008) relataram redução significativa na titulação *in vitro* do PCV2 em sete dos nove desinfetantes testados.

Alguns trabalhos têm demonstrado sinergismo entre PCV2 e outros agentes virais no desenvolvimento da SRM ou no complexo de doenças respiratórias dos suínos, dentre os quais se destacam o parvovirus suíno, o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína e o torque teno vírus (ELLIS et al., 1999; KRAKOWKA et al., 2000; QUINTANA et al., 2001; KIM et al., 2003; KAICHUANG et al., 2008; KRAKOWKA et al., 2008). Como o objetivo desta revisão é a apresentação de estudos da associação do PCV2 a falhas reprodutivas esta sinergia com outros agentes infecciosos na SRM não será explorada neste texto. Estudos demonstraram que falhas reprodutivas associadas ao PCV2 podem ocorrer sem a participação de outros agentes infecciosos (WEST et al., 1999; SANCHEZ et al., 2001; PARK et al., 2005), entretanto, pode haver co-infecção (O'CONNOR et al., 2001).

1.3 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Estudos têm demonstrado a disseminação mundial do PCV2 na população de suínos (BARBOSA et al., 2005; GARKAVENKO et al., 2005; SEGALÉS et al., 2005). Entretanto, vale ressaltar que, o PCV2 tem sido comum a população de suínos antes da doença se tornar evidente (MAGAR et al., 2000; ZANELLA et al., 2006).

Suínos domésticos e selvagens parecem ser os hospedeiros naturais, enquanto que espécies não suídeos parecem não serem susceptíveis a infecção pelo PCV2 (TISCHER et al., 1982; VICENTE et al., 2004). Entretanto, NAYAR et al (1999) relataram a detecção de PCV2 em pulmão de bovinos e fetos abortados de bovinos.

A transmissão do PCV2 pode ocorrer de forma horizontal ou vertical (BALASCH et al., 1999; ELLIS et al., 1999; PENSAERT et al., 2004; PARK et al., 2005). A via oronasal tem sido utilizada em estudos de reprodução experimental da SRM (BALASCH et al., 1999; ELLIS et al., 1999). O PCV2 tem sido detectado em secreções nasais, saliva, fezes e soro de suínos, o que indica a disseminação horizontal (KRAKOWKA et al., 2000; SEGALÉS et al., 2005). HA et al (2008) demonstraram que a transmissão do PCV2 também pode ocorrer pelo leite da matriz lactante. Entretanto, estudos têm demonstrado diferenças nas concentrações virais em animais com ou sem a manifestação clínica da SRM. Neste sentido, SÉGALES

et al. (2005) demonstraram que a excreção viral foi significativamente maior em animais com a manifestação clínica da SRM. Estudos sugeriram que concentrações virais acima de 10^7 cópias de genoma/ml de soro são observadas em animais com a manifestação clínica da SRM (BRUNBORG et al., 2004; OLVERA et al., 2004). Por outro lado, animais sem a SRM também podem eliminar o PCV2 e servir como fonte de infecção para outros animais (KRAKOWKA et al., 2005). É importante ressaltar que procedimentos inadequados de manejo tais como: densidade de alojamento elevada, baixa qualidade do ar, água e ração, mistura de lotes de origens diferentes podem predispor a manifestação da SRM e conseqüente, maior excreção do PCV2 (MADEC et al., 2000).

A transmissão vertical também foi demonstrada, sendo que, a infecção transplacentária pode ocorrer em qualquer idade de gestação (PENSAERT et al., 2004; PARK et al., 2005). Os embriões suínos com a zona pelúcida intacta podem ser resistentes ao PCV2, entretanto, tornam-se mais susceptíveis com o avanço dos estágios embrionários (MATEUSEN et al., 2004). BIELANSKI et al. (2004) relataram que o PCV2 pode ser resistente aos procedimentos de lavagem de embriões recomendados pela *International Embryo Transfer Society*. O PCV2 também foi detectado no sêmen e oócitos de reprodutores soropositivos e clinicamente sadios (LAROCHELLE et al., 2000, BIELANSKI et al., 2004; SCHMOLL et al., 2008). GAVA et al (2008) demonstraram que o PCV2 pode ser transmitido pelo sêmen para matrizes e respectivos fetos durante a gestação.

1.4 IMUNIDADE

O estudo da dinâmica dos anticorpos passivos e ativos, bem como da imunidade celular, também é importante para compreender o potencial do PCV2 em atravessar a barreira placentária e causar infecção em embriões e fetos. Os estudos apresentados neste capítulo demonstram que pode haver diminuição no título de anticorpos para o PCV2 em leitões próximo à idade de reprodução, bem como, haver viremia em leitões e matrizes soropositivas sem sinais clínicos da SRM (LAROCHELLE et al., 2003; CARASOVA et al., 2007; CALSAMIGLIA et al., 2007).

A imunidade passiva ao PCV2, transmitida via colostro aos leitões, declina durante o período de lactação e de creche (LAROCHELLE et al., 2003; CARASOVA et al., 2007). Desta forma, a SRM não é usualmente observada em leitões com menos de quatro semanas de idade (SEGALÉS et al., 2005; CARASOVA et al.,

2007). A soroconversão ativa foi observada em leitões entre oito a 15 semanas de idade (LAROCHELLE et al., 2003; CARAROVA et al., 2007). Em condições experimentais, a soroconversão ativa ocorreu entre 11 a 21 dias após a infecção (BALASCH et al., 1999; LAROCHELLE et al., 2000). CARASOVA et al (2007) num estudo realizado em uma granja com a SRM demonstraram que o maior título de anticorpos IgG específico ao PCV2 foi observado com 16 semanas de idade sendo detectado redução acentuada com 25 semanas. De forma concomitante neste estudo, foi demonstrada viremia em animais de recria, terminação e matrizes soropositivos e sem sinais clínicos da SRM. Outros autores também demonstraram viremia em animais de terminação e matrizes, mesmo com altos títulos de anticorpos e sem sinais clínicos da SRM (LAROCHELLE et al., 2003; MCINTOSH et al., 2006; CALSAMIGLIA et al., 2007). PITTMAN et al. (2008) diagnosticaram a SRM em leitões de reposição em granja com histórico de falhas reprodutivas associadas ao PCV2.

A titulação de anticorpos anti-PCV2, bem como a detecção de PCV2 no soro, é variável entre matrizes num mesmo rebanho (CALSAMIGLIA et al., 2007). Este perfil sorológico e virêmico pode estar relacionado à taxa de mortalidade dos leitões (CALSAMIGLIA et al., 2007), entretanto, não foram encontrados dados na literatura relacionando titulação de anticorpos anti-PCV2 e riscos de infecção transplacentária.

1.5 FALHAS REPRODUTIVAS

As falhas reprodutivas em suínos, tais como aborto, retorno ao cio, fetos natimortos e mumificados, podem ser de origem infecciosa ou não. Estas falhas de origem não infecciosa podem ser causadas, entre outras, por intoxicações e falhas nos procedimentos de manejo (HOLLER, 1994). O tamanho da leitegada e a ordem de parição da matriz também são exemplos de causas não infecciosas que podem influenciar a sobrevivência fetal (SCHNEIDER et al., 2001). As falhas reprodutivas de origem infecciosas podem ser sistêmicas ou localizadas no trato reprodutivo. As causas infecciosas localizadas estão relacionadas, por exemplo, a infecções do trato reprodutivo de matrizes que podem ter como causa procedimentos de manejo inadequados. Entre as causas infecciosas sistêmicas alguns agentes virais e bacterianos merecem destaque, como: parvovírus suíno (PVS), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos, vírus da doença de Aujeszky, vírus da

influenza, vírus da peste suína clássica, *Leptospira* spp e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (HOLLER, 1994; KIM et al., 2004; MORENO et al., 2007). Estudos recentes têm associado o PCV2 a estas falhas reprodutivas (WEST et al., 1999; SANCHEZ et al., 2001; MATEUSEN et al., 2004; PARK et al., 2005; MATEUSEN et al., 2007). LEFEBVRE et al. (2008) demonstraram que ambos os genótipos, PCV2a e PCV2b, podem ser letais aos fetos.

O fato da ampla disseminação do PCV2 no mundo (SEGALÉS et al., 2005), levantou a discussão se este agente seria importante em quadros clínicos de falhas reprodutivas, uma vez que boa parte das matrizes são soropositivas (SANCHEZ et al., 2001). Neste sentido, PENSAERT et al. (2004) demonstraram que o PCV2 pode atravessar a barreira placentária e causar infecção em embriões ou fetos mesmo em matrizes soropositivas. Neste estudo, os autores demonstraram que o PCV2 pode causar viremia de forma livre no plasma ou associada à célula. Segundo estes autores, os vírus que circulam livre pelo plasma são eficientemente controlados por anticorpos maternos enquanto que na viremia de forma associada à célula, os vírus podem atravessar a placenta sem o contato com anticorpos maternos. As chances de infecção transplacentária aumentam com a maior concentração viral, duração da viremia e virulência da amostra (PENSAERT et al., 2004). Vale ainda ressaltar as informações apresentadas no capítulo anterior sobre detecção de viremia em matrizes soropositivas e sem sinais clínicos da SRM (CARASOVA et al., 2007; CALSAMIGLIA et al., 2007).

Alguns estudos reproduziram de forma experimental a transmissão vertical e observaram aborto (SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005). Autores relataram que o PCV2 pode atravessar a barreira placentária em qualquer idade de gestação (KIM et al., 2004; PARK et al., 2005). MATEUSEN et al. (2007) relataram que o PCV2 pode causar retorno ao cio, inclusive regular, quando infecções transplacentárias ocorrerem em estágios iniciais de gestação. Entretanto, SANCHEZ et al. (2001) não observaram interrupção da gestação após inoculação intra-fetal com o PCV2. Segundo estes autores, estas diferenças observadas no curso da gestação podem estar relacionadas, entre outras, a via de inoculação e a virulência das amostras.

Estudos também demonstraram o potencial do PCV2 em causar morte fetal (SANCHEZ et al., 2001; JOHNSON et al., 2002; MATEUSEN et al., 2004; SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005). A mumificação ou natimortalidade fetal depende do

período gestacional nas quais os fetos foram expostos ao PCV2. Fetos infectados antes de 75 dias de gestação apresentaram maiores chances de mumificação fetal enquanto fetos infectados após esta idade se apresentaram natimortos ou fracos ao nascimento (SANCHEZ et al., 2001). Estudos demonstraram que alguns fetos infectados durante a gestação podem nascer vivos e indicam potencial destes em carrear o vírus para a vida pós-natal (SANCHEZ et al., 2001; JONHSON et al., 2002; SANCHEZ et al., 2004; PARK et al., 2005). Entretanto, o desenvolvimento da SRM nestes leitões fracos ao nascimento não está determinado.

SANCHEZ et al. (2001) relataram congestão hepática, hemorragia e hipertrofia cardíaca como as principais lesões macroscópicas em fetos inoculados com o PCV2. LEFEBVRE et al. (2008) em estudo de inoculação experimental de fetos relataram diferentes lesões macroscópicas de acordo com as doses infectantes. As principais lesões histológicas em fetos infectados com o PCV2 foram miocardites fibrosante e/ou necrosante (WEST et al., 1999; O'CONNOR et al., 2001; BRUNBORG et al., 2007) e pneumonia discreta, caracterizada por infiltrado de células mononucleares no espaço alveolar (PARK et al., 2005). Entretanto, no estudo de PARK et al. (2005) apenas 30% dos fetos natimortos de matrizes inoculadas com PCV2 apresentaram lesões histológicas discretas no pulmão. Desta forma, conclui-se que o PCV2 pode causar morte fetal mesmo sem a observação de lesões histológicas.

Segundo ALBANES (1998) exames histopatológicos em quadros de infecção viral no tecido cardíaco podem apresentar baixa sensibilidade. Os vírus podem causar insuficiência do miocárdio por dois mecanismos, efeito citotóxico direto ou de forma indireta como consequência de resposta imunológica. A gravidade da lesão cardíaca depende, entre outros, da localização e extensão. A lesão focal é bem tolerada, porém se o processo inflamatório ocorrer nas proximidades do tecido de condução, poderemos encontrar graves consequências. O autor ainda ressalta que a persistência de material genético viral tem sido demonstrada, por meio de técnicas como PCR ou hibridização *in situ*, na ausência de processo inflamatório e tem sido associada à evolução desfavorável da insuficiência miocárdica.

Poucos estudos foram encontrados na literatura sobre a frequência de detecção do PCV2 em fetos suínos, sendo que, resultados bastante variáveis foram observados. MALDONADO et al. (2005) não relataram participação efetiva do PCV2 como patógeno fetal, mesmo na Espanha onde a SRM é amplamente

disseminada. Entretanto, ZIZLAVSKY et al. (2008) relataram o PCV2 como principal agente infeccioso detectado nos 232 fetos investigados entre os anos de 2005 a 2007 na República Checa. Neste estudo, a freqüência do PCV2 variou entre 21,7% a 54,1%. KIM et al (2004) em estudo realizado na Coréia do Sul observaram freqüência do PCV2 em 13,1% de 350 fetos mumificados, natimortos e provenientes de aborto. No Brasil, MORENO et al. (2007) realizaram estudo por meio de PCR com 1727 fetos mumificados, natimortos e abortados, sendo todas as amostras negativas para o PCV2. Neste estudo, os agentes mais detectados foram o parvovírus suíno (17%) seguido pela *Leptospira* spp (13%) enquanto que PESCADOR et al. (2007) relataram 5,7% das amostras positivas ao PCV2 do total de 121 fetos investigados. Desta forma, há necessidade de outros estudos para avaliar a freqüência de detecção do PCV2 em fetos suínos, bem como do impacto deste agente no desempenho reprodutivo do plantel.

1.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de falhas reprodutivas é complexo, uma vez que, estas falhas podem ser de origem infecciosa ou não (HOLLER, 1994). No processo de diagnóstico, devem-se revisar todos os procedimentos de manejo e ambiência relacionados aos setores de reprodução da granja, entretanto, não é o objetivo desta revisão.

Entre as causas infecciosas alguns agentes virais e bacterianos merecem destaque, como, circovírus suíno tipo 2, parvovírus suíno, vírus da Doença de Aujeszky, vírus da Peste Suína Clássica, vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, *Leptospira* spp e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (HOLLER, 1994; PENSAERT et al., 2004; KIM et al., 2004; MORENO et al., 2007; ZIZLAVSKY et al., 2008). Dentre os agentes infecciosos que fazem parte do diagnóstico diferencial o Brasil é considerado livre do vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos. Estudos recentes não encontraram soroconversão nas amostras investigadas (RISTOW et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Como o objetivo desta revisão é a associação do PCV2 a falhas reprodutivas, as informações neste capítulo sobre diagnóstico serão relacionadas a este vírus.

Para confirmação do diagnóstico do PCV2 associado à falha reprodutiva é necessário, entre outros, a identificação do PCV2 em órgãos fetais. Neste sentido,

algumas técnicas, tais como o isolamento viral, PCR, hibridização *in situ* e/ou imuno-histoquímica, foram discutidas na literatura consultada (JONHSON et al, 2002; PARK et al., 2005). O isolamento viral a partir de fetos pode apresentar baixa sensibilidade (PARK et al., 2005) enquanto que bons resultados foram relatados por técnicas tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *in situ* e/ou imuno-histoquímica (JONHSON et al., 2002; PARK et al., 2005). A identificação do PCV2 nos fetos natimortos, mumificados e abortados podem sugerir que este vírus seja o causador da morte fetal, entretanto, técnicas que permitam a quantificação viral no tecido, como o PCR em tempo real, pode ser importante nesta confirmação, uma vez que as titulações detectadas podem ser comparadas às titulações virais utilizadas nos estudos de infecções experimentais com danos aos fetos (SANCHEZ et al., 2003; PARK et al., 2005; LEFEVRE et al., 2008).

O exame histopatológico pode ser realizado em tecidos de fetos abortados e natimortos (PARK et al., 2005), desde que não apresentem estágio avançado de autólise. Entretanto, as lesões histopatológicas descritas (WEST et al, 1999; O'CONNOR et al., 2001) não são patognomônicas do PCV2, sendo necessária a utilização de outras técnicas para confirmação. Vale ainda ressaltar que, conforme discutido no capítulo anterior, o PCV2 pode induzir à morte fetal sem causar lesões histológicas (PARK et al., 2005).

SANCHEZ et al. (2001) descrevem a técnica de imunoperoxidase para detecção de anticorpos em soro de fetos expostos ao PCV2 no terço final de gestação.

Não há um consenso na literatura sobre o órgão ou órgãos de eleição para detecção do PCV2 em fetos (SANCHEZ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2003; PARK et al., 2005; BRUNBORG et al., 2007; LEFEVRE et al., 2008). Estudos demonstraram o coração de fetos como o órgão de maior título viral independente do período gestacional (SANCHEZ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2003; LEFEVRE et al., 2008). Outros autores destacaram a miocardite como a principal lesão histopatológica em fetos (WEST et al, 1999; O'CONNOR et al., 2001; BRUNBORG et al., 2007). Entretanto, PARK et al. (2005), sugerem tonsilas, baço e linfonodos de fetos, como órgãos de maiores concentrações do PCV2. Segundo SANCHEZ et al. (2003) o tropismo do PCV2 modifica de cardiomiócitos, hepatócitos e macrófagos na fase pré-natal para macrófagos na vida pós-natal. Desta forma, a seleção dos

órgãos de fetos em estudos de detecção da frequência do PCV2 pode gerar diferenças nos resultados.

Outro ponto importante no processo de diagnóstico de agentes infecciosos associados à falhas reprodutivas é o número de amostras ou fetos enviados ao laboratório. É interessante enviar o maior número de fetos abortados, natimortos e mumificados por leitegada e de diferentes leitegadas. A disseminação do PCV2 no ambiente uterino pode ser lenta e nem todos os fetos de uma leitegada podem estar infectados (SANCHEZ et al., 2001; PARK et al., 2005). Fetos inferiores a 16 centímetros, antes da fase de imunocompetência, tendem a apresentar maior título viral (SANCHEZ et al., 2001). Por outro lado, estudos comprovam a presença de DNA do PCV2 associado a anticorpos durante a fase de imunocompetência (SANCHEZ et al., 2001). Portanto, limitar o tamanho do feto para envio ao laboratório com fins de diagnóstico pode ser um erro.

1.7 PREVENÇÃO

Apesar de estudos apresentados nesta revisão terem demonstrado o potencial do PCV2 em causar falha reprodutiva, não foram encontradas na literatura discussões sobre medidas preventivas. Estas medidas preventivas para o PCV2 (MADEC et al., 2000), bem como as vacinas disponíveis no mercado, têm como objetivo principal o controle da SRM.

Diferentes tipos de vacina têm sido descritos de forma experimental, como a vacina de DNA, vacinas de subunidades da *ORF1* e *ORF2* do PCV2 (BLANCHARD et al., 2003) e vacinas recombinantes (FENAUX et al., 2004; JU et al., 2005). Até o momento, quatro empresas (Merial, Fort Dodge, Shering-Plough/Intervet e Behringer) comercializam vacinas para PCV2. Entretanto, estes programas de vacinação têm por objetivo principal o controle da SRM. QUNXING et al (2008) apresentaram um estudo com o objetivo de desenvolver uma vacina conjugada para o circovírus suíno tipo 2 e o parvovírus suíno. Vale ressaltar que a vacinação para parvovirose no plantel reprodutivo é amplamente usada no Brasil, bem como as vacinações para Leptospirose e Erisipelose.

Entre as medidas preventivas, MADEC et al. (2000) elaboraram um protocolo com 20 pontos de procedimentos de manejo para auxiliar no controle da SRM. Estudos não demonstraram relação entre a SRM e falhas reprodutivas associadas ao PCV2, entretanto, uma maior excreção viral em animais com a manifestação

clínica da doença (SEGALÉS et al., 2005) podem aumentar a disseminação do PCV2 no ambiente. Vale ressaltar que algumas granjas adotam a transferência de fêmeas jovens, futuras reprodutoras, ao setor de gestação, fase onde pode haver manifestação clínica da SRM. PITTMAN et al. (2008) diagnosticaram a SRM em leitoas de reposição em uma granja onde foi realizado o diagnóstico de falhas reprodutivas associadas ao PCV2.

Outra medida preventiva poderia ser a exclusão do uso de sêmen infectado com PCV2. GAVA et al (2008) demonstraram que o PCV2 pode ser transmitido pelo sêmen para matrizes e respectivos fetos. Entretanto, aplicações de técnicas laboratoriais para detecção do PCV2 nas rotinas de muitas das centrais de inseminação artificial no Brasil seriam de difícil execução. Técnicas como PCR, por exemplo, demandam equipamentos e equipe qualificada. O sêmen suíno é utilizado na forma fresca, não é realizado o congelamento, desta forma, o envio de amostras de sêmen para laboratórios capacitados também teria limitações. REICKS e LEUWERKE (2008) não relataram diferença na detecção de PCV2 no sêmen de reprodutores vacinados e não vacinados. Entretanto, houve redução significativa na quantidade de vírus detectada no soro de reprodutores vacinados. Há necessidade de estudos para definir se a vacinação de reprodutores pode reduzir a eliminação de PCV2 pelo sêmen. Vale ressaltar que SCHMOLL et al. (2008) relataram a detecção de PCV2 em sêmen de machos soronegativos.

1.8 CONCLUSÃO

Estudos demonstram o potencial do PCV2 em provocar falhas reprodutivas tais como retorno ao cio regular ou irregular, aborto, fetos natimortos e mumificados.

Algumas granjas de suínos chegam a adotar uma dose extra da vacina para parvovirose em programas de vacinação de leitoas de reposição ou trocam de fornecedor desta vacina onde há histórico de falhas reprodutivas. Entretanto, a participação do PCV2 nestes quadros clínicos as vezes não é considerada no diagnóstico diferencial.

No Brasil, a manifestação clínica da SRM em diferentes intensidades é amplamente disseminada. Entretanto, algumas granjas com histórico de falhas reprodutivas não consideram o PCV2 na lista de diagnóstico diferencial. Vale ressaltar que não foram encontrados estudos sobre a relação entre granjas com a SRM e falhas reprodutivas relacionadas ao PCV2.

Desta forma, há necessidade de mais estudos sobre a frequência do PCV2 em fetos suínos no Brasil, bem como, definir a participação deste agente viral nos transtornos reprodutivos em granjas.

REFERÊNCIAS

- ALBANES, M.F. Cardiomiopatia viral. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.71, n.2, 1998.
- BALASCH, M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; DOMINGO, M., MANKERTZ, A.; URNIZA, A., PLANA-DURAN, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 121, p.139-148, 1999.
- BARBOSA, C.N.; LOBATO, Z.I.P.; NASCIMENTO, E.F.; CAVALCANTI, J.E. Estudo do perfil sorológico para o circovírus suíno tipo 2 em granjas tecnificadas para a produção comercial de suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, XII. 2005, Fortaleza. **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2005, p.7-8.
- BIELANSKI, A.; LAROCHELLE, R.; ALGIRE, J.; MAGAR, R. Distribution of PCV2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV2 antibody positive pigs. **Veterinary Record**, v.155, n.19, p.597-598, 2004
- BLANCHARD, P.; MAHE, D.; CARIOLET, R.; TRUONG, C; M. LE DIMNA; C.; ARNAULD, C.; ROSE, N.; EVENO, E.; ALBINA, E.; MADEC, F.; JESTIN, A. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.183-194, 2003.
- BRUNBORG, I.; MOLDAL, T.; JONASSEN, C. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from sera/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real time PCR. **Journal of Virological Methods**, v.122, 171-178, 2004.
- BRUNBORG, I.; JONASSEN, C.; MOLDAL, T.; BRATBERG, T.; LIUM, B.; KOENEM, F.; SCHONHEIT, J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, 368-375, 2007.
- CALSAMIGLIA, M.; FRAILE, L.; ESPINAL, A.; SEMINATI, C.; MARTIN, M.; MATEU, E.; DOMINGO, M.; SEGALÉS, J. Sow porcine circovirus type 2 status effect on litter mortality in postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Science**, 82, p. 299-304, 2007.
- CARASOVA, P.; CELER, V.; TAKACOVA, M.; TRUNDOVA, D; MOLINKOVA, D.; LOBOVA, D.; SMOLA, J. 2007. The levels of PCV2 specific antibodies and viremia in pigs. **Veterinary Science**, v.83, p.274-278, 2007
- CHEUNG, A.; LAGER, K.; KOHUTYUK, A.; VINCENT, S.; HENRY, S.; BAKER, R.; ROWLAND, R.; DUNHAM, A. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Archives of Virology**, 2007

CHIARELLI, O.; SILVA, A.; VIDIGAL, P.; SALGADO, R.; SILVA, F.; RISTOW, L.; FIETTO, J.; ALMEIDA, M. Diversidade molecular de diferentes isolados brasileiros do circovírus suíno tipo 2. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, XIII. 2007. Florianópolis. **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, p.261-262.

ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANISH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.11, p.3-14, 1999

FENAUX, M.; OPRESSNIEG, T.; HAUBUR, P.G.; ELVINGER, F.; MENG, X.J. A chimeric porcine circovirus with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. **Journal of Virology**, v.78, n.12, p.6297-6303, 2004.

GARKAVENKO, O.; ELLIOT, R.; CROXSON, M. Identification of pig circovirus type 2 in New Zealand pigs. **Transplantation Proceedings**, v.37, p.506-509, 2005.

GAVA, D.; ZANELLA, E.; MORES, N.; CIACCI-ZANELLA, J. Transmission of porcine circovirus 2 (PCV2) by semen and viral distribution in different piglet tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p.70-76, 2008.

GRAU-ROMA, L.; CRISCI, E.; SIBILA, M.; LÓPEZ-SORIA, NOFRARIAS, M.; CORTEY, M.; FRAILE, L.; OLVERA, A.; SEGALÉS, J. A proposal on porcine circovirus type 2 genotype definitions and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence. **Veterinary Microbiology**, v.128, p.23-35, 2008.

HA, Y.; AHN, K.; KIM, B.; CHO, K.; LEE, B.; OH, Y-S.; KIM, S-H.; CHAE, C. Evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in milk from experimentally infected sows. **Research in Veterinary Science**, (2008), doi:10.1016/j.rvsc.2008.04.004.

HARDING, J.C.; CLARK, E.G. Recognizing and diagnosing post-weaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Swine Health and Production**, v.5, p.201-203, 1997.

HARDING, J.; ELLIS, J.; ALLAN, G.; KRAKOWKA, S. Dual heterologous PCV2a/2b infection induces PMWS in gnotobiotic pigs. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008, Durban, África do Sul. **Anais...** International Pig Veterinary Society, 2008, p.21.

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

JANICE, R.C-Z.; NEIDE, L.S.; LUCIANO, M.P.; ALINE, V.; LANA, T.F.; MARCELO, H.; ODIR, A.D.; PAULO, A.E. Detection of porcine circovirus type 2 variants PCV2-1 and PCV2-2 in Brazilian Pig Population. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008, Durban, África do Sul. **Oral Proceedings**, p.33.

JOHNSON, C.; JOO, H.; DIREKSIN, K.; YOON, K.; CHOI, H. Experimental in utero inoculation on late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.507-512, 2002.

JU, C.; FAN, H.; TAN, Y.; LIU, Z.; XI, X.; CAO, S.; WU, B.; CHEN, H. Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**, v.109, p.179-190; 2005

KAICHUANG, S.; HUANRONG, L.; XIN, G.; XINNA, G.; HONG, J.; SHIJUN, Z.; HANCHUN, Y. Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.367-377, 2008

KIM, J.; CHUNG, H.K.; CHAE, C. Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. **Veterinary Journal**, v.166, p.251-256, 2003

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record**, v.155, p.489-492, 2004.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 254-263, 2000

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; McNEILLY, F.; WALDNER, C.; ALLAN, G. Features of porcine circovirus-2 disease: correlation between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.213-222, 2005.

KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MACINTOSH, K.; RINGLER, S.; RINGS, D.; HARTUNIAN, C.; ZHANG, Y.; ALLAN, G. Porcine genogroup 1 Torque Teno Virus (G-1TTV) potentiates both PCV2 & PRRS infection in gnotobiotic swine. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008, Durban, África do Sul. **Anais...** International Pig Veterinary Society, 2008, p.99.

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, 4629-4632, 2000

LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without post-weaning multisystemic syndrome. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.67, p.114-120, 2003

LEFEBVRE, D.; BARBÉ, F.; ATANASOVA, K.; NAUWYNCK, H. Inoculation of porcine foetuses with different genotypes and doses of PCV2. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008. Durban, África do Sul, **Anais...** International Pig Veterinary Society, 2008, p. 38.

LIU, J.; CHEN, I.; KWANG, J. Characterization of previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. **Journal of Virology**, v.79, p.8262-8274, 2005.

MADEC, F.; EVENO, E.; MORVAN, P.; HAMON, L.; BLANCHARD, P.; CARIOLET, L.; AMENNA, N.; TRUONG, C.; MAHÉ, D.; ALBINA, E.; JESTIN, A. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v.63, p.223-233, 2000.

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

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

MARTIN, H.; POTIER, M.; MARIS, P. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v.177, p.388-393, 2008.

MATEUSEN, B.; SANCHEZ, R.; VAN SOOM, A.; MEERTS, P.; MAES, D.; NAUWYNCK, H. Susceptibility of pig embryos to porcine circovirus type 2 infection. **Theriogenology**, v.61, p.91-101, 2004

MATEUSEN, B.; MAES, D.; Van SOOM, A.; LEFEBVRE, D.; NAUWYNCK, H. Effect of a porcine circovirus type 2 infection on embryos during early pregnancy. **Theriogenology**, v.68, p.896-901, 2007

McINTOSH, K.; HARDING, J.; ELLIS, J.; APPELYARD, G. Detection of porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, 58-61, 2006

MORENO, A.; PAIXAO, R.; OLIVEIRA, F.; GOBI, D.; NOVITA, S.; COUTINHO, T.; BACCARO, M. Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento em suínos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, XIII. 2007. Florianópolis. **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, p.249-250.

NAYAR, G.; HAMEL, A.; LIN, L.; SACHVIE, C.; GRUDESKI, E.; SPEARMAN, G. Evidence for circovirus in cattle with respiratory disease and from aborted bovine fetuses. **The Canadian Veterinary Journal**, v.40, p.277-278, 1999.

NAWAGITGUL, P.; MOROZOV, I., BOLIN, S.R., HARMS, P.A., SORDEN, S.D., PAUL, P.S. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. **Journal of General Virology**, v.81, 2281-2287, 2000.

O'CONNOR, B.; GAUVREAU, H.; WEST, K.; BOGDAN, J.; AYROUD, M.; CLARK, E.G.; KONOBY, C.; ALLAN, G.; ELLIS, J.A. Multiple porcine circovirus 2 associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.42, p.551-553, 2001

O'DEA, M.; HUGHES, A.; DAVIES, L.; MUHLING, L.; BUDLLE, R.; WILCOX, G. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. **Journal of Virological Methods**, v.147, p.61-66, 2008.

OLVERA, A.; SIBILA, M.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALES, J.; DOMINGO, M. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. **Journal of Virological Methods**, v.117, p.75-80, 2004.

PARK, J.S., KIM, Y., JUNG, K., CHOI, C., LIM, K., CHAE, C. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.130-144, 2005

PENSAERT, M.B., SANCHEZ, R.E., LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S., ALLAN, G.M. and NAUWYNCK, H.J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.175-183, 2004

PESCADOR, C., BANDARRA, P., CASTRO, L., ANTONIASSI, N., RAVAZOLLO, A., SONNE, L., CRUZ, C., DRIEMEIER, D. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27 (10), 425-429, 2007.

PITTMAN, S.J. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. **Journal of Swine Health and Production**, v.16, n.3, p.144-148, 2008.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CASALMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M., CHIANINI, F.; FOLCH, J.M; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURAN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**, v.149, p.357-361, 2001

QUNXING, P.; KONGWANG, H.; KEHE, H. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. **Vaccine**, v.26, p.2119-2126, 2008.

REICKS, D.; LEUWERKE, B. The effect of vaccination to porcine circovirus type 2 on detection in serum, blood swab and semen. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008, Durban, África do Sul, **Anais...**International Pig Veterinary Society, 2008, p.28.

REIS, K.C.P.; HENRIQUES, M.R.; COELHO, L.S.; GUIMARAES, W.V.; SANTOS, J.L. Molecular characterization of one porcine circovirus isolated in Brazil. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008, Durban, África do Sul, **Anais...**International Pig Veterinary Society, 2008, p. 66.

RISTOW, L.; LAGE, A.; PEREZ, A.; MOSQUERA, P.; REIS, M. Levantamento sorológico da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos no estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, XIII. 2007, Florianópolis. **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, p.331-334.

ROSELL C, SEGALÉS J, RAMOS-VARA JA, FOLCH JM, RODRIGUEZ-ARRIOJA GM, DURAN CO, BALASCH M, PLANA-DURAN J, DOMINGO M. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, 146, p.40-43, 2000.

SANCHEZ, R.E., MEERTS, P., NAUWYNCK, H.J.; PENSAERT, M.B. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.15-25, 2003

SANCHEZ, R.E., MEERTS, P., NAUWYNCK, H.J.; ELLIS, J.A.; PENSAERT, M.B. Characteristics of porcine circovirus 2 replication in lymphoid organs of pigs inoculated in late gestation or postnatally and possible relation to clinical and pathological outcome of infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.16, p.175-185, 2004

SANCHEZ, R.E.; NAUWYNCK, H.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.M; PENSAERT, M.B. Porcine circovirus 2 infection in swine fetuses inoculated at different stages of gestation. **Veterinary Microbiology**, v.83, p.169-176, 2001.

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

SCHMOLL, F.; LANG, C.; STEINRIGL, A.S.; SCHULZE, K.; KAUFFOLD, J. Prevalence of PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. **Theriogenology**, v.69, p.814-821, 2008.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, v.6, p.119-142, 2005.

SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M.; OLVERA, A.; SIBILA, M.; BADIELLA, L.; DOMINGO, M. Quantification of porcine circovirus type 2 DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.223-229, 2005.

SILVA, S.; SCHIOCHET, M.; DAMBROS, R.; ZIMMERMAN, J.; CIACCIZANELLA, J. Estudo sorológico da infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos em leitões de crescimento. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, XIII. 2007. Florianópolis. **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2007, p.335-338.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMAN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v.295, p.64-66, 1982.

VICENTE, J.; SEGALÉS, J.; HOFLE, U.; BALASCH, M.; PLANA-DURAN, J., DOMINGO, M.; GORTAZAR, C. Epidemiological study on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection in the European wild boar (*Sus scrofa*). **Veterinary Research**, v.35, p.243-253, 2004

ZANELLA, J. Doenças emergentes na suinocultura: circovirose suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS DE SUINOS, X. 2001. Porto Alegre, **Anais...** Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001, p.122-127.

ZANELLA, J.; MORES, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. Identificação do circovírus suíno tipo 2 por reação em cadeia da polimerase e por imunistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, 2006

ZIZLAVSKY, M.; CZANDERLOVA, L.; GAMPOVA, M.; KELLNEROVA, D.; TYDLITAT, D.; DRABEK, J. Significant role of PCV2 in reproductive disorders of sow. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, XX. 2008. Durban, África do Sul, **Anais...** International Pig Veterinary Society, 2008, p.110.

WEST, K.H., BYSTROM, J. M., WOJNAROWICZ, C., SHANTZ, N., JACOBSON, M., ALLAN, G.M., HAINES, D.M., CLARK, E.G., KRAKOWKA, S., McNEILLY, F., KONOBY, C., MARTIN, K, and ELLIS, J.A. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, 530-532, 1999.

ARTIGO CIENTÍFICO

Este artigo está de acordo com as normas da revista Ciência Animal

IDENTIFICAÇÃO DO CIRCOVÍRUS SUÍNO TIPO 2 E DO PARVOVÍRUS SUÍNO EM FETOS SUÍNOS NATIMORTOS E MUMIFICADOS PROVENIENTES DE GRANJAS NO BRASIL

IDENTIFICATION OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 AND PORCINE PARVOVIRUS IN PORCINE STILLBIRHTS AND MUMMIES FETUSES FROM FARMS IN BRAZIL

DANILO LEAL ROCHA,¹ JOSÉ LÚCIO DOS SANTOS,² GERALDO CAMILO ALBERTON³

1. Mestrando do Setor de Ciências Agrárias/UFPR, médico veterinário do laboratório Microvet

2. Professor Adjunto da Universidade Federal de Viçosa, médico veterinário responsável técnico pelo laboratório Microvet

3. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná

RESUMO – Foi investigada a presença de seqüências genômicas do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e do parvovírus suíno (PVS) em 147 amostras de fetos suínos natimortos e mumificados. Estas amostras, provenientes de 39 granjas localizadas em oito estados brasileiros, foram coletadas entre os anos de 2006 a 2008. Foram utilizados fragmentos de coração e pulmão para extração do DNA total e posterior amplificação de fragmentos correspondentes aos patógenos virais pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Entre as 147 amostras, 74 (50,3%) foram positivas ao PCV2 enquanto nove amostras (6,2%) apresentaram co-infecção com o PCV2 e o PVS. Nenhuma amostra foi positiva apenas para PVS. Entre as 39 granjas estudadas, 21 (53,8%) apresentaram fetos positivos ao PCV2 enquanto que co-infecção com o PCV2 e o PVS foi detectada em três (7,7%). Estes resultados indicam que o PCV2 pode ser um importante agente infeccioso causador de morte embrionária e fetal em suínos no Brasil, e deve ser incluído na lista de diagnóstico diferencial. **PALAVRAS-CHAVE:** suíno, circovírus suíno tipo 2 (PCV2), parvovírus suíno (PPV), falhas reprodutivas, reação em cadeia da polimerase (PCR).

ABSTRACT

This study investigated the presence of genome sequence of the porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) in 147 porcine stillbirths and mummies fetuses samples. These samples, originated from 39 farms located in eight Brazilian provinces, were collected between 2006 and 2008. Heart and lung fragments were used for extraction of total

DNA and latter amplification of correspondent fragments of the virus pathogens through polymerase chain reaction (PCR) technique. Out of 147 samples, 74 (50,3%) were positive for PCV2 while nine samples (6,2%) were positive for PCV2 and PPV. None of the samples were positive just for PPV. Out of 39 investigated farms, 21 (53,8%) had fetuses positive for PCV2 while co-infection with PCV2 and PPV were detected in 3 farms (7,7%). These results indicate that PCV2 could be an important infection agent in cases of porcine stillbirths and mummies fetuses in Brazil and must be included at differential diagnostic list.

KEY-WORDS: swine, porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV), reproductive failure, polymerase chain reaction (PCR).

INTRODUÇÃO

As falhas reprodutivas em suínos, tais como retorno ao cio, aborto, mortes embrionárias e fetais comprometem a meta de produção de leitões nascidos vivos e/ou desmamados de uma granja. Desta forma, estas falhas reprodutivas podem causar prejuízos econômicos na produção de suínos.

As causas de falhas reprodutivas em suínos podem ser de origem infecciosa ou não-infecciosa (HOLLER, 1994). Entre as causas não infecciosas, vários procedimentos de manejo podem influenciar o desempenho reprodutivo do plantel, enquanto que as infecciosas podem ser causadas, em especial, por agentes bacterianos e virais (ALMOND, 2006). Entre os agentes infecciosos mais freqüentes detectados em fetos suínos natimortos, mumificados e abortados podem-se destacar o parvovírus suíno (KIM et al., 2004; MORENO et al., 2007), o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (MALDONADO et al., 2005) e a *Leptospira spp* (MORENO et al., 2007). Estudos recentes têm associado o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) a falhas reprodutivas com efeitos diretos sobre o embrião ou o feto (WEST et al., 1999; SANCHEZ et al., 2001; JOHNSON et al., 2002; MATEUSEN et al., 2004; PARK et al., 2005; MATEUSEN et al., 2007; LEFEBVRE et al., 2008). Dentre estes agentes infecciosos citados, é importante destacar que o Brasil é considerado livre do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), sendo que estudos recentes não relataram soroconversão nas amostras investigadas (RISTOW et al., 2007; SILVA et al., 2007).

O circovírus suíno tipo 2 (PCV2), membro da família *Circoviridae*, é amplamente disseminado na população de suínos (SEGALÉS et al., 2005) e tem sido associado a outras enfermidades, tais como a síndrome da refugagem multissistêmica ou circovirose (ELLIS et al., 1999), a síndrome da dermatite e nefropatia (ROSELL et al., 2000), ao complexo de

doenças respiratórias dos suínos (KIM et al., 2003), ao aumento da mortalidade de leitões antes do desmame (BRUNBORG et al., 2007) e a imunossupressão (KAICHUANG et al., 2008).

Devido a esta variedade de enfermidades relacionadas ao PCV2, muitos estudos têm sido realizados em todo o mundo. No Brasil, o número de estudos relacionados ao PCV2 é crescente desde o primeiro relato da síndrome da refugagem multissistêmica (ZANELLA, 2001). Entretanto, poucos estudos relacionados ao PCV2 e falhas reprodutivas foram realizados, sendo que, nestes estudos o PCV2 foi considerado como agente infeccioso de pouca importância no Brasil (MORENO et al., 2007; PESCADOR et al., 2007). Por outro lado, em outros países, estudos têm relatado aumento nas taxas de aborto, retorno ao cio e fetos natimortos e mumificados relacionados ao PCV2 (WEST et al., 1999; BRUNBORG et al., 2007), sendo que, ZIZLAVSKY et al. (2008) relataram o PCV2 como o principal agente infeccioso detectado em fetos suínos na República Checa.

O objetivo deste estudo foi investigar, por meio da técnica de PCR, a presença do DNA do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e do parvovírus suíno (PVS) em fetos suínos natimortos e mumificados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a investigação da presença de fragmentos de DNA do PCV2 e do PVS foram utilizadas 147 amostras de fetos suínos natimortos e mumificados, provenientes de 39 granjas, coletados entre junho de 2006 a junho de 2008. As amostras foram provenientes de granjas localizadas em importantes regiões produtoras de suínos no Brasil: Minas Gerais (14), Paraná (12), Santa Catarina (6), Rio Grande do Sul (2), Goiás (2), Bahia (1), Rio de Janeiro (1) e Espírito Santo (1). Estas granjas possuíam plantel de 150 a 3000 matrizes com ciclo de produção completo ou unidades produtoras de leitões. Estas granjas utilizavam vacinação do plantel reprodutivo para o PVS e não utilizavam vacina para o PCV2.

Os fetos foram armazenados em sacos plásticos identificados, congelados em *freezer* a -20°C e posteriormente enviados em caixa isotérmica ao laboratório Microvet, localizado em Viçosa-MG. O período de transporte até o laboratório variou entre 24 a 48 horas. No laboratório os fetos foram necropsiados com material estéril para retirada de fragmentos de coração e pulmão.

A extração do DNA total foi realizada pelo método padrão fenol-clorofórmio, sugerido por DAVIS et al. (1994) com modificações. Fragmentos de coração e de pulmão de cada feto foram macerados com posterior adição de 3 a 5 mL de tampão fosfato (Na_2HPO_4 0,04 M;

KH_2PO_4 0,01 M, pH=7,4) para homogeneização. Foi realizada transferência de 1,5 ml da suspensão para tubos *Eppendorfs* e centrifugados a 10000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 1,0 ml de tampão fosfato com a adição de 125 μl de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10%, misturado por inversão e incubado em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após esta fase, foram adicionados 350 μl de acetato de potássio 8M, misturado por inversões repetidas e incubado em gelo por 60 minutos. O precipitado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 12°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorf* e foi adicionado um volume de fenol/clorofórmio (1:1). Após homogeneizar por inversões repetidas e separar as fases por centrifugação por 15 minutos a 10000 x g, a fase aquosa foi coletada e foi adicionado um volume de clorofórmio (Merck), misturado por inversões repetidas e as fases separadas por centrifugação por 15 minutos a 10000 x g. O sobrenadante foi coletado e adicionado dois volumes de etanol para precipitar DNA total. Centrifugação por 10 minutos a 15000 x g foi realizada para obtenção do sedimento, que foi lavado com 150 μl de etanol 70%. O etanol foi descartado e o sedimento seco em temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi ressuspense em 30 μl tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). Após determinação da concentração por absorvância 260 nm usando espectrofotômetro Ultrospec 1100 *pro* (Amersham Biosciences), o DNA total foi diluído para uma concentração de 50 ng/ μL e estocado a -80° C até o uso. Aplicação de uma alíquota do DNA total em gel de agarose 0,8% foi realizada para verificar integridade do DNA total.

A amplificação de fragmentos de DNA específicos de PCV2 e PVS foi realizada seguindo metodologia recomendada por KIM et al. (2003). Os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações estão indicados na tabela 1. Amplificações foram realizadas em 50 μl de mistura de reação contendo 50 ng de DNA total, 20 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,25 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 1 μM de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O programa de amplificação em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) consistiu de 30 ciclos com 1 passo de 94° C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 3 min. e finalizada com um passo de extensão de 72° C por 4 min. Produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose 1,5% em presença de brometo de etídeo e submetidos a eletroforese a 60 V e fotografados com luz ultravioleta. Os testes foram realizados com controle positivo e negativo para validação.

TABELA 1. Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações de fragmentos do DNA do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e do parvovírus suíno (PVS) e suas características

Vírus	Oligonucleotídeos e seqüência (5' para 3')	Posição do Nucleotídeo	Tamanho do Produto	Referência
PCV2	D CGGATATTGTAGTCCTGGTCG	1095-1115	481 pb	Ellis et al., 1999
	R ACTGTCAAGGCTACCACAGTCA	1570-1549		
PVS	D CCAGCAGCTAACACAAGAAAAGTTATCAC	3708-3730	226 pb	Arnauld et al., 1998
	R GTCCATGTTGGTAATCCATTGTAAATC	3907-3933		

D – direto R – reverso

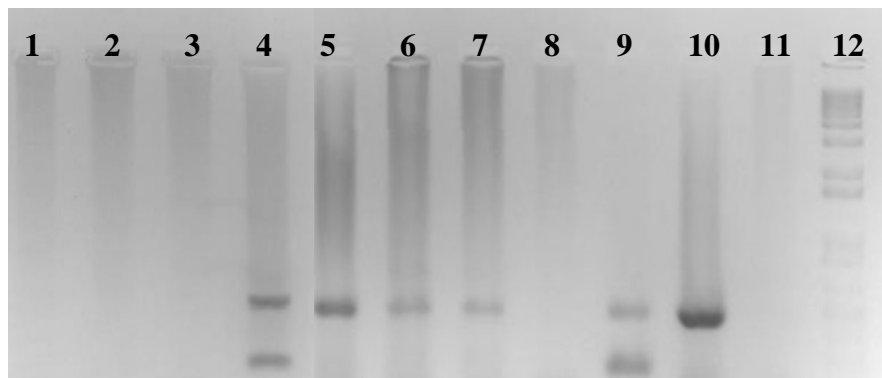
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 147 fetos natimortos e mumificados investigados foi detectado a presença de pelo menos um agente viral em 83 (56,5%) amostras enquanto que 64 (43,5%) amostras foram negativas aos agentes infecciosos investigados. O PCV2 foi detectado em 74 amostras (50,3%) enquanto nove amostras (6,2%) apresentaram co-infecção com o PCV2 e o PVS. Nenhuma amostra foi positiva apenas ao PVS. Entre as 39 granjas estudadas, 21 (53,8%) apresentaram fetos positivos ao PCV2 enquanto que co-infecção com o PCV2 e o PVS foi detectada em três (7,7%) granjas (tabela 2).

TABELA 2. Presença do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e do parvovírus suíno (PVS) em 147 amostras de fetos suínos natimortos e mumificados provenientes de 39 granjas do Brasil entre 06/2006 a 06/2008.

Agente viral	Amostras			Granjas		
	Total	Positivas	Porcentagem de positivas	Total	Positivas	Porcentagem de positivas
PCV2	147	74	50,3	39	21	53,8
PVS	147	0	0,0	39	0	0,0
PCV2 e PVS	147	9	6,2	39	3	7,7
Pelo menos um agente viral	147	83	56,5	39	24	61,5

FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose de produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) para circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e parvovírus suíno (PVS) de fragmentos de coração e pulmão de fetos suínos natimortos e mumificados.



Amostras 1,2,3,8 = PCR duplex negativo para PCV2 e PVS; Amostra 4 = PCR duplex positivo para PCV2 e PVS; Amostras 5,6,7,10 = PCR duplex positivo para PCV2; Amostra 9 = PCR duplex controle positivo para PCV2 e PVS; Amostra 11 = PCR duplex controle negativo para PCV2 e PVS; Amostra 12 = marcador molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

A frequência de detecção do PCV2 em fetos natimortos, mumificados e abortados nos estudos realizados no Brasil e no exterior variou consideravelmente. Os resultados do presente estudo são semelhantes ao realizado por ZIZLAVSKY et al. (2008). Neste estudo realizado na República Checa o PCV2 foi considerado o principal agente infeccioso detectado em fetos suínos entre os anos de 2005 a 2007, com frequência de detecção variando de 21,7% a 54,1%. KIM et al. (2004) em estudo realizado na Coreia do Sul relataram frequência do PCV2 em 13,1% dos 350 fetos mumificados, natimortos e provenientes de aborto. Entretanto, outros estudos obtiveram menor frequência de detecção do PCV2 em amostras de fetos suínos (MALDONADO et al., 2005; MORENO et al., 2007; PESCADOR et al., 2007). No Brasil, MORENO et al. (2007) não observaram amostras positivas ao PCV2 dentre os 1727 fetos analisados, enquanto que PESCADOR et al. (2007) relataram apenas 5,7% das amostras positivas ao PCV2 do total de 121 fetos investigados. MALDONADO et al. (2005) relataram que o PCV2 provavelmente não seja um patógeno importante relacionado a abortos, mesmo na Espanha onde a síndrome da refugagem multissistêmica é amplamente disseminada.

Alguns fatores podem influenciar os resultados dos estudos de frequência do PCV2 em fetos natimortos, mumificados e abortados. Entre estes, pode-se citar: a técnica utilizada para detecção dos agentes (KIM et al., 2004; PARK et al., 2005), a seleção dos fetos para o diagnóstico (PARK et al., 2005), o órgão fetal selecionado para detecção do agente viral

(SANCHEZ et al., 2003; KIM et al., 2004; PARK et al., 2005), a idade gestacional (SANCHEZ et al., 2001) e programas de vacinação para PCV2.

No presente estudo foi utilizado fragmento de coração e pulmão de fetos natimortos e mumificados de diferentes tamanhos. A concentração do PCV2 e do PVS nos tecidos fetais varia de acordo com a idade gestacional, bem como, entre órgãos de um mesmo feto, sendo o coração e o pulmão os órgãos fetais de maior concentração para o PCV2 e o PVS, respectivamente (SANCHEZ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2003; MENGELING et al., 2006; LEFEVBVRE et al., 2008). Vale ressaltar que PARK et al. (2005) demonstraram que o PCV2 pode causar aborto, entretanto, alguns fetos pode não apresentar lesões histopatológicas bem como não ser detectado a presença do DNA do PCV2.

Os resultados de detecção do PCV2 neste estudo demonstraram que a transmissão vertical pode ser uma importante via de infecção. Estudos demonstraram que fetos expostos ao PCV2 durante a gestação podem nascer vivos e carrear o vírus, entretanto, a manifestação clínica da síndrome da refugagem multissistêmica nestes leitões não foi determinada (SANCHEZ et al., 2004). Por outro lado, esta possibilidade não deve ser descartada, uma vez que em situações experimentais estes leitões podem não ser expostos aos mesmos desafios de um sistema de produção de suínos. O PCV2 pode ser veiculado por sêmen e oócitos de reprodutores soropositivos e sem sinais clínicos da síndrome da refugagem multissistêmica (LAROCHELLE et al., 2000; BIELANSKI et al., 2004; SCHMOLL et al., 2008). GAVA et al (2008) relataram que o PCV2 pode ser transmitido via sêmen aos fetos durante a gestação.

A detecção do PCV2 nos fetos natimortos e mumificados observada no presente estudo pode indicar que este vírus seja o causador da morte fetal, entretanto, a metodologia empregada não permite esta afirmação. Estudos com inoculação experimental, demonstraram que o PCV2 tem potencial em causar morte embrionária e fetal, podendo haver interrupção da gestação (SANCHEZ et al., 2001; SANCHEZ et al., 2003; MATEUSEN et al., 2004; PENSAERT et al., 2004; PARK et al., 2005; MATEUSEN et al., 2007; LEFEVBVRE et al., 2008; PITTMAN et al., 2008). Técnicas que possibilitem a quantificação viral nos tecidos fetais, como o PCR em Tempo Real, podem auxiliar na confirmação do PCV2 como responsável pela morte fetal, uma vez que, as titulações detectadas podem ser comparadas às titulações virais utilizadas em infecções experimentais com danos ao feto (SANCHEZ et al., 2003; PARK et al., 2005; LEFEVBVRE et al., 2008). Vale ressaltar que no Brasil, o parvovírus tem sido o agente infeccioso mais relacionado com transtornos reprodutivos

(MORENO et al., 2007), e, no presente estudo, o mesmo foi identificado em apenas nove (6,2%) das amostras e, mesmo assim, sempre associado com o PCV2.

CONCLUSÃO

O PCV2 foi detectado em 56,5% dos fetos natimortos e mumificados e deve ser considerado no diagnóstico diferencial de granjas com histórico de falhas reprodutivas.

AGRADECIMENTOS

À equipe do laboratório Microvet pelo apoio para a execução deste estudo.

REFERÊNCIAS

ALMOND, G.W.; FLOWERS, W.L.; BATISTA, L.; D'ALLAIRE, S. Diseases of the Reproductive System. In: Straw B, D'Allaire S, Taylor D, Zimmerman J, eds. Diseases of Swine. Ames, Iowa: Iowa State Univ Pr, 2006:113-148.

ARNAULD, C.; LEGEAY, O.; LAURIAN, Y. et al. Development of a PCR based-method coupled with a microplate colorimetric assay for the detection of porcine parvovirus and application to diagnosis in piglets tissues and human plasma. **Molecular and cellular probes**, v.12, p.407-416, 1998.

BIELANSKI, A., LAROCHELLE, R., ALGIRE, J. et al. Distribution of PCV2 DNA in the reproductive tract, oocytes and embryos of PCV2 antibody positive pigs. **Veterinary Record**, v.155, p.597-598, 2004.

BRUNBORG, I.; JONASSEN, C.; MOLDAL, J. et al. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.368-375, 2007.

DAVIS, L.; KUEL, W.M.; BATTEY, F.J. Rapid Preparation of Genomic DNA from Tissue or Culture Cells. In: Molecular Biology. 2. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994.

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

GAVA, D.; ZANELLA, E.; MORES, N.; CIACCI-ZANELLA, J. Transmission of porcine circovirus 2 by semen and viral distribution in different piglet tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p.70-76, 2008.

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

JOHNSON, C.; JOO, H.; DIREKSIN, K. et al. Experimental in utero inoculation on late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.507-512, 2002.

KAICHUANG, S.; HUANRONG, L.; XIN, G. et al. Changes in peripheral blood leukocyte subpopulations in piglets co infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2. **Veterinary Microbiology**, v.129, p.367-377, 2008.

KIM, J.; HAN, D.; CHOI, C.; CHAE, C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.6, p.741-744, 2003.

KIM, J.; JUNG, K.; CHAE, C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. **Veterinary Record**, v.155, p.489-492, 2004.

LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MULLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, 4629-4632, 2000.

LEFEBVRE, D.; BARBE, F.; ATANASOVA, K.; NAUWYNCK, H., 2008. Inoculation of porcine foetuses with different genotypes and doses of PCV2. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 20, 2008, Durban, África do Sul. **Anais...** Durban: IPVS, 2008.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D. et al. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Veterinary Journal**, v.169, p.454-456, 2005.

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

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

MENGELING, W. L. Porcine Parvovirus. In: Straw B, D'Allaire S, Taylor D, Zimmerman J, eds. **Diseases of Swine**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 2006, p. 373-385.

MORENO, A.; PAIXÃO, R.; OLIVEIRA, F. et al. Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e aborto em suínos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 13, 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRAVES, 2007.

PARK, J.S.; KIM, Y.; JUNG, K. et al. Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal of Comparative Pathology**, v.132, p.130-144, 2005.

PENSAERT, M.B.; SANCHEZ, R.E.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S. et al. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.175-183, 2004.

PESCADOR, C.; BANDARRA, P.; CASTRO, L. et al. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27 n.10, p.425-429, 2007.

PITTMAN, S.J. Reproductive failure associated with porcine circovirus type 2 in gilts. **Journal of Swine Health and Production**, v.16, n.3, p.144-148, 2008.

RISTOW, L.; LAGE, A.; PEREZ, A. et al. Levantamento sorológico da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos no estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 13, 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRAVES, 2007.

ROSELL, C.; SEGALÉS, J.; RAMOS-VARA, J.A. et al. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. **Veterinary Record**, v.146, p.40-43, 2000.

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

SANCHEZ, R.E.; MEERTS, P.; NAUWYNCK, H.J.; PENSAERT, M.B. Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.15-25, 2003.

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

SCHMOLL, F.; LANG, C., STEINGIGL, A.S. et al. Prevalence on PCV2 in Austrian and German boars and semen used for artificial insemination. **Theriogenology**, v.69, p.814-821, 2008.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus diseases. **Animal Health Research Reviews**, v.6, p.119-142, 2005.

SILVA, S.; SCHIOCHET, M.; DAMBROS, R. et al. Estudo sorológico da infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos em leitões de crescimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 13, 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: ABRAVES, 2007.

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

Zanella, J. Doenças emergentes na suinocultura: circovirose suína. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS DE SUINOS, 10, 2001, Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: ABRAVES, 2001.

ZIZLAVSKY, M.; CZANDERLOVA, L.; GAMPOVA, M. et al. Significant role of PCV2 in reproductive disorders of sows. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 20, 2008, Durban, África do Sul. **Anais...** Durban: IPVS, 2008.