ROBERTO DE ANDRADE BORDIN

Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira*
spp. na ocorrência de mortalidade fetal e
embrionária em suínos

São Paulo
2010

ROBERTO DE ANDRADE BORDIN

Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira*
spp. na ocorrência de mortalidade fetal e
embrionária em suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento: Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador:
Profa. Dra. Andréa Micke Moreno

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2318
FMVZ

Bordin, Roberto de Andrade

Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos / Roberto de Andrade Bordin. -- 2010.

52 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Andréa Micke Moreno.

1. *Leptospira* spp. 2. Parvovirus Suíno. 3. Aborto. 4. Mumificados. 5. Natimorto.
I. Título.

ERRATA

BORDIN, R. A. **Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos.** 2010. 52f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	4	(Doutorado em Medicina Veterinária)	(Doutorado em Ciências)
Abstract	4	Thesis (Ph.D. in Veterinary Medicine)	Tese (Doutorado em Ciências)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Perfil de eliminação de agentes infecciosos envolvidos em rinite na espécie suína”, protocolado sob o nº1550/2008, utilizando 756 suínos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26 de novembro de 2008.

We certify that the Research “Elimination profile of infectious agents related with rhinitis in swine specie”, protocol number 1550/2008, utilizing 756 (seven hundred fifty six) swine, under the responsibility Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/26/08.

São Paulo, 27 de novembro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BORDIN, Roberto de Andrade

Título: Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data da Defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.(a). Dr.(a) Andréa Micke Moreno, pela sua tranquilidade como pessoa e pelo seu companheirismo em todos os momentos da realização deste trabalho.

Aos profissionais do Laboratório de Sanidade Suína, pela pronta e imprescindível ajuda na realização do trabalho.

À Renata Paixão, Marina e Rafael Bueno, sempre prontos ao auxílio profissional para realização deste trabalho e sua amizade verdadeira.

Aos amigos Gilberto Vargas e Eduardo Bordin, irmãos de longa data, pela sua força e amizade.

Aos amigos Neimar Roncati, César Dinola Pereira, brilhantes professores e exemplos para minha formação.

Ao amigo e excelente profissional, médico veterinário Fabrício Delgado pelo auxílio profissional sempre.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, lar onde este trabalho foi realizado.

Às pessoas envolvidas com o curso de Medicina Veterinária da Universidade Anhembi Morumbi.

Aos suínos e aves, fonte inspiradora de informações e conhecimento.

A Deus pela oportunidade de viver dia após dia.

A minha Família, Esposa e amor Larissa Resende e meu filho Henrique, meus motivos de viver sempre alegre.

Sempre ao meu Pai, Ismar Bordin, meu maior exemplo de força, entusiasmo e dedicação, com certeza a pessoa mais inspiradora da minha vida.

RESUMO

BORDIN, R. A. **Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos.** [Role of infection with Porcine Parvovirus and *Leptospira* spp. in fetal and embryonic mortality occurrence in swine]. 2010. 52f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Perdas devido à natimortalidade, mumificação fetal, abortamentos e morte embrionária são responsáveis por uma considerável queda no desempenho da indústria suinícola no Brasil e no mundo. Dentre os agentes mais freqüentemente descritos como causadores de falhas reprodutivas em suínos pode-se citar o Parvovírus suíno, *Leptospira* spp. O diagnóstico das causas infecciosas de mortalidade embrionária e fetal torna-se muitas vezes inviável pelo estado de autólise do material ou dificuldades inerentes às características de crescimento do vírus ou bactéria envolvido. O presente estudo teve por objetivo avaliar os resultados obtidos no período de oito anos de detecção de Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. em falhas reprodutivas e discutir alguns aspectos relativos ao diagnóstico destas infecções. Foram avaliados 1901 fetos, sendo coletadas de cada animal, uma amostra de pool de órgãos e uma de conteúdo gástrico, perfazendo um total de 3642 análises. Observou-se uma freqüência de 27,6% dos fetos positivos para Parvovirus suíno, 19,8% positivos para *Leptospira* spp e 1,1% positivos para os dois agentes em associação. Dentre as 339 granjas avaliadas em oito Estados Brasileiros, 48,5% foram positivas para um ou ambos agentes pesquisados. Avaliou-se a freqüência de fetos positivos em casos de abortamento, natimortalidade e mumificação fetal e comparou-se a eficiência da pesquisa dos agentes em amostras de órgãos, conteúdo gástrico e em ambos. Os resultados obtidos indicam a grande importância destes agentes infecciosos nos quadros de falha reprodutiva em granjas de suínos no Brasil, apesar da ampla utilização de vacinas contra os mesmos. .

Palavras-chave: *Leptospira* spp. Parvovirus Suíno. Abortos. Mumificados. Natimortos. Diagnóstico.

ABSTRACT

BORDIN, R. A. **Role of infection with Porcine Parvovirus and *Leptospira* spp. in fetal and embryonic mortality occurrence in swine.** [Papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos]. 2010. 52f Thesis (Ph.D. in Veterinary Medicine) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Losses due to stillbirths, mummification, embryonic death and abortions account for a considerable drop in performance of the pig industry in Brazil and the world. Among the agents most frequently described as causes of reproductive failure in pigs may be mentioned the swine parvovirus, *Leptospira* spp. The diagnosis of infectious causes of fetal and embryonic mortality it is often impossible for the state of autolysis of the material or the difficulties inherent growth characteristics of the virus or bacteria involved. Present study has the goal evaluate the results obtained in eight year period of Parvovirus and *Leptospira* spp. detection in reproductive failure and discuss some aspects related to diagnosis of these infections. A total of 1901 fetuses were examined, and from each animal a sample of different tissues and a sample of gastric contents were collected, representing 3642 analysis. A frequency of 27.6% of Parvovirus positive fetuses were observed, followed by 19.8% of *Leptospira* spp. positive fetuses, and 1.1% positive to both agents. Among 339 swine herds evaluated from eight Brazilian States, 48,5% were positive to one or both infectious agents. The frequency of positive fetuses in abortion, stillbirths and mummification, and the efficiency of virus and bacterial detection from organs and gastric contents were compared. The results obtained indicate the high importance of these infectious agents in reproductive failure in Brazilian swine herds, beside the large utilization of commercial vaccines against then.

Keywords: *Leptospira* spp. Parvovirus. Porcine abortions. Mummified. Stillbirths. Diagnosis.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição dos fetos enviados de acordo com os anos (intervalo de 2000 a 2008).....	27
Gráfico 2 -	Distribuição dos das granjas avaliadas de acordo com os Estados.....	28
Gráfico 3 -	Número de fetos positivos para os agentes isoladamente e em associação.....	36
Gráfico 4 -	Número de granjas positivas para os agentes isoladamente e em associação.....	36
Gráfico 5 -	Frequência de fetos positivos para Parvovirus suíno de acordo com o tipo de ocorrência (abortamento, natimortalidade e mumificação).....	37
Gráfico 6 -	Frequência de fetos positivos para <i>Leptospira</i> spp. de acordo com o tipo de ocorrência (abortamento, natimortalidade e mumificação).....	37
Gráfico 7 -	Número de fetos positivos para Parvovirus suíno de acordo com o tipo de amostra (pool de órgãos e conteúdo gástrico).....	38
Gráfico 8 -	Número de fetos positivos para <i>Leptospira</i> spp. de acordo com o tipo de amostra (pool de órgãos e conteúdo gástrico).....	38
Gráfico 9 -	Número de granjas positivas para Parvovirus suíno e <i>Leptospira</i> spp de acordo com os Estados de origem.....	39
Gráfico 10 -	Número de fetos positivos para Parvovirus suíno e <i>Leptospira</i> spp de acordo com os Estados de origem.....	39
Gráfico 11 -	Número de fetos positivos para Parvovirus suíno e <i>Leptospira</i> spp de acordo com os anos avaliados.....	40
Gráfico 12 -	Distribuição sazonal das amostras positivas para Parvovirus suíno e <i>Leptospira</i> spp. no intervalo de 2000 a 2008.....	40

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Seqüência de primers descritos para detecção de Parvovírus suíno, <i>Leptospira spp</i> e tamanho dos fragmentos esperados.....	29
------------	---	----

LISTA DE FIGURA

Figura 1 -	.Distribuição dos fetos enviados de acordo com os Estados.....	28
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição das amostras analisadas de acordo com o tipo de ocorrência e suas características.....	27
Tabela 2 -	Distribuição das amostras de acordo com o tipo de material coletado.....	27
Tabela 3 -	Frequência de fetos positivos e negativos através da PCR para Parvovirus Suíno e <i>Leptospira spp.</i>	31
Tabela 4 -	Frequência dos agentes dentre os sistemas de produção de suínos avaliados nas granjas brasileiras.....	32
Tabela 5 -	Frequência de fetos positivos para Parvovirus Suíno em relação ao tipo de ocorrência (abortos, natimortos e mumificados).....	32
Tabela 6 -	Frequência de fetos positivos para <i>Leptospira spp.</i> em relação ao tipo de ocorrência (abortos, natimortos e mumificados).....	33
Tabela 7 -	Frequência de fetos positivos para <i>Leptospira spp.</i> em função do tipo de amostra analisada.....	34
Tabela 8 -	Frequência de fetos positivos para <i>Leptospira spp.</i> em função do tipo de amostra analisada.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	CADEIA SUINÍCOLA NACIONAL E INTERNACIONAL.....	13
2.2	PRINCIPAIS FALHAS REPRODUTIVAS EM FÊMEAS SUÍNAS.....	15
2.3	LEPTOSPIROSE.....	18
2.4	PARVOVIROSE.....	21
3	OBJETIVOS.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	MATERIAL.....	26
4.2	MÉTODO.....	29
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5	RESULTADOS.....	31
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as principais doenças que afetam a suinocultura brasileira são doenças multifatoriais e de ampla ação antigênica, que por consequência acarretam em redução no desempenho produtivo geral dos sistemas de produção de suínos.

O desempenho animal resulta de uma complexa interação de processos biológicos. Esses processos são regulados pela conjunção de fatores genéticos e ambientais que participam do metabolismo. Fatores ambientais, tais como condições térmicas, manejo nutricional e padrão sanitário, irão definir qual a proporção do potencial genético que os animais poderão efetivamente expressar. Dentre essas variáveis não genéticas, o padrão sanitário é uma das mais decisivas para a otimização do desempenho zootécnico. Com isto várias observações a respeito de conceitos de sanidade, aplicados na produção e principalmente na reprodução dos suínos, são muito importantes para se evitar perdas econômicas significativas.

Sendo a matriz suína a principal fonte de lucro para o criador de suínos, qualquer problema reprodutivo que venha a ocorrer pode trazer sérios prejuízos ao suinocultor. A maioria das falhas reprodutivas encontradas são retornos irregulares ao estro, abortamentos, natimortalidade, mumificação fetal e corrimentos.

As causas de alterações reprodutivas em suínos podem ser divididas em causas de origem infecciosa e não infecciosas. Muitos agentes infecciosos têm sido descritos como causadores destas alterações, dentre os mais freqüentes encontram-se o Parvovírus suíno e a *Leptospira spp.* Assim como a Leptospirose, a Parvovirose suína

é uma doença reprodutiva comum, presente em quase 100% das granjas comerciais do mundo.

O diagnóstico das causas de falha reprodutiva exige o exame de rebanho, isto é, uma análise detalhada das condições de produção da granja e a interpretação integrada dos resultados obtidos nos exames laboratoriais. O número de testes disponibilizados atualmente aumenta cada vez mais a possibilidade de diagnósticos precisos em relação aos problemas sanitários nas granjas. Nos últimos 20 anos as técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), têm sido cada vez mais usadas para detectar a presença de material genômico dos agentes em baixas concentrações nos tecidos infectados. Desta forma o objetivo do presente estudo foi caracterizar as perdas reprodutivas de origem infecciosas relacionadas a Parvovirose e Leptospirose suína, em fetos provenientes de diversos estados brasileiros no período de 2000 a 2008 através da reação em cadeia pela polimerase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CADEIA SUINÍCOLA NACIONAL

A indústria suinícola se posiciona entre as mais dinâmicas do agronegócio brasileiro, pelos efeitos positivos e multiplicadores que causam na cadeia de insumos, em especial milho, soja e rações, bem como setores de industrialização, transporte, indústria química e biológica entre outros. O Brasil tem características ideais para continuar mantendo sua posição como um dos maiores países produtores de carne

suína do mundo, já que, apresenta grande potencial de produção de milho e soja e tem áreas disponíveis, para o crescimento do plantio e da implantação de novos projetos. Como consequência a esse conjunto de fatores, a suinocultura nacional têm apresentado expressivo crescimento da produção e das exportações (SILVEIRA & TALAMINI, 2007).

A reprodução, o diagnóstico e o controle das doenças de produção, bem como a conservação do meio ambiente, bem estar animal, qualidade da carne e a segurança dos alimentos, proporcionam para todos os implicados na cadeia suinícola um desafio relevante tanto em pesquisas como em novas técnicas produtivas e preventivas (ROPPA, 1999).

A produção industrial de suínos cresceu uma média de 19,8% nos últimos quatro anos, passando de 26,4 milhões de cabeças ao fim de 2004, para mais de 30 milhões de cabeças em 2009. (ABYPECS, 2009).

A atividade suinícola é uma das mais tecnificadas do setor pecuário, estando em constante evolução, procurando obter maior produtividade, associada a um menor custo de produção. A busca por esses objetivos obriga os técnicos e produtores a melhorarem a eficiência de produção, visando minimizar as perdas produtivas. Dessa forma, destaca-se a importância do estudo das falhas reprodutivas em fêmeas suínas, que constituem a principal e a mais freqüente causa para remoção de matrizes de rebanhos comerciais (VARGAS, 2007).

2.2 FALHAS REPRODUTIVAS EM FÊMEAS SUÍNAS

Diversas causas são apontadas como desencadeantes de falhas reprodutivas na espécie suína: fatores nutricionais, comportamentais, estresse ambiental, interferências genéticas e agentes infecciosos. Os fatores relacionados ao manejo e ao ambiente induzem, em geral, problemas reprodutivos em proporções consideradas aceitáveis dentro da produção comercial de suínos. O manejo inadequado da reprodução, situações extremas de estresse térmico para as matrizes, toxinas fúngicas e problemas infecciosos são relacionados às causas de natimortos (STRAW, 2007).

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. Como representantes bacterianos têm-se alguns sorovares de *Leptospira interrogans*, *Brucella suis* e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (GENOVEZ et al., 1995). Entre os vírus, os mais encontrados são Parvovírus Suíno (PVS) (BERSANO et al., 1995), o vírus da doença de Aujeszky; vírus da influenza suína, vírus da síndrome reprodutiva e respiratória do suíno (PRRSV) e circovírus suíno tipo 2 (PCV2) (PLANA et al., 1992)

Em granjas comerciais, a taxa anual de reposição de matrizes, que compreende fêmeas descartadas ou mortas, é de, aproximadamente 50% (STEIN et al., 1990). Dessas reposições, 32 a 40% das fêmeas são descartadas devido às falhas reprodutivas (HEINONEN et al., 1998). Esses dados revelam a importância destas ocorrências, que agem interferindo na produção, promovendo o aumento dos dias não

produtivos e a elevação da taxa de remoção de matrizes do plantel, provocando importantes perdas econômicas na indústria suína.

Entre as falhas reprodutivas, o retorno ao estro após a cobertura ou inseminação artificial é uma das mais importantes por ser de alta ocorrência (MEREDITH, 1995). Além disso, a taxa de retorno é um importante parâmetro utilizado para medir a eficiência do manejo reprodutivo da granja (TUMMARUK et al., 2001).

O retorno irregular ao estro após a cobertura é aquele que ocorre em intervalos mais curtos ou mais longos do que a duração normal do ciclo estral podendo estar relacionado a anomalias genéticas, infecções, micotoxinas ou outras situações estressantes (MEREDITH, 1995).

O Abortamento é definido como a expulsão de fetos antes do 110º dia de gestação, sem que nenhum dos fetos sobreviva por mais de 24 horas. O abortamento ocorre devido à interrupção dos mecanismos que mantêm a prenhez, culminado no início prematuro do parto (CLARK et al., 1986). Uma ocorrência de 1,5% a 2% de abortamento das fêmeas cobertas é considerada aceitável em granjas com manejo reprodutivo eficaz, como descrito por Costa et al. (2005). Os abortamentos podem assim como as outras falhas terem causas infecciosas e não infecciosas (MUIRHEAD & ALEXANDER, 2000). Alguns autores sugerem que 60% dos abortamentos ocorrem devido a causas não infecciosas, normalmente ocasionadas por falha maternal ou fatores ambientais, sendo raramente, devido às falhas embrionárias ou fetais (ZANELLA, SILVEIRA e SOBESTIANSKY, 2007). Costa et al. (2005), avaliaram as características da taxa de abortamento de um plantel em um período de 4 anos e verificaram que fêmeas cobertas nos meses de janeiro, fevereiro e março apresentam

maiores taxas de abortamento. Esses mesmos autores mostraram que os abortamentos precoces (< 35 dias) são os que ocorrem com maior frequência.

No caso de abortamentos por causas infecciosas, os agentes podem invadir o ambiente uterino e inviabilizar o feto e/ou multiplicar-se na placenta interrompendo o suprimento sanguíneo para o mesmo, ou podem causar uma infecção generalizada desencadeando um processo febril na porca. (MUIRHEAD & ALEXANDER, 2000).

As mortes fetais eventuais, que ocorrem após 90 dias de gestação, são consideradas como natimortalidade, representando aproximadamente 5 a 7% dos fetos nascidos totais. Segundo Dial e colaboradores (1992), os natimortos podem ser classificados em dois grupos: leitões que morrem antes do parto, denominados natimortos tipo I (morte pré-parto) e fetos que ainda vivos no início do parto, morrem durante os mesmo, chamados de natimortos tipo II (com morte intra-parto).

A mumificação fetal é um processo não específico que ocorre quando os fetos mortos são retidos dentro do útero e desidratam, sendo considerada normal uma taxa de 1,5% do total de leitões nascidos, sendo que tanto agentes virais como bacterianos podem causar este processo (ZANELLA et al., 2007).

Sabe-se que a simples observação do aspecto do feto suíno morto, não permite 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. O tipo de falha, abortamento, natimortalidade ou mumificação não é característico da sua causa e nem da presença de algum agente infeccioso, reforçando ainda mais a importância do diagnóstico laboratorial nestas ocorrências (SOBESTIANSKY et al., 1999).

No Brasil, levantamentos epidemiológicos das causas de abortamento, natimortalidade e mumificação fetal não têm sido realizados sistematicamente, no entanto, estima-se que a participação de agentes infecciosos nestes distúrbios reprodutivos seja de grande importância, merecendo, portanto, a atenção de diferentes setores ligados à saúde animal (SCHNEIDER, WENTZ, BORTOLOZZO, 2001).

2.3 LEPTOSPIROSE

Entre as doenças bacterianas que podem gerar uma queda significativa nos índices reprodutivos em suínos esta a Leptospirose, uma zoonose de ampla distribuição geográfica (MAILLOUX, 2001).

O agente causador da leptospirose é uma bactéria (Espiroqueta) do gênero *Leptospira*, sendo um microorganismo espiralado e filamentosos (VASCONCELLOS, 2004). Recentemente, por genotipagem, as leptospirosas foram reclassificadas em 16 genótipos, não correspondendo às duas espécies anteriores, *Leptospira interrogans* (patogênicas) e *Leptospira biflexa* (saprofíticas) (LEVETT, 2001)

São conhecidas diversas espécies de leptospirosas porém os sorovares mais comuns causadores de transtornos reprodutivos em suínos são *L. interrogans* sorovares, *pomona*, *bratislava*, *icterohaemorrhagiae* e *copenhageni* (SOBESTIANSKY, 2007).

Alguns estudos experimentais confirmam que a *Leptospira* pode ficar até 180 dias viáveis no ambiente com condições ideais (pH, umidade e proteção a raios solares), já o sorovar *Pomona* pode resistir até 6 meses em solos saturados de umidade, em solos secos sua sobrevivência cai para 30 minutos. Este é um grande fator de

risco, uma vez que seu longo período de viabilidade pode permitir que vários animais sejam infectados e acabem contraindo e disseminando a doença (SOTO, 2007).

Os suínos são considerados reservatórios de leptospirosas, inclusive por outras espécies. O *Rattus norvegicus* ocupa posição de destaque na transmissão da leptospirose, sendo considerado uma importante fonte de infecção. A fonte de infecção geralmente é o animal infectado que contamina a água, piso ou ração através da urina, sendo infecção por via oral, venérea, pele lesada com maior frequência em suinocultura. (OLIVEIRA, 2007). Delbem, et al (2004) descreveram que a presença de água estagnada próximo às baias dos suínos seria a principal via de transmissão da Leptopirose.

O diagnóstico da leptospirose suína pode ser realizado através de sinais epidemiológicos da doença, clínicos dos animais e confirmados por diferentes métodos laboratoriais baseados na detecção direta ou indireta do agente (FAINE et al., 1999).

O diagnóstico clínico é baseado nos sinais e sintomas apresentados pelos animais (GENOVEZ, 2007). Nos animais jovens, durante a fase de aleitamento, podem ocorrer casos de encefalite caracterizados por incoordenação motora e acessos convulsivos com movimentos de pedalamiento. Já nas fêmeas suínas, o problema é de esfera reprodutiva, gerando abortamentos, partos distócitos, leitegadas pequenas, baixo número de nascidos totais, mumificação fetal, descarga vulvar, natimortos e nascimento de leitões fracos de baixa viabilidade pós parto, aumentando significativamente o índice de mortalidade (VASCONCELLOS, 2004).

Genovez et al., (2001) avaliaram a reação de contraímunoeletroforese (CIE) como teste gênero – específico para diagnóstico da leptospirose suína, estes autores observaram uma limitada ação do teste diagnóstico em sua capacidade gênero –

específica, o que não é desejável para testes de triagem de campo, mas sendo útil na detecção precoce da resposta sorológica em relação à SAM, pois além de rápido, seguro, de fácil execução apresenta baixo custo se tornando interessante para a análise em grande escala de amostras

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a técnica de PCR é mais específica, sensível e rápida para o diagnóstico da leptospirose, sendo uma importante ferramenta diagnóstica (SHIMABUKURO, 2003).

O controle da leptospirose suína é baseado na imunização de suscetíveis, nas ações sobre as fontes de infecção, visando diminuir a quantidade de leptospiras lançadas no ambiente, tais como saneamento das instalações como a realização do vazão sanitário com um programa de limpeza e desinfecção que diminua a pressão de infecção das instalações suínas. As vacinas anti-leptospirose suína disponíveis no mercado brasileiro são constituídas de bactérias íntegras inativadas polivalentes. Os sorovares comumente presentes são: Canicola, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Pomona, Grippotyphosa e Bratislava (SOTO, 2007). Recomenda-se vacinar duas doses vacinais nas marrãs, sendo a primeira dose aos 28 e a outra dose aos 14 dias da cobertura. Nos cachos recomenda-se a vacinação semestral.

A vacinação contra a leptospirose em suínos previne a doença, diminui a taxa de abortamentos e mortalidade fetal. Entretanto, a especificidade dos sorovares limita a eficiência destas vacinas (WATANABE, 2005).

2.4 PARVOVIROSE

Estando presente em todos os continentes, acomete suínos adultos, embriões, ou fetos sendo caracterizada por morte embrionária e fetal (RODRIGUEZ, 2003).

O Parvovírus Suíno (PVS) é um vírus não envelopado, e recebe este nome devido ao pequeno tamanho do agente, onde “parvo” no latim significa pequeno. A replicação do vírus ocorre no núcleo das células infectadas durante a multiplicação celular, pois os parvovírus não têm a habilidade de estimular ou iniciar a síntese de DNA em células em repouso. (RUIZ, et al 2009). Em suínos, apenas um gênero de parvovírus é conhecido, entretanto técnicas moleculares possibilitaram a identificação de novos parvovírus (HIJISAKA et al., 2001)

O Parvovírus suíno tem como alvo células em alta atividade mitótica, o que o leva a ter tropismo por células de tecidos linfóides em adultos, e tecidos embrionários ou fetais em fêmeas prenhes. (SOBESTIANSKY, 2007).

Os suínos se infectam através da ingestão da placenta durante o parto, por contato oronasal com fezes e secreções contaminadas, por sêmen contaminado no caso das fêmeas e secreções vaginais no caso dos machos (MELO, 2008). Portando pode-se definir duas formas para um suíno se infectar com o parvovírus: a chamada transmissão horizontal onde o animal entra em contato com o vírus presente em fezes, secreções fetos ou materiais infectados no ambiente, e a vertical que é passada da mãe para a leitegada via intra-uterina (WHITTEMORE, 1993).

A eliminação do vírus se dá pelas fezes e secreções até 2 semanas após a infecção e nas baias pode resistir por até 4 meses (MENGELING, 1999).

Após a infecção oronasal, o vírus se multiplica nas amígdalas, e a viremia se inicia a partir de 3 a 5 dias. Quando uma fêmea gestante é infectada pelo vírus, este atravessa a placenta e se multiplica lentamente no útero. Sendo assim é comum se observar além do abortamento fetos mumificados em vários estágios. Se a gestação chega ao término, pode acontecer ainda, a presença de mumificados, leitões vivos normais, leitegada fraca e de tamanho reduzido (MELO, 2008). Em casos onde a gestação esta no seu 1º terço os fetos podem morrer, gerando perda da gestação e a fêmea pode retornar ao cio ou permanecer vazia. Já em gestações avançadas os fetos podem se apresentar mumificados ou natimortos. Desta forma, tecidos fetais e seus envoltórios são importantes fontes de contaminação (MORAES & COSTA, 2007).

De maneira geral caso a infecção ocorra até os 30 dias de gestação, pode ocorrer morte parcial ou total dos embriões, sendo os embriões eliminados naturalmente. Após o 30º dia de gestação, ocorre deposição de cálcio nos ossos fetais, impedindo a reabsorção. Ocorrendo infecção entre 30 e 70 dias de gestação, ocorre a morte dos fetos, onde os tecidos moles desidratam, mas o tecido ósseo permanece intacto, levando a mumificação fetal. Após os 65-70 dias de gestação os fetos se tornam imunocompetentes, sendo capazes de responder a infecção. Nestas situações pode-se detectar anticorpos no soro dos leitões (ROEHE, et al., 2007).

Com relação aos sinais e sintomas da fêmea podemos ter repetição do cio, parição de número menor de leitões, fetos mumificado, baixo volume abdominal durante a gestação, retorno ao cio irregular, ocorrência de falsa gestação, diminuição do ganho de peso das fêmeas no ultimo mês de gestação. Como nem todos os fetos se infectam através da placenta durante a viremia da gestante, sabe-se que alguns se infectam intra-uterinamente via fetos adjacentes, o que explica um sinal clássico da

doença que é a morte fetal em diferentes estágios de desenvolvimento (SOBESTIANSKY, 1999).

O vírus pode resistir no ambiente por até 4 meses, sendo resistente a solventes orgânicos (éter), enzimas proteolíticas, pH entre 3 e 9 e temperatura de 60°C por 2 horas, o que aumenta as chances de infecção. Sua inativação é feita de forma adequada quando é retirado o material orgânico do ambiente e utilizado hipoclorito de sódio ou formalina a 3% (SOBESTIANSKY, 1999).

Como os fetos/leitões podem carrear vírus ou ter anticorpos, pode-se usar um conjunto de técnicas buscando a detecção do agente ou anticorpos contra o mesmo, como imunofluorescência direta, hemaglutinação, ELISA, PCR, e o mais usado inibição da hemaglutinação (IH). No que diz respeito ao diagnóstico, podemos utilizar ainda o isolamento viral em células suínas, principalmente nas linhagens PK-15 (rim suíno), SK-6 (rim suíno) e ST (testículo suíno) (SOBESTIANSKY, 1999).

A partir de 1991, a detecção do DNA viral através da reação em cadeia pela 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). Posteriormente, foi aplicada uma técnica denominada de *nested*-PCR, desenvolvida com iniciadores direcionados para a amplificação do gene da proteína NS1, mais conservada entre os diferentes linhagens de PVS, que foi bastante eficaz na detecção do genoma viral em diferentes tecidos de fetos (SOARES et al., 1999). Atualmente, a PCR em tempo real tem sido descrita como uma forma eficiente de diagnóstico para PVS associando a sensibilidade e especificidade da PCR convencional com a vantagem de possibilitar a quantificação e a leitura automatizada dos resultados (McKILLEN, 2007).

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, os fetos mumificados se caracterizam por ser o sinal clínico mais freqüentemente associado à parvovirose e ainda apresenta ocorrências acima dos níveis considerados aceitáveis (2%) em criações tecnificadas (MACHUCA et al., 1999). Com relação ao aborto, onde uma freqüência 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 (RODRIGUEZ et al., 2003).

A vacinação deve ser feita em todos os animais reprodutores do plantel (machos e fêmeas). A primeira vacinação deve ocorrer com 160 dias de vida, machos devem ser vacinados a cada 6 meses, fêmeas 1 dose antes da cobertura e outra após (MENGELING, 1999). Caso a vacinação não seja possível, algumas granjas colocam as fêmeas em contato com o vírus antes da primeira gestação (marrãs de 170-190 dias e idade) (SOBESTYANSKY, 1999).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi caracterizar perdas reprodutivas como abortamento, natimortalidade e mumificação fetal quanto a participação do Parvovirus suíno e de *Leptospira* spp em amostras provenientes de diversos estados brasileiros no período de 2000 a 2008 através da reação em cadeia pela polimerase – PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL:

No presente estudo, foi analisado um total de 1901 fetos suínos enviados ao Laboratório de Sanidade Suína da Universidade de São Paulo entre os anos de 2000 – 2008 (Gráfico 1). Os fetos foram provenientes de sistemas de produção de suínos dos Estados do Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Geras e Rio Grande do Sul, totalizando 339 granjas (Gráfico 2, Figura 1). Estas amostras foram distribuídas em 354 abortamentos, 1124 fetos mumificados e 423 fetos natimortos, tabela 1.

Para cada animal avaliado foram coletados dois tipos de amostra, uma do conteúdo gástrico e outra de caracterizada por uma coleção de órgãos parenquimatosos (baço, pulmão, fígado e rins), totalizando 3642 amostras processadas através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), tabela 2. Em alguns casos, devido ao reduzido tamanho do feto não foi possível coletar o conteúdo gástrico, sendo coletados apenas os órgãos.

Foram empregadas como controle positivo nos testes uma amostra de Parvovirus suíno cedida pelo Instituto Biológico de São Paulo e uma cepa de *Leptospira interrogans* serovar *pomona* cedida pelo Laboratório de zoonoses bacterianas, VPS-FMVZ-USP.

Tabela 1. Distribuição das amostras analisadas de acordo com o tipo de ocorrência e suas características.

Tipo de ocorrência	Número de Fetos	% de Fetos
Abortos	354	18,7
Mumificados	1124	59,1
Natimortos	423	22,2
Total	1901	100

Tabela 2. Distribuição das amostras de acordo com o tipo de material coletado.

Amostras	Número de Amostras	Amostras (%)
Conteúdo Gástrico	1737	47,69
Pool de órgãos	1905	52,31
Total	3642	100

Gráfico 1 – Distribuição dos fetos enviados de acordo com os anos (intervalo de 2000 a 2008).

Gráfico 2 – Distribuição dos das granjas avaliadas de acordo com os Estados

Figura 1 – Distribuição dos fetos enviados de acordo com os Estados

4.2 METODO:

Extração de DNA

O DNA foi purificado pela extração de DNA baseada nas propriedades de lise e inativação de nucleases do isotiocianato de guanidina junto às propriedades das partículas de terra diatomácea em ligar-se ao DNA ou RNA. Este método para purificação de ácidos nucleicos foi descrito por Boom et al (1990).

Amplificação do DNA (PCR)

A reação para pesquisa DNA dos agentes foi realizada com 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 pmoles dos *primers* específicos para cada agente, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase, 200 μ M de cada dNTP, 1 X tampão de PCR, 5 μ l da amostra de DNA e água até o volume final de 50 μ l. A reação foi submetida à desnaturação à 94° C por 4 minutos seguidos por 35 ciclos de 1 minuto cada à 94° C, 1 minuto à 55° C (Parvovirus suíno) ou 60° C (*Leptospira* spp.) e 1 minuto à 72° C.

Os primers utilizados para detecção de cada agente e o tamanho dos fragmentos obtidos foram listados no quadro 1.

QUADRO 1- Seqüência de primers descritos para detecção de Parvovírus, *Leptospira* spp e tamanho dos fragmentos esperados.

Agente	Primer	Seqüência	Produto
Parvovirus suíno ¹	Parvo -1	ATACAATTCTATTTTCATGGGCCAGC	137 pb
	Parvo -6	TATGTTCTGGTCTTTCCTCGCATC	
	Parvo-2	TTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGC	
	Parvo-5	ACCTGAACATATGGCTTTGAATTGG	
<i>Leptospira</i> spp. ²	Lep A	GGCGGCGCGTCTTAAACATG	331 pb
	Lep B	TTCCCCCATTGAGCAAGATT	

1- Soares et al, (1999); 2 - Mérien et al, (1992)

Detecção do produto de amplificação.

As amostras (10 µl produto amplificado) foram misturadas com 1µl do corante Blue Green® (LGCbiotecnologia) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%. O gel foi então fotografado através de luz ultra-violeta em um sistema de fotodocumentação convencional. Os fragmentos foram identificados com base na utilização de 100 bp DNA *Ladder*.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados encontrados foram apresentados diretamente por sua distribuição porcentual seguindo os valores qualitativos entre positivos e negativos e suas relações amostrais. A análise estatística dos dados foi realizada através do Teste de Chi-quadrado e do Teste exato de Fischer empregando o programa computacional estatístico SAS, ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir são referentes à análise de dados de 1901 fetos, totalizando 3642 amostras divididas em coleções de órgãos parenquimatosos e conteúdo gástrico.

De acordo com a tabela 3 (Gráfico 3) os resultados obtidos foram de 27,6% dos fetos, positivos para o Parvovírus Suíno (PVS), 19,8% positivos para *Leptospira spp.* e 1,1 % dos fetos foram positivos para ambos os agente. Os fetos negativos tanto para *Leptospira ssp.* quanto para PVS totalizam 51,5% dos fetos analisados durante o estudo.

Tabela 3. Frequência de fetos positivos e negativos através da PCR para Parvovírus Suíno e *Leptospira spp.*

Diagnóstico	Número de Fetos	% de Fetos
Parvovírus suíno	524	27,6
<i>Leptospira spp.</i>	378	19,8
<i>Leptospira spp</i> e PVS	20	1,1
Negativos	979	51,5
Total	1901	100

Dentre as 339 granjas avaliadas, observa-se 6,2% dos rebanhos positivos para os agentes em associação, 35,3% dos rebanhos positivos para o Parvovírus suíno e 25,7% positivos para *Leptospira spp.* isoladamente, conforme foi descrito na tabela 4 (Gráfico 4).

Tabela 4. Frequência dos agentes pesquisados dentre os sistemas de produção de suínos avaliados nas granjas brasileiras.

Resultado	Número de granjas	% Granjas
Parvovírus suíno	120	35,3
<i>Leptospira spp</i>	87	25,7
Parvovírus suíno e <i>Leptospira spp</i>	21	6,2
Negativas	111	32,8
Total	339	100

Conforme descrito na tabela 5, a frequência de amostras positivas para Parvovirus suíno foi de 24,8% nos casos de abortos, 17,9% nos fetos natimortos e 32% entre os mumificados, apresentando uma distribuição heterogênea na composição geral dos positivos havendo uma frequência maior de positivos entre os fetos mumificados em relação aos outros tipos de ocorrências (Gráfico 5). Neste caso observou-se uma associação estatística significativa entre o tipo de ocorrência e a positividade do agente (letras diferentes, teste qui – quadrado, $p < 0,05$).

Tabela 5. Frequência de fetos positivos para Parvovirus Suíno em relação ao tipo de ocorrência (abortos, natimortos e mumificados).

Ocorrência	Positivos Parvovirus Suíno	Fetos por ocorrência	% Fetos positivos por ocorrência
Aborto	88	354	24,8 ^a
Natimorto	76	423	17,9 ^b
Mumificado	360	1124	32,0 ^a
Total	524	1901	-

Conforme descrito na tabela 6 e gráfico 6, a frequência de amostras positivas para *Leptospira ssp.* foi de 31% nos casos de abortos, 23,6% em fetos natimortos e 14% para mumificados. Observa-se neste caso uma frequência maior do agente em fetos abortados e natimortos em relação aos fetos mumificados. Neste caso observou-se uma associação estatística significativa entre o tipo de ocorrência e a positividade do agente (letras diferentes, teste qui – quadrado, $p < 0,05$).

Tabela 6. Frequência de fetos positivos para *Leptospira ssp.* em relação ao tipo de ocorrência (abortos, natimortos e mumificados).

Ocorrência	Positivos <i>Leptospira ssp.</i>	Fetos por ocorrência	% Fetos positivos por ocorrência
Aborto	111	354	31,0 ^a
Natimorto	100	423	23,6 ^b
Mumificado	167	1124	14,0 ^c
Total	378	1901	-

Na tabela 7 e gráfico 7 verifica-se a positividade para PVS de acordo com o tipo de amostra examinada. Dentre os fetos positivos observa-se que o agente foi detectado em 50,9% dos conteúdos gástricos e em 45,2% dos *pools* de órgãos isoladamente. Um reduzido número de fetos, apenas 3,9%, foi positivo para o agente, simultaneamente, nas duas amostras, conteúdo gástrico e pool de órgãos.

Tabela 7. Frequência de fetos positivos para Parvovirus suíno. em função do tipo de amostra analisada.

Tipos de Amostra	Parvovirus Suínos (PVS)	% Fetos
Pool de órgãos (PO)	237	45,2
Conteúdo Gástrico (CG)	267	50,9
Ambos.	20	3,9
Total	524	100

Na tabela 8 observa-se a frequência de fetos positivos para *Leptospira spp.* de acordo com a amostra coletada. Verifica-se que em 39,4% dos fetos o agente estava presente apenas em amostras de pool de órgãos, em 37,9% apenas em conteúdo gástrico, sendo que em 22,7% dos casos o agente foi detectado em ambas as amostras simultaneamente. A distribuição amostral dos dados pode ser observada no gráfico 8.

Tabela 8. Frequência de fetos positivos para *Leptospira spp.* em função do tipo de amostra analisada.

Tipos de Amostra	<i>Leptospira spp.</i>	% Fetos
Pool de órgãos (PO)	150	39,4
Conteúdo Gástrico (CG)	143	37,9
PO e CG, ambos	85	22,7
Total	378	100

A distribuição de fetos e granjas positivas para Parvovirus suíno e *Leptospira spp.* de acordo com o Estado pode ser observada nos gráficos 9 e 10. A distribuição anual de fetos positivos para os agentes PVS e *Leptospira spp.* é apresentada no gráfico 11.

O perfil de positividade para Parvovirus suíno e *Leptospira spp.* apresentaram uma distribuição repetitiva ao longo do intervalo deste estudo (2000 a 2008) conforme ilustrado no gráfico 12 e heterogênea em relação aos meses do ano. As épocas do ano caracterizadas por outono e inverno apresentaram maior frequência para ambos os agentes, nestas estações, com exceção do mês de junho, a maior frequência de positivos está relacionada à presença *Leptospira spp.* Proporcionalmente, nas estações de primavera e verão verifica-se uma menor frequência de fetos positivos para os agentes.

Gráfico 3 – Número de fetos positivos para os agentes isoladamente e em associação.

Gráfico 4 – Número de granjas positivas para os agentes isoladamente e em associação.

Gráfico 5 – Frequência de fetos positivos para Parvovirus suíno de acordo com o tipo de ocorrência (abortamento, natimortalidade e mumificação)

Gráfico 6 – Frequência de fetos positivos para *Leptospira* spp. de acordo com o tipo de ocorrência (abortamento, natimortalidade e mumificação)

Gráfico 7 – Número de fetos positivos para Parvovirus suíno de acordo com o tipo de amostra (pool de órgãos e conteúdo gástrico)

Gráfico 8 – Número de fetos positivos para *Leptospira* spp. de acordo com o tipo de amostra (pool de órgãos e conteúdo gástrico).

Gráfico 9 – Número de granjas positivas para Parvovirus suíno e *Leptospira* spp de acordo com os Estados de origem.

Gráfico 10 – Número de fetos positivos para Parvovirus suíno e *Leptospira* spp de acordo com os Estados de origem.

Gráfico 11 – Número de fetos positivos para Parvovirus suíno e *Leptospira* spp de acordo com os anos avaliados.

Gráfico 12 – Distribuição sazonal das amostras positivas para Parvovirus suíno e *Leptospira* spp. no intervalo de 2000 a 2008.

6. DISCUSSÃO

Muitas são as causas de falhas reprodutivas que ocorrem em suínos, sendo que estas podem ser definidas como fatores infecciosos ou não infecciosos podendo classificar estas doenças em multifatoriais, sendo amplamente distribuídas no plantel nacional e se caracterizando por uma elevada taxa de perdas econômicas para os sistemas de produção de suínos (SOBESTIANSKY, 2007).

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 (MALDONADO et al., 2005).

De forma rápida utilizando a técnica de PCR se verifica uma melhor interpretação dos resultados, juntamente com o histórico clínico do plantel para realizar este diagnóstico diferencial nas diversas falhas reprodutivas observadas em uma granja (SHIMABUKURO, 2003; Gonçalves et al., (2009). De acordo com Langoni, (1999) o DNA, uma molécula muito estável pode facilmente ser detectada mesmo em amostras autolisadas e ou contaminadas viabilizando assim o diagnóstico rápido e sensível, principalmente em que outras provas seriam inviáveis, justificando assim seu uso na suinocultura.

O presente estudo propôs avaliar o papel da infecção por Parvovirus suíno e *Leptospira spp.* na ocorrência de mortalidade fetal e embrionária em suínos usando a técnica de PCR como metodologia diagnóstica, sendo os dados discutidos a seguir:

O tipo de amostra enviada ao laboratório para análise variou de acordo com as ocorrências mais comuns dentre as falhas reprodutivas que acometem a espécie suína. No presente estudo, os fetos mumificados representaram 59,1% das amostras enviadas, os fetos natimortos 22,2% e os fetos abortados 18,7% (Tabela 1).

A ocorrência da leptospirose em uma criação de suínos resulta em falhas reprodutivas significativas para este plantel. Falhas como abortamentos, fetos mumificados e leitões natimortos apresentam distribuição ao acaso conforme a patogenia do agente (FERREIRA NETO et al., 1997). No presente estudo a detecção de *Leptospira spp.* foi significativamente maior e fetos abortados (31%) e natimortos (23,6%), que em fetos mumificados (14%), independente do tipo de amostra, seja ela conteúdo gástrico ou mesmo pool de órgãos (Tabela 6). De acordo com Furuya et al., (2006), utilizando PCR, *Leptospira spp.* esteve presente em 35,6% dos fetos abortados oriundos de 17 granjas com problemas reprodutivos no Japão, resultado semelhante ao do presente estudo.

Poucos estudos aplicando a detecção de *Leptospira spp* através da PCR são descritos na literatura, em menos ainda no Brasil apesar do impacto sanitário e econômico desta zoonose no País.

Em 1978, KIRKBRIDE e McADARAGH 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, sendo que destes, 4,9% foram positivos para Parvovirus suíno. Posteriormente, a análise de fetos mortos de 100 leitegadas também dos EUA, mostrou uma prevalência de 33% do antígeno de Parvovirus nos pulmões desses animais, com o uso do teste de imunofluorescência direta (MENGELING et al., 1991). No presente estudo a participação do Parvovirus

suíno foi de 27,6% para o total de fetos oriundos de granjas que apresentaram falhas reprodutivas, independente do tipo de feto (Tabela 3) e membros do gênero *Leptospira* foram detectados em 19,8% dos fetos, sendo que ambos os agentes estavam presentes em 1,1% dos animais. Quando se associa o agente viral (PVS) com o tipo de feto analisado observou-se uma distribuição de 24,8% de positivos para os fetos abortados; 17,9% para os natimortos e 32% para os fetos mumificados em um total de 524 fetos positivos para PVS (Tabela 5), indicando uma frequência significativamente menor fetos natimortos positivos para o vírus. Ao contrário do observado aqui, em estudo desenvolvido por Wolf, (2008) não foi verificada diferença significativa entre os diferentes tipos de fetos, considerando o conjunto dos tecidos positivos ($p>0,05$), porém, a análise evidenciou maior tendência para a presença de PVS em fetos natimortos.

A literatura descreve como sintoma clássico para ocorrência de surtos de Leptospirose a ocorrência de abortamentos e natimortalidade, fato confirmado pelos achados deste estudo. A infecção por Parvovírus é sempre associada a mumificação fetal, no entanto, os dados aqui apresentados revelam que há presença significativa do agente em casos de abortamento e em menor grau em animais natimortos (RAMADAS, 2001; SOTO et al, 2007).

De acordo com Maldonado et al., (2005) que avaliaram a presença de Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína, Parvovirus suíno, Virus da doença de Aujeszky e Circovirus suíno tipo 2 em 293 fetos em 100 rebanhos na Espanha, uma média de 35% dos problemas reprodutivos das granjas deste país estão relacionados com agentes infecciosos, resultando em abortos, natimortos e fetos mumificados. Este

dados é inferior ao observado no presente estudo em que se observou 48,5% de fetos e 67,2 dos rebanhos positivos para Parvovirus suíno, *Leptospira* spp. ou ambos.

As amostras negativas aqui descritas, apesar de em menor número, podem ainda estar associadas a outros agentes infecciosos. Neste mesmo estudo de Maldonado e colaboradores quando avaliado o principal agente envolvido nos problemas reprodutivos, estes autores observaram uma frequência maior do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS), agente que até o momento não foi identificado no Brasil. Parvovirus Suíno apresentou baixa incidência nos plantéis Espanhois, fato este relacionado no referido estudo ao esquema vacinal local efetivo e aplicado rotineiramente.

De acordo com o tipo de amostras processadas verifica-se que dentre as amostras positivas para *Leptospira* spp., 39,4% eram pool de órgãos, 37,9% eram conteúdo gástrico isoladamente e 22,7% representam as duas amostras (pool de órgãos e conteúdo gástrico) simultaneamente (Tabela 8). A partir deste dado pode-se inferir que a escolha apenas de pool de órgãos como amostra para o diagnóstico, reduziria o número de amostras positivas em 37,9% e o contrário também seria verdadeiro, ou seja, a opção pela avaliação apenas de conteúdo gástrico, reduziria o número de animais positivos em 37,9%. Avaliando-se a presença de Parvovirus suíno em órgãos e conteúdo gástrico, verifica-se uma redução ainda maior na chance de identificar ao agente caso seja realizada a escolha de apenas um tipo de amostra. Das amostras positivas para o vírus 45,2% eram representadas por órgãos, 50,9% eram de conteúdo gástrico e apenas 3,9% dos positivos se referem aos dois tipos de amostra simultaneamente. Estudos com metodologia de coleta semelhante não foram identificados na literatura consultada.

A sazonalidade, fator importante para o entendimento epidemiológico de qualquer doença, pode estar refletindo neste estudo a presença de condições atuantes do hospedeiro em função dos fatores de risco destas doenças, presentes no ambiente de granja nestes períodos. Observou-se no presente estudo que os agentes estudados foram mais freqüentes em outono e inverno (Gráfico 12). Neste período pode estar ocorrendo uma reduzida periodicidade nas práticas de limpeza e desinfecção ocasionando um aumento da pressão de infecção local, presença de acúmulos de água ao redor das instalações das granjas, fator relacionado à disseminação de Leptospirose e a contaminação de grãos por micotoxinas que pode levar a fêmea a uma imunossupressão e desencadear processos patológicos oportunistas. Na primavera e no verão, o estresse térmico é mais evidente sobre as fêmeas suína, podendo contribuir de forma mais significativa para ocorrência de falhas não infecciosas, diluindo desta forma a freqüência de positivos para os agentes pesquisados.

Através dos dados originados no presente estudo, sugere-se a necessidade de um melhor dimensionamento das amostras a serem enviadas e a avaliação dos diferentes tecidos e conteúdo gástrico a fim de se ampliar as chances de caracterização dos agentes presentes nos rebanhos avaliados.

7. CONCLUSÕES

A utilização da técnica molecular de diagnóstico se mostrou adequada, tanto para PVS quanto para *Leptospira spp.*, independente do tipo da amostra permitindo a detecção em amostras de fetos com menor grau de conservação tecidual.

A ocorrência de 51,5% de fetos negativos para os dois agentes estudados é inferior a descrita na literatura para estudos envolvendo maior número de infecções, indicando o sucesso da metodologia empregada.

A detecção de *Leptospira spp.* foi associada significativamente a ocorrência de abortos, seguida por fetos natimortos e com menor associação à mumificação.

A detecção do Parvovirus suínos foi associada significativamente a ocorrência de mumificados e abortos.

As diferenciação de amostras em conteúdo gástrico e pool de órgãos contribuiu de forma importante para o maior sucesso no diagnóstico de Parvovirus Suíno e *Leptospira spp.* a partir das amostras avaliadas;

REFERÊNCIAS

- ABIPECS informativo [on line]. Carne suína brasileira em 2007. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em 30 out. 2009.
- BADKE, M. R. T., Leptospirose. CONGRESSO ABRAVES, Santa Catarina, 2001
Disponível em : <http://www.cnpsa.embrapa.br/abrades-sc/pdf/Memorias2001/1_manuelrenato.pdf>. Acesso em ago.2009.
- 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, p. 37, 1995. Suplemento.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**; v. 28, p. 495-503, 2001.
- CLARK, L. K. Factors influencing live litter size. In: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**: diagnosis, treatment and reproductive diseases in small and large animals. W.B. Saunders Company, 1986, cap.11, p. 928-930.
- COSTA, M. S.; AMARAL FILHA, W. S.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, IVO; BORTOLOZZO, F. P. Características da taxa de abortamento de uma granja de suínos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., 2005, Fortaleza, **Anais...**, p. 220-221.
- DELBEM, A. B.; BOTAZZO, A. C.; SILVA, C. A.; MULLER, E. E.; DIAS, R. A.; NETO, J. S. F.; FREITAS, J. L. Fatores de risco associados à soropositividade para leptospirose em matrizes suínas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 847-852, mai-jun, 2004.
- DIAL, G. D.; MARSH, W. E.; POLSON, D. D.; VAILLANCOURT, J. P. Reproductive failure: differential diagnosis. In: LEMAN, A. D.; STRAW, B. E.; MENGELING, W. L.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D. J. **Diseases of swine**. 7. ed. Ames: Iowa State University Press, 1992. Cap. 6, p. 88-137.
- FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Melbourne, MediSci, 1999, 272 p.
- FERREIRA NETO, J. S.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; MORETTI, A. S.; CAMARGO, C. P.; SAKAMOTO, S. M.; MARANGON, S.; TURILLI, C.; MARTINI, M. *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* seropositivity and the reproductive performance of sows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, p. 87-93, 1997.
- FURUYA, T.; FUJI, T.; MORI, K.; KIKUCHI, N. Survey on swine Leptospirosis in premature and stillborn fetuses, by PCR and antibody test. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 59, n. 7, p. 459-463, 2006.

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, p. 1-9, 1995. Suplemento 23.

GENOVEZ, M. E.; YASUDA, P. H.; VASCONCELLOS, S. A.; SCARELLI, E.; CARDOSO, M. V.; GIRIO, R. S. Evaluation of the counterimmunoelectrophoresis reaction as serodiagnosis test for swine leptospirosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 147-152, 2001.

GIRIO, R. J. S. Alterações reprodutivas e anatomopatológicas em fêmeas suínas com títulos de anticorpos contra *Leptospira interrogans* sorotipo icterohaemorrhagiae. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 5, n. 3, p. 99-103, 1998.

GONÇALVES, K. R.; SOUZA, C. K.; STRECK, A. F.; GAVA, D.; ARGENTI, L. E.; RAVAZZOLO, A. P.; CANAL, C. W. Detecção de parvovírus suíno e circovírus suíno Tipo 2 em diversos órgãos de leitões refugos pela técnica de REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (ABRAVES), 14., 2009, Uberlândia, MG. **Anais...** Belo Horizonte, Abraves - MG, 2009.

HEINONEN, M.; LEPPÄVUORI, A.; PYÖRÄLÄ, S. Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. **Animal Reproduction Science**, v. 52, p. 235-244, 1998.

HIJISAKA, M.; ABE, K.; WIN, K. M.; SHIMIZU, Y. K.; KEICHO, N.; YOSHIKURA, H. Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. **Japanese Journal of infection and disease**, v. 54, p. 244-245, 2001.

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.

KUCHIISHI, S. S.; MORES, M. A. Z.; REICHERT, S.; NEZZI, L.; SOUZA, G. R. M. Atualização no levantamento sorológico de leptospirose suína no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS (ABRAVES), 14., 2009, Uberlândia, MG. **Anais...** Belo Horizonte, Abraves - MG, 2009.

LANGONI, H. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada**, v. 2, n. 1, p. 52-58, 1999.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Veterinary**, v. 14, p. 296-326, 2001.

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.

MACKILLEN J. Molecular beacon real – time PCR detection of swine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 155-165, 2007.

MAILLOUX, M. Leptospiroses. **International Journal of Zoonoses**, v. 78, n. 12, p. 1158-1159, 2001.

MALDONADO, J.; SEGÁLES, 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. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 454-456, 2005.

MELO, M. Sanidade em suínos. **Suinocultura industrial**, ago/2008. disponível em: <<http://www.suinoculturaindustrial.com.br>> Acesso em ago. 2008.

MEREDITH, M. J. Pig Breeding and infertility. In: MEREDITH, M.J. **Animal breeding and infertility**. Cambridge: Blackwell Science, 1995, p. 278-353.

MÉRIEN, F.; AMOURIAX, P.; PEROLAT, P.; BARATON, G.; SAINT GIRONS, I. Polymerase chain reaction for detection of leptospira spp. in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

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.

MORAES M. P.; COSTA P. R. S. Parvoviridae. In: FLORES E.F. Ed. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 377-396,

MORENO, A.; PAIXAO, R.; OLIVEIRA, F.; GOBBI, 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, 13., 2007. **Anais...** Florianópolis, Abraves, 2007. p. 249-250.

MUIRHEAD, M. R.; ALEXANDER, T. J. L. **Managing pig health and the treatment of disease. A reference for the farm**. United Kingdom: Entreprises, 1997, 608p.

OLIVEIRA, S. J. Leptospirose In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D.; **Doenças dos Suínos**. Goiânia: 2007.

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.

RAMADASS, P., ARVIS, B. D., CORNER, R. J., PENNY, D., MARSHALL, R. B Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. **The Indian Veterinary Journal**, v. 74, n.6, p. 457-460, 2001.

RODRÍGUEZ, C. A. R. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovirus suíno em suínos do município de Uruara, estado do Pará. **Arquivo do Instituto. Biológico**, São Paulo, v. 70 , n. 4, p. 501-503, 2003.

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-parvovirus suíno em suínos do município de Uruará, Estado do Pará. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 501-503, 2003.

ROEHE, P. M.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D. E. S. N. Parvovirose. In: SOBESTIANSKY J. & BARCELLOS D. E. S. N. (Ed.) **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007, p. 286-293.

ROPPE, L. Situação Atual e Tendências da Suinocultura Mundial. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AMBIÊNCIA E QUALIDADE NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL EM SUÍNOS, 1999, Piracicaba. **Anais...** 1999. p. 96-206.

SCHNEIDER, L. G.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Natimortalidade na suinocultura industrial. **Suplemento Técnico da Revista CFMV**, Ano 7, v. 23, p. 41-50, 2001.

SHIMABUKURO, F. H.; DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; SILVA, A. V.; PINHEIRO, J. P.; PADOVANI, C. R. Pesquisa de suínos portadores renais de leptospiras pelo isolamento microbiano e reação em cadeia pela polimerase em amostras de rins de animais sorologicamente positivos e negativos para leptospirose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 246-253, 2003.

SILVEIRA, P. R. S.; TALAMINI, D. J. D. A cadeia produtiva de suínos no Brasil. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v. 42, p.18-11, 2007.

- 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.
- SOBESTIANSKY, J. **Clínica e patologia suína**. 2.ed. Goiânia: Art 3 impressos especiais, 1999, 463p.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D. E. S. N.; **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 2007, 768p.
- SOTO, F. R. M. Leptospirose suína. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 379-395, 2007.
- STEIN, T. E., DIJKHUIZEN, A. A.; D'ALLAIRE, S., MORRIS, R. S. Sow culling and mortality in commercial swine breeding herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 9, p. 85-94, 1990.
- STRAW, B. E. Differential diagnossis of swine diseases In: TAYLOR, D.J.; STRAW B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L. **Diseases of swine**. 10.ed. Ames: Iowa State University Press, 2007 p.75-77.
- TUMMARUK, P.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S.; DALIN, A. M. Repeat breeding and subsequent reproductive performance in Swedish Yorkshire sows. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 267-280, 2001.
- VARGAS, A. J.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I. Que decisão tomar frente a matrizes que apresentam falhas reprodutivas: elas merecem uma nova chance?, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p.57-62, 2007. Suplemento.
- VASCONCELOS, S. A. Leptospirose animal. In: CONPAVET, 2004. Disponível em: <<http://www.spmv.org.br/conpavet2004>>. Acesso em: jul. 2008.
- WATANABE, H. Leitospirosis vaccines: past, present and future. **Journal Postgrad Medicine**, v. 3, n. 51, p. 210-214, 2005.
- 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.
- WOLF, V. H. G., **Pesquisa da presença de parvovírus suíno (PVS) em tecidos de fetos de suínos**, 2008. 87p. Tese: (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade de Campinas, Campinas, 2008.

WHITTEMORE, C. Ciencia y práctica de la producción porcina. Espanha: **Editora Acribia**, 1993.

ZANELLA, E.; SILVEIRA, P. R. S.; SOBESTIANSKY, J. Falhas Reprodutivas. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças dos suínos**. Goiânia: Cânone Editorial, 2007, p. 541 – 575.