

CAMILA SÁ ROCHA

**DETECÇÃO DE PARVOVÍRUS SUÍNO EM MATERIAL PROVENIENTE DE
PORCAS COM PATOLOGIAS REPRODUTIVAS**

LAGES – SC

2010

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

CAMILA SÁ ROCHA

**DETECÇÃO DE PARVOVÍRUS SUÍNO EM MATERIAL PROVENIENTE DE
PORCAS COM PATOLOGIAS REPRODUTIVAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Janice Reis Ciacci Zanella

LAGES – SC

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pela saúde, aos desafios impostos e ao maravilhoso presente que é a minha tão amada família.

Agradeço aos meus pais Mírian e Reynaldo pela oportunidade da minha educação, pelo apoio e incentivo dados em todos os momentos da minha vida. Agradeço por me ensinarem que com fé, amor, determinação e paciência consigo alcançar meus objetivos. Vocês me ensinaram a importância de saber plantar sementes boas na época certa e, principalmente, saber esperar a colheita dos frutos. E que desafios são colocados em nossas vidas como provação, para amadurecermos e nos tornarmos mais fortes e melhores a cada dia. Muito obrigada por “aguentarem” a nossa distância todos esses anos, por confiarem em mim e acreditarem no meu potencial. É graças ao amor incondicional de vocês que consigo suportar a saudade e seguir adiante.

Muito obrigada aos meus irmãos e melhores amigos Renata e Thiago pelo amor, pela força e incentivo. Me orgulho das pessoas maravilhosas que vocês são. Vocês e nossos pais são presente Divino para mim.

Agradeço demais aos meus avós, tios, primos e amigos pela força.

Tenho muito que agradecer a minha orientadora Janice, pela oportunidade de realizar este delicioso trabalho. Obrigada pela confiança depositada, pelo carinho, pela preocupação e por não me deixar sentir “desorientada” em momento algum por estamos tão longe. Foi muito bom trabalhar com você e sua equipe e espero ter outras oportunidades.

Muito obrigada ao Nelson Morés e ao Armando Amaral pela grande ajuda para a realização deste trabalho, sem o apoio de vocês ficaria complicado. Foi muito importante e divertido trabalhar com vocês!

Agradeço ao Paulo Esteves e a Alessandra D’ávila por estarem sempre dispostos a ajudar, no que fosse preciso. Agradeço as ajudas e o carinho.

Ao Alexandre Tessmann por todo o apoio no sequenciamento das amostras, e pelas risadas!

Agradeço ao “Bira” pela prontidão em ajudar, pelo carinho e pela torcida!

Agradeço a todos os funcionários da Embrapa - Suínos e Aves - que de alguma forma ajudaram concretizar este projeto. Agradeço a dedicação e o carinho.

Agradeço à Giseli Ritterbusch, pela amizade e grande ajuda na realização deste trabalho. Foi uma experiência muito boa trabalharmos juntas.

O meu muito obrigada à Neide Simon, pela amizade, pela preocupação e principalmente pela dedicação. Sua ajuda foi fundamental para este trabalho. Obrigada por estar sempre presente e por não deixar eu me desanimar quando as coisas não fluíam bem! Foi muito bom te conhecer, vou levar comigo sua amizade, alegria e determinação.

Tenho que agradecer às “miguinhas” Kelen Ascoli e Aline Viancelli, que me ajudaram demais nesse trabalho. Sem contar o apoio, as risadas e a amizade!

Enfim, agradeço à Merial Saúde Animal - Brasil e à Intervet/Schering-Plough Animal Health - Brasil, pelo apoio financeiro de parte deste projeto.

*“Não importa o tamanho da montanha, ela não pode tapar o sol.”
(Provérbio Chinês)*

*“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte por aquilo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências.”
(Osho)*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 HISTÓRICO.....	19
1.2 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS.....	20
1.3 DISTRIBUIÇÃO.....	23
1.4 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA.....	24
1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LESÕES.....	26
1.6 DIAGNÓSTICO.....	27
1.7 CONTROLE.....	30
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO PROJETO.....	32
3.2 METODOLOGIA.....	33
3.3 SELEÇÃO DOS REBANHOS.....	33
3.4 SELEÇÃO DOS ABATEDOUROS.....	34
3.5 COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	34
3.5.1 Granjas.....	34
3.5.2 Abatedouros.....	34
3.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	35
3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	35
3.8 PADRONIZAÇÃO DE <i>NESTED</i> -PCR COM CONTROLE INTERNO DE AMPLIFICAÇÃO (CIA).....	37
3.9 EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	37

3.10 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EM TECIDOS FETAIS.....	38
3.10.1 Preparação das lâminas e reidratação dos tecidos.....	38
3.10.2 Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase.....	39
3.10.3 Anticorpos primário e secundário.....	40
3.10.4 Revelação e contracoloração.....	40
3.10.5 Leitura e interpretação.....	41
3.11 PADRONIZAÇÃO DE PCR PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO TIPO 4 (PVS4).	41
3.12 CLONAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	42
3.12.1 Ligação do fragmento ao vetor.....	42
3.12.2 Transformação das células competentes.....	43
3.12.3 Clonagem em pCR®2.1-TOPO® 3,9 kb.....	43
3.12.4 Extração do DNA plasmideal recombinante.....	43
3.12.5 Comprovação da eficiência da clonagem.....	44
3.13 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE PVS1 ISOLADAS A PARTIR DE TECIDOS FETAIS.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	46
4.1.1 Granjas.....	46
4.1.2 Abatedouros.....	47
4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	48
4.3 PADRONIZAÇÃO DE <i>NESTED</i> -PCR COM CONTROLE INTERNO DE AMPLIFICAÇÃO (CIA).....	57
4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS POSITIVOS NA <i>NESTED</i> -PCR.....	60
4.5 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EM TECIDOS FETAIS.....	64
4.6 PADRONIZAÇÃO DE PCR PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO TIPO 4 (PVS4)	66
4.7 CLONAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	72
4.8 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE PVS1 ISOLADAS A PARTIR DE TECIDOS FETAIS.....	75

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6. CONCLUSÕES	80
ANEXOS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AEC:** 3-amino-9-ethylcarbazole
- ARS:** *Agricultural Research Service*
- BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool*
- BPV:** *Bovine Parvovirus* (Parvovirus Bovino)
- CIA:** Controle interno de amplificação
- dNTP:** *Deoxyribonucleotides Phosphate* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
- dATP:** Deoxyadenine Triphosphate (Desoxiadenina Trifosfatada)
- DAB:** 3-3'-diaminobenzidine
- dCTP:** *Deoxycytosine Triphosphate* (Desoxicitosina Trifosfatada)
- dGTP:** *Deoxyguanine Triphosphate* (Desoxiguanina Trifosfatada)
- dTTP:** *Deoxythymine Triphosphate* (Desoxitimina Trifosfatada)
- DNA:** *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- ECA:** Endometrite Catarral
- ECR:** Endometrite Crônica
- EDTA:** *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)
- ELISA:** *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- EMV:** *Encephalomyocarditis Virus* (Vírus da Encefalomiocardite)
- EP:** Endometrite Purulenta
- EVS:** *Enteroviruses* (Enterovírus Suíno)
- g:** Gramas
- gLB:** Gel Loading Buffer
- HA:** Hemaglutinação
- HE:** Hematoxilina e Eosina
- HI:** *Haemagglutination Inhibition* (Inibição da Hemaglutinação)
- HBoV:** *Human Bocavirus* (Bocavírus Humano)
- ICTV:** *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
- IHQ:** Imunohistoquímica
- LB:** Meio de crescimento bacteriano "Luria – Bertani"
- mL:** Mililitro
- Nº:** Número

NADC: *National Animal Disease Center* (Centro Nacional de Doença Animal)

NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

ng: Nanograma

nmol: Nanomol

NS: *Non Structural*

ORF: *Open Reading Frame*

pb: Pares de base

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PCV1: *Pocine Circovirus Type 1* (Circovírus suíno tipo 1)

PCV2: *Pocine Circovirus Type 2* (Circovírus suíno tipo 2)

PHoV: *Porcine hokovirus*

pmol: Picomol

PPV2: *Porcine Parvovirus Type 2* (Parvovirus Suíno Tipo 2)

PRRSV: *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (Vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos)

PVS1: Parvovírus Suíno Tipo 1

PVS4: Parvovírus Suíno Tipo 4

rpm: Rotações por minuto

S: *Synthesis*

SOB: *Super Optimal Broth*

SOC: *Super Optimal Broth with Catabolite*

SPF: Specific Pathogens Free

TA: Temperatura ambiente

TBE: *Tris Borate EDTA*

TE: Tris EDTA

TTV1: Torque Teno Vírus Tipo 1

TTV2: Torque Teno Vírus Tipo 2

U: Unidade

UFMT: Universidade Federal do Mato Grosso

UN: Útero Normal

USDA: *United States Department of Agriculture*

V: Volts

VDA: *Aujeszky's Disease* (Vírus da Doença de Aujeszky)

VP: *Viral Protein*

VPL: *Virus Particle Like*

VPSC: *Classical Swine Fever Virus* (Vírus da Peste Suína Clássica)

W: Watts

X: Vezes

%: Porcentagem

°C: Graus Célsius

μL: Microlitro

μm: Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Microscopia eletrônica de vírions de Parvovírus Canino.....	20
Figura 2.	Representação da estrutura do genoma do PVS1.....	21
Figura 3.	Metodologia para colheita de material e desenvolvimento do projeto.....	33
Figura 4.	Amostras de leitões recebidos.....	46
Figura 5.	Necropsia e colheita de órgãos de fetos suínos.....	47
Figura 6.	Órgãos reprodutivos de fêmeas suínas.....	48
Figura 7.	Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PVS1 em órgãos de fetos.....	49
Figura 8.	Frequência dos órgãos positivos dos fetos para PVS1.....	51
Figura 9.	Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PVS1 em líquido estomacal de fetos.....	53
Figura 10.	Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PVS1 em órgão reprodutivo de porcas descartadas.....	55
Figura 11.	Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização de <i>nested</i> -PCR de PVS1 com CIA.....	57
Figura 12.	Eletroforese em gel de agarose 1%. <i>Nested</i> -PCR de tecidos fetais para o PVS1 com CIA.....	58
Figura 13.	Eletroforese em gel de agarose 1%. <i>Nested</i> -PCR de órgãos reprodutivos de porcas descartadas com CIA.....	59
Figura 14.	Cortes histológicos de tecidos do feto 24.....	60
Figura 15.	Cortes histológicos de tecidos uterinos.....	63
Figura 16.	Tecido positivo nos testes de IHQ para detecção do PVS1, corado com AEC.....	65
Figura 17.	Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização do <i>primer</i> “275 pb” do PVS4.....	67
Figura 18.	Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização de PCR para o PVS4 com o par de <i>primer</i> “275 pb”.....	68

Figura 19.	Eletoforese em gel de agarose 1%. PCR de tecidos fetais para o PVS4 com o par de <i>primer</i> “275 pb”.....	69
Figura 20.	Eletoforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização de PCR para o PVS4 com par de <i>primer</i> “440 pb”.....	70
Figura 21.	Eletoforese em gel de agarose 1%. PCR de tecidos fetais para o PVS4 com o par de <i>primer</i> “440”.....	70
Figura 22.	Eletoforese em gel de agarose 1%. PCR de líquido estomacal de fetos para o PVS4 com o par de <i>primer</i> “440 pb”.....	71
Figura 23.	Eletoforese em gel de agarose 1%. PCR de pool de tecidos (ovário e útero) e fluido folicular ovariano de porcas descartadas para o PVS4 com o par de <i>primer</i> “440 pb”.....	72
Figura 24.	Representação do vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®] usado neste estudo.....	73
Figura 25.	Colônias bacterianas crescidas em meio LB.....	73
Figura 26.	Alíquota de meio com crescimento bacteriano para extração de DNA plasmideal de PVS1.....	74
Figura 27.	Eletoforese em gel de agarose 1%. <i>Nested</i> -PCR de DNA plasmideal de clones de amostras positivas de tecidos fetais para PVS1.....	74
Figura 28.	Sequências depositadas no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI, similares à sequência 24 LM do presente estudo.....	76
Figura 29.	Homologia entre a sequência 24 LM e a sequência do parvovírus suíno cepa ZJ (EU790642.1).....	76
Figura 30.	Análise de nucleotídeos entre as regiões sequenciadas das amostras do presente estudo (24 CE; 25 MR; 24 LM; 24 CF – retângulo preto) e as amostras homólogas contidas no GenBank.....	77
Figura 31.	Análise de aminoácidos da proteína NS1 das amostras 24 CE; 25 MR; 24 LM; 24 CF e das amostras homólogas contidas no GenBank.....	77
Figura 32.	Análise filogenética de sequências de amostras de tecidos fetais do presente estudo (24 CF; 24 LM; 24 CE; 25 MR) e de sequências homólogas encontradas no GenBank.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequências e posições de nucleotídeos dos <i>primers</i> da PCR e <i>nested-PCR</i> para PVS1.....	36
Tabela 2.	Distribuição do PVS1 em órgãos de fetos por <i>nested-PCR</i>	50
Tabela 3.	Resultado da <i>nested-PCR</i> de fluido folicular, ovário e útero de seis das 83 porcas descartadas.....	54
Tabela 4.	Estimativa da idade gestacional de fetos suínos conforme seu tamanho.....	61
Tabela 5.	Tamanho de cada leitão positivo na <i>nested-PCR</i> do presente estudo.....	62
Tabela 6.	Resultados do exame histopatológico do ovário e útero das seis fêmeas positivas para o PVS na <i>nested-PCR</i> , de um total de 83 porcas analisadas.....	64

RESUMO

A parvovirose suína é uma doença causadora de falhas reprodutivas e seu agente etiológico é o Parvovírus Suíno Tipo 1 (PVS1). Essa enfermidade, de alta prevalência e distribuição mundial, afeta principalmente porcas nulíparas não imunes. Clinicamente observa-se retorno ao cio, atraso na data de parição, nascimento de leitões inviáveis, fracos, natimortos e, principalmente, mumificados em diferentes tamanhos. Estes problemas reprodutivos acarretam prejuízos econômicos demonstrados pelos baixos índices produtivos. O presente trabalho objetivou implantar e validar técnicas de diagnóstico laboratorial para detecção de PVS1 em infecções naturais em rebanhos suínos que apresentam problemas reprodutivos e realizar caracterização desses isolados. Mais especificamente, objetivou-se diagnosticar, através de *nested-PCR*, e caracterizar, através de análise filogenética, isolados de PVS1 em amostras de tecidos e líquido estomacal de fetos e em aparelho reprodutivo de porcas descartadas. Objetivou-se ainda avaliar histologicamente os tecidos que resultaram positivos na *nested-PCR*; padronizar um controle interno de amplificação (CIA) para a *nested-PCR* de PVS1; padronizar técnica de imunohistoquímica (IHQ) em tecidos fetais e padronizar PCR para Parvovírus Suíno Tipo 4 (PVS4). De 27 rebanhos de suínos, foram colhidos 230 fetos entre natimortos, mumificados e abortados, os quais foram necropsiados para colheita de órgãos e líquido estomacal. O DNA viral foi detectado por *nested-PCR* em órgãos de seis (2,61%) fetos dos 230 analisados, sendo o cerebelo e a medula os órgãos onde o vírus foi detectado com maior frequência (50%). Líquido estomacal de três (2,75%) fetos foram positivos por *nested-PCR*, de 109 analisados. Além disso, amostras de órgãos reprodutivos de 83 porcas descartadas foram colhidas e também fluido folicular ovariano de 71 delas. O material genético do PVS1 foi diagnosticado em órgãos de seis porcas (7,23%) e em fluido folicular de três (4,22%) delas. De 19 órgãos positivos de fetos na *nested-PCR*, quatro tiveram lesão histológica. De seis ovários e seis úteros das seis fêmeas suínas descartadas positivas na *nested-PCR*, cinco ovários estavam ciclando, um estava em anestro e quatro úteros tinham algum grau de endometrite. O CIA desenvolvido para a *nested-PCR* foi amplificado em todas as reações, conforme o esperado. Nos testes de IHQ a presença do vírus foi confirmada em tecido fetal. A PCR para o PVS4 foi padronizada e testada em órgãos fetais e de porcas descartadas. Algumas amostras de porcas foram positivas para este novo parvovírus suíno. Os resultados obtidos no estudo evidenciam baixa frequência do PVS1 nos rebanhos analisados, bem como nos órgãos reprodutivos de porcas descartadas, considerando baixo o envolvimento do PVS1 nas falhas reprodutivas. Além disso, as técnicas padronizadas podem ser incorporadas na rotina de diagnóstico de PVS1 e PVS4.

Palavras chave: Parvovírus Suíno Tipo 1 (PVS1), falhas reprodutivas, fetos, porcas descartadas, *nested-PCR*, Parvovírus Suíno Tipo 4 (PVS4), imunohistoquímica.

ABSTRACT

Porcine parvovirus is a disease that causes reproductive failure and its causative agent is the Porcine Parvovirus Type 1 (PPV1). This disease, with high prevalence and worldwide distribution, affects mostly non-immune nulliparous sows. Clinically, it is observed return to estrus, delayed parturition date, birth of unviable piglets, weak, stillborn and particularly mummified fetuses in different sizes. These reproductive problems lead economic losses demonstrated by low productivity. This study aimed to implement and validate techniques for laboratory diagnosis PPV1 in natural infections in pig herds with reproductive problems and perform the characterization of these isolates. More specifically, it aimed to diagnose through *nested*-PCR, and characterize, through phylogenetic analysis, PPV1 isolates from tissue samples and stomach fluid from fetuses and reproductive tract from culled sows. The objectives were to further evaluate histologically the tissues that were positive by *nested*-PCR; to standardize an internal amplification control (IAC) for PVS1 *nested*-PCR; to standardize immunohistochemistry technique (IHC) in fetal tissues and to standardize PCR for Porcine Parvovirus Type 4 (PPV4). A total of 27 pig herds were studied, where 230 fetuses stillborn, mummified, aborted and unviable piglets were necropsied to harvest organs and stomach fluid. PPPV1 viral DNA was detected by *nested*-PCR in organs of six (2.61%) out of 230 fetuses analyzed, the cerebellum and spinal cord were the organs where the virus was detected more frequently (50%). Stomach fluids of three (2.75%) fetuses were positive by *nested*-PCR, out of 109 examined. In addition, samples of reproductive organs from 83 culled sows were collected also ovarian follicular fluid from 71 of them. The genetic material of PPV1 was diagnosed in six organs from sows (7.23%) and follicular fluid of three (4.22%) of them. Histological lesions were observed in four of 19 PPV1 positive organs of fetuses. Also, six ovaries and six uteri of six culled sows were PPV1 positive by *nested*-PCR. Exams showed that five of those ovaries were cycling, one was in anestrus and four uterus had some degree of endometritis. The IAC developed for *nested*-PCR was amplified in all reactions, as expected. In the IHC test the virus presence was confirmed in fetal tissue. The PCR for PPV4 was standardized and tested in fetal organs and reproductive organs from culled sows. Some samples from sow's reproductive organs were positive for this new porcine parvovirus. The results from this study show a low detection of PPV1 in herds analyzed, as well as from the reproductive organs of culled sows, considering the reduced PPV1 involvement in reproductive failure. Moreover, standardized techniques can be incorporated into routine diagnostic of PPV1 and PPV4.

Keywords: Porcine Parvovirus Type 1 (PPV1), reproductive failure, fetuses, culled sow, *nested*-PCR, Porcine Parvovirus Type 4 (PPV4), immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a suinocultura representa uma importante atividade econômica em vários países e, ano após ano, vem crescendo em ritmo acelerado. Em 2009, o rebanho suíno no Brasil totalizou 33.785.738 milhões de cabeças, das quais 18.260.401 milhões foram oriundas da região Sul do país. Neste mesmo ano, o Estado de Santa Catarina colaborou com a produção de 7.199.541 milhões de suínos, contando com um plantel de 431.962 matrizes suínas, produzindo mais de 3.140.000 milhões de toneladas de carne no ano (ACRISMAT, 2009) Contudo, o Brasil é hoje o quarto maior produtor e também o quarto maior exportador mundial de carne suína.

Com a expansão do setor suinícola e a intensificação da atividade, houve um agravamento nos problemas sanitários dos rebanhos, acarretando em grandes prejuízos econômicos.

As doenças reprodutivas no plantel das granjas de suínos são mundialmente consideradas a maior causa de prejuízo econômico. Existem duas classes principais de causas de doenças reprodutivas em fêmeas suínas. A primeira é representada por agentes infecciosos que causam infecção primária no trato reprodutivo, responsável por 30-40% dos abortamentos, mumificados e natimortos. A segunda categoria inclui toxinas, estresse ambiental e nutricional, e doença sistêmica na porca, sendo responsável pelos outros 60-70% dos problemas reprodutivos (ALMOND et al., 2006). Existe uma longa lista de vírus suínos que poderiam ser incluídos nesta primeira categoria como o Parvovírus Suíno Tipo 1 (PVS1), o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), enterovírus suíno (EVS), o vírus da doença de Aujeszky (VDA), o vírus da peste suína clássica (VPSC), e o vírus da encefalomiocardite (EMV). Além desses agentes, outros patógenos como o *Toxoplasma gondii*, Clamídias, Leptospiras e Brucelas afetam o sistema reprodutivo dos suínos e podem agravar as perdas, através da redução no desempenho as matrizes e aumento dos custos de produção. A manifestação clínica destas doenças é variável, dependendo do agente infeccioso e do estágio da gestação, sendo que podem ocorrer desde infecções subclínicas até a interrupção da gestação.

Neste cenário, o surgimento e dispersão de novos patógenos causadores de falhas reprodutivas fizeram, possivelmente, com que o PVS1 ressurgisse como um importante agente infeccioso causador de perdas embrionárias e fetais na suinocultura. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi verificar a presença de PVS1 em material proveniente de fêmeas suínas com patologias reprodutivas através de metodologias específicas de detecção de DNA e antígeno viral.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 HISTÓRICO

O nome parvovírus foi proposto para nomenclatura de vírus no Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) baseado no latim, onde *parvus* significa pequeno (ANDREWS, 1970). Na classificação taxonômica, os parvovírus compõem a família *Parvoviridae*, que é dividida em duas subfamílias, a *Parvovirinae*, que infecta vertebrados, e a *Densovirinae*, que infecta insetos. A subfamília *Parvovirinae* é composta por cinco gêneros: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. O gênero *Parvovirus* possui 12 espécies, as quais são, parvovírus de camundongos 1, parvovírus de galinha, parvovírus H-1, parvovírus HB, parvovírus Kilham de ratos, parvovírus Lapine, parvovírus RT, parvovírus suíno, vírus Lull, vírus da panleucopenia felina, vírus minúsculo dos camundongos e vírus tumoral X (ICTV, 2009). Conforme o ICTV, todas as espécies deste gênero são antígenicamente diferentes e sua infecção natural é comumente restrita a um único hospedeiro.

Até a década de 60, perdas reprodutivas em criações suínolas comerciais associadas a causas desconhecidas eram mundialmente altas (LAWSON, 1961). Essas perdas reprodutivas eram associadas a fatores ambientais, genéticos, nutricionais e agentes tóxicos foram os maiores responsáveis por perdas reprodutivas em criações suínolas (RASBECH, 1969 e LAWSON, 1961). Ao final dos anos 60, com o avanço das pesquisas em virologia, a correlação de problemas reprodutivos com agentes infecciosos passou a ser bem mais compreendida e descrita (DUNNE, 1970). Entre a lista de infecções virais relacionadas a estes problemas estava o parvovírus suíno tipo 1 (PVS1), que foi descrito pela primeira vez em 1967 (CARTWRIGHT E HUCK, 1967), sendo posteriormente descrito em conceptos suínos em diversos países (BACHMANN, 1969; JOHNSON e COLLINGS, 1997; GENOV et al., 1971; COACKEY e SMITH, 1972; MENGELING, 1972; MORIMOTO et al., 1972; JOHNSON, 1973). Até a presente data, o PVS1 segue sendo relatado em diversos países e correlacionado com problemas reprodutivos em fêmeas suínas (THACKER E GONZALEZ, 1988; MOSCARI et al., 1983; ROBINSON et

al., 1985; FONI e GUALANDI, 1989; NASH, 1990; OBALDIA, 1991; BROLL et al., 1993; RIVERA et al., 1995; ORAVAINEN et al., 2005).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

Os membros da família *Parvoviridae* são vírus pequenos, que variam de tamanho (18 e 26 nm) conforme a espécie do vírus. São esféricos, com capsídeo icosaédrico e desprovidos de envelope (Figura 1). Seu peso molecular é de 5,5 a 6,2 x10⁶ Daltons, com aproximadamente metade do peso dividido em sua massa protéica e outra metade composta por seu genoma (MUZYCZKA e BERNIS, 2001; HORWITZ, et al., 1996), o qual é constituído por uma molécula de DNA linear fita simples (CRAWFORT, et al., 1969).

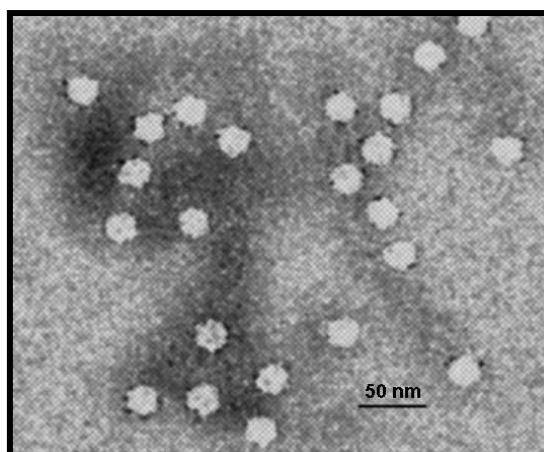


Figura 1. Microscopia eletrônica de vírions de *Parvovirus sp.*
<<http://en.citizendium.org/wiki/Parvovirus>>

Os parvovírus possuem somente quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes sobrepostas no genoma de 4,5 kb a 5,0 kb. Seu genoma apresenta duas grandes fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* - ORF), sendo que a primeira compreende a metade esquerda (5') e codifica para as proteínas não estruturais (*Non Structural* - NS) NS-1, NS-2 e NS-3 (Figura 2). A proteína NS-1 é importante para a replicação e empacotamento viral e, ainda, pode se ligar à proteínas da célula hospedeira, induzir lise celular e apoptose. A proteína NS-2 está associada ao controle da expressão gênica e

também participa da replicação viral. A proteína NS-3 ainda não tem função conhecida, contudo, acredita-se que está igualmente relacionada à replicação viral. A segunda ORF está na metade direita (3') do genoma e codifica para duas proteínas do capsídeo (*Viral Protein - VP*), a VP1 e a VP2 (Figura 2). A VP2 irá formar outra proteína através de clivagem proteolítica, chamada de VP3. As proteínas VP2 e VP3 possuem epítomos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes e pequenas diferenças nestas proteínas podem determinar o tropismo por diferentes tecidos e hospedeiros. Além disso, possuem na superfície estruturas características que conferem funções biológicas, como reconhecimento e ligação a receptores celulares e características imunogênicas (MUZYCZKA e BERNIS, 2001).

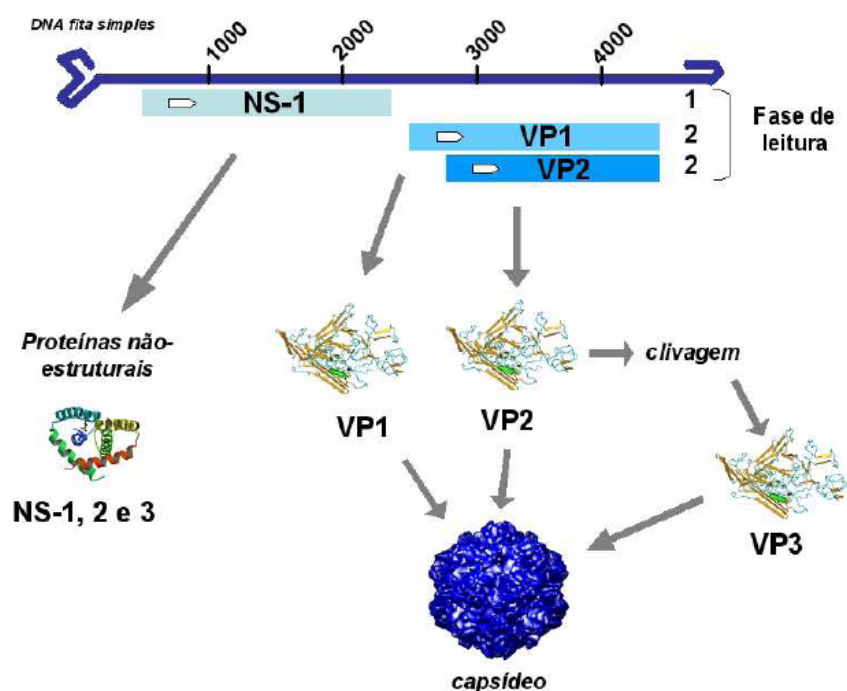


Figura 1. Representação da estrutura do genoma do PVS1. Localização das ORFs que codificam as proteínas NS e VP. A fita de DNA está marcada a cada 1.000 nucleotídeos. Fonte: STRECK, 2009.

O capsídeo dos parvovírus é uma partícula esférica formada a partir do arranjo das proteínas VP, que estão repetidas em mais de 60 cópias formando uma estrutura de simetria icosaédrica (CHAMPMANN e ROSSMANN, 1993).

Uma característica marcante do PVS1 para sua replicação é a dependência de células na fase S (*Synthesis*) do ciclo celular. Nesta fase, as enzimas de replicação celular estão em maior concentração, propiciando a replicação do vírus (MENGELING, 1999).

Em cultivos celulares *in vitro* o vírus se multiplica principalmente em células renais e testiculares de suínos, com indução de efeitos citopáticos como, lise celular, inclusões intranucleares, irregularidades no contorno, arredondamento celular, granulações, vacúolos citoplasmáticos, núcleo picnótico, diminuição da velocidade de divisão e consequente morte celular (CASTRO e HEUSCHELE, 1992; MIRANDA et al., 1992).

Ao relacionar propriedades físico-químicas, observou-se que o PVS1 possui em sua superfície estruturas capazes de ligar-se a receptores específicos presentes nas hemácias de determinadas espécies e produzir o fenômeno da hemaglutinação - HA (BRAILOVSKY, 1966; CUNNINGHAM, 1973; CASTRO e HEUSCHELE, 1992). Outra característica importante do vírus é a resistência a temperaturas ambientais e a variações de pH, resistindo até uma hora a 37°C em uma ampla faixa de pH (3-10). Devido a esta grande estabilidade no ambiente, o PVS1 pode manter a infectividade durante vários meses. Por outro lado, desinfetantes a base de formalina, hipoclorito de sódio ou agentes oxidantes são capazes de diminuir a infectividade ou mesmo inativar o vírus (CASTRO e HEUSCHELE, 1992; BROWN, 1981; FENNER et al., 1992).

Até o presente momento, apenas um sorotipo de PVS1 foi identificado, no entanto existem diferenças de patogenicidade entre isolados de campo como, as cepas patogênicas Kresse e NADL-8 e a pouco patogênica NADL-2 (MENGELING e CUTLIP, 1975; FENNER et al., 1992; BERGERON et al., 1993; JONES et al., 1997).

Em suínos, apenas um gênero de parvovírus é conhecido, entretanto, a identificação de novos parvovírus é possível através de técnicas moleculares. Em 2001, durante uma tentativa de identificar um vírus da hepatite E, foi identificado, acidentalmente, um novo parvovírus em soro de suínos, denominado *Porcine Parvovirus Type 2* (PPV2) (HIJISAKA, 2001). Recentemente, em 2007, outro parvovírus foi identificado, também em soro de suíno, sendo denominado *Porcine hokovirus* (PHoV) (LAU, 2008).

Recentemente, metodologias de amplificação de genomas ao acaso estão sendo usadas para o descobrimento de novos vírus em humanos e em animais. Essas metodologias usam ferramentas poderosas de sequenciamento e vem investigando quadros de doenças virais, principalmente associadas ao circovírus suíno tipo 2 ou PCV2 (*Porcine Circovirus Type 2*) (BLOMSTROM et al., 2009). Em 2005, pesquisadores do *National Animal Disease Center / Agricultural Research Service / United States Department of Agriculture* (NADC / ARS / USDA, Ames, Iowa, Estados Unidos) já haviam identificado e clonado um novo parvovírus suíno, denominado de Parvovírus Suíno Tipo 4 (PVS4) (dados não publicados). Esse agente foi identificado a partir de órgãos de suínos de um rebanho que apresentou um quadro agudo de mortalidade associado ao PCV2. Suínos foram submetidos a necropsia e homogenados de órgãos foram inoculados em leitões gnotobióticos. Destes leitões, foi colhido fluido de lavado bronquial que após análise por *microarray* e sequenciamento foram obtidas duas sequências (1815 bp e 2993 bp) onde foi observado 34% de identidade de aminoácidos com parvovírus bovino (BPV – *Bovine Parvovirus*). A partir daí foram desenhados novos *primers* e a sequência obtida, denominada PVS4, apresentou similaridade com o BPV2 (ORF1 e ORF2) e organização de aminoácidos semelhante (20%) ao bocavírus humano (HBoV – *Human Bocavirus*). Portanto, o PVS4 trata-se de um vírus novo. Das três ORFs identificadas, apenas a ORF3 não é expressa. Não foi possível cultivar o vírus *in vitro* ou *in vivo*. Os estudos estão sendo realizados com clones infecciosos. É interessante investigar a distribuição do PVS4 mundialmente e qual é a patogenia no suíno.

1.3 DISTRIBUIÇÃO

Atualmente, o PVS1 encontra-se amplamente distribuído na população suína mundial, tanto doméstica quanto selvagem, sendo raras as granjas livres do vírus (TAYLOR, 1995; FENATI et al., 2008; ROIC et al., 2005; RUIZ-FONS et al., 2006; CASTRO e HEUSCHELE, 1992). Estudos revelam a presença do vírus na Alemanha (BACHMANN, 1969), na Itália (FONI e GUALANDI, 1989), no Panamá (OBALDIA, 1991); nos Estados Unidos (MENGELING, 1972), na Austrália (COACKEY e SMITH, 1972), no Canadá (RUCKERBAUER et al.,

1978), na Suécia (RIVERA et al., 1995); na Holanda (HUYSMAN, 1992), na República Eslovaca (ELIAS et al., 2004), na Bulgária (GENOV et al., 1971).

No Brasil, estudos sorológicos em suínos provenientes de granjas comerciais indicam que o PVS1 já está estabelecido no país há pelo menos duas décadas, causando problemas reprodutivos (GOUVÊIA et al., 1984; MARTINS et al., 1984; BERSANO et al., 1993). Através da PCR (*Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase), o PVS1 foi detectado em amostras fetais de porcas com distúrbios reprodutivos provenientes dos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás (SOARES et al., 1999; SOARES et al., 2003).

1.4 EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

Um dos fatores que mais contribui para a ampla distribuição do PVS1 é a habilidade do vírus de resistir a condições ambientais adversas fora do hospedeiro. Devido a esta habilidade, as maiores fontes de infecção são as instalações contaminadas (MORAES e COSTA, 2007).

Contudo, a transmissão pode ser feita através de contato oronasal direto ou indireto com animais infectados ou a partir de suas secreções e excreções (ROEHE et al., 2007; MORAES e COSTA, 2007). Os machos suínos podem desempenhar um papel importante na epidemiologia viral, uma vez que o vírus pode ser encontrado no sêmen (THACKER et al., 1984; GUÉRIN e POZZI, 2005; CARTWRIGHT e HUCK, 1976, TAYLOR, 1995; FENNER, et al., 1992; ROEHE et al., 2007). Da mesma maneira, secreções vaginais de porcas infectadas podem levar à contaminação de machos (ROEHE et al., 2007). Como o PVS1 apresenta avidéz por células em multiplicação, os fetos, os envoltórios fetais e membranas de abortos podem ser atingidos, tornando-os também uma fonte de infecção (ROEHE et al., 2007).

Após a penetração do vírus no organismo, há multiplicação viral em tecidos linfóides, na medula óssea e nas criptas intestinais. A viremia ocorre dois a quatro dias após a infecção, persistindo por dois a três dias. A infecção pode ser crônica, com replicação do vírus em células intestinais e excreção nas

fezes por períodos longos, contribuindo para a contaminação ambiental (MORAES e COSTA, 2007; MENGELING, 1999).

Ainda não está claro como o vírus ultrapassa a barreira transplacentária, porém alguns autores sugerem que seja através da passagem de macrófagos maternos contendo o vírus (ROEHE et al., 2007; MORAES e COSTA, 2007). A difusão do vírus é lenta, ocorrendo infecção embrionária ou fetal 10 a 15 dias após a infecção da porca (CASTRO e HEUSCHELE, 1992) e os efeitos estão relacionados com o período de gestação em que a porca adquire a infecção. Na fase embrionária, a infecção geralmente resulta em morte embrionária e reabsorção. Se a maioria dos embriões morrer, a porca pode retornar ao cio (regular ou irregular) mas, se a maioria dos embriões resitir, a gestação poderá ser mantida havendo o nascimento de uma leitegada pequena. Após a ossificação, que inicia após o trigésimo dia de gestação, a infecção do feto pelo PVS1 também ocasiona a morte, mas a reabsorção é impedida pelo esqueleto resultando em mumificação fetal. Por volta dos 70 dias de gestação o feto (com 16 cm ou mais) torna-se imunocompetente, produzindo seus próprios anticorpos, sobrevivendo assim à infecção (ROEHE et al., 2007; MORAES e COSTA, 2007; JOO et al., 1976; MENGELING, 1999).

A presença do vírus em leitões imunocompetentes é pouco evidenciada pelo fato destes já possuírem anticorpos contra o PVS1. Outra possibilidade para esta baixa infectividade seria uma menor atividade de mitose, dificultando a replicação viral (MENGELING, 2000).

Durante a infecção intra-uterina, o vírus é transmitido de feto para feto, atingindo cada um em um determinado tempo, portanto, a infecção de toda a leitegada não ocorre simultaneamente (MORAES e COSTA, 2007). Acredita-se que a morte do embrião ou feto ocorra devido à replicação viral nos tecidos do concepto, embora maiores detalhes sobre a patogenia viral ainda não tenham sido esclarecidos (MENGELING, 2000).

A doença, afeta principalmente leitoas nulíparas não imunes, mas o vírus pode infectar animais de todas as idades. A doença ocorre quando as fêmeas suínas que apresentam baixos títulos de anticorpos adquirem o vírus durante a gestação. Desta forma, porcas múltiparas apresentam menores problemas causados pelo vírus devido ao desenvolvimento de imunidade ativa (MENGELING, 2000; ROEHE et al., 2007), ou seja, a medida que o número de

partos por porca aumenta, também aumenta a chance de contato com amostras de vírus circulantes na granja, tendendo a diminuir os problemas reprodutivos associados ao PVS1 (ROEHE et al., 2007).

1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LESÕES

O maior indício de infecção pelo PVS1 numa granja são as alterações reprodutivas em porcas em gestação, principalmente em fêmeas suínas primíparas. Essas alterações se manifestam como retorno ao cio, atraso na data de parição, porcas se apresentam vazias à época do parto, pseudociese, infertilidade, período prolongado entre partos, nascimento de reduzido número de leitões, presença de fetos mumificados e mortalidade perinatal (JONES et al., 1997; FENNER et al., 1992; MENGELING, 1999, 2000; ROEHE et al., 2007).

Na maioria dos casos, as infecções pós-natais passam despercebidas, porém, ocasionalmente, observa-se febre e moderada panleucopenia (ROEHE et al., 2007). Abortos são raramente associados ao PVS1 (JONES et al., 1997; CASTRO e HEUSCHELE, 1992). Além destas manifestações, a enterite (DUHAMEL et al., 1991) e a dermatite (KRESSE et al., 1985) também têm sido associadas ao PVS1.

A manifestação mais típica da parvovirose suína é a mumificação fetal, ocorrendo na mesma leitegada múmias de diferentes tamanhos, devido à difusão lenta da infecção, de feto para feto. Outra característica comum da doença é a presença, em uma mesma leitegada, de leitões saudáveis, leitões infectados, leitões natimortos e mumificados (ROEHE et al., 2007).

A infecção em machos suínos é assintomática e não afeta a qualidade do sêmen e nem a libido (TAYLOR, 1995; GUÉRIN e POZZI, 2005).

As lesões são características e restritas aos fetos e ao útero. Macroscopicamente, os fetos podem apresentar perdas de condição corporal, congestão, edema, hemorragia, acúmulo de líquido sanguinolento nas cavidades corpóreas e a desidratação dos tecidos levam à mumificação fetal (MENGELING, 1999). Já microscopicamente, observa-se necrose celular em diversos tecidos e infiltração de mononucleares (JOO et al., 1977; MORAES e

COSTA, 2007). Em gestantes, as lesões microscópicas se caracterizam por inflamação, hipertrofia endotelial e infiltração de células mononucleares no endométrio, lâmina própria e miométrio (MORAES e COSTA, 2007; LENGHAUS et al., 1978).

1.6 DIAGNÓSTICO

O PVS1 deve ser investigado quando forem observados os sinais clínicos citados anteriormente, dando atenção especial à mumificação fetal afetando principalmente fêmeas suínas nulíparas (ROEHE, 2007; MORAES e COSTA, 2007).

A confirmação clínica é feita através de várias técnicas laboratoriais. Dentre elas, estão as técnicas sorológicas, que são frequentemente utilizadas por ser o isolamento do PVS1 difícil e algumas vezes inconclusivo. Além disso, as infecções com vírus de campo induzem altos títulos de anticorpos e resposta prolongada, aumentando a eficácia dos métodos sorológicos (ROEHE et al., 2007). A sorologia é útil na determinação do estado imunológico do animal e, o teste de cada indivíduo do rebanho quando analisados em conjunto, possibilita avaliar o estado imunitário de um rebanho, onde a observação de diferentes níveis de anticorpos no plantel é considerada indicativa de infecção em evolução (ROEHE et al., 2007, MAYR e GUERREIRO, 1972; MENGELING et al., 1999). O teste de hemaglutinação (HA) é realizado para detectar o antígeno, ou seja, partículas virais infectantes em materiais como soro de fêmeas suínas ou fluidos e anexos fetais. Atualmente, a técnica de inibição da hemaglutinação (HI - *Haemagglutination Inhibition*) (BRAILOVSK, 1966) segue sendo utilizada como método padrão para a detecção de anticorpos em laboratórios de referência no Brasil. As vantagens da HI são o baixo custo e a possibilidade de se titular anticorpos (MORAES e COSTA, 2007). Outro teste sorológico que possui eficácia equivalente ao HI e vem sendo utilizado é o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (HOHDATSU et al., 1988; WESTENBRINK et al., 1989). Algumas vantagens do ELISA são, leitura automatizada, alta reprodutibilidade e possibilidade de utilização de kits. Outros métodos sorológicos também foram

adaptados para o PVS1 como, micro-aglutinação em tubo (JOO et al., 1975), imunodifusão em gel de agar (TOO et al., 1983), imunofluorescência (RIVERA et al., 1986) e aglutinação rápida em placa (LU et al., 2006). No entanto, nenhuma destas técnicas obteve a praticidade ou a confiança do HI ou mesmo do ELISA para o diagnóstico do PVS1.

Geralmente, os testes sorológicos são recomendados quando tecidos de fetos mumificados não são disponíveis. Desta forma, o material a ser remetido para o laboratório deve incluir amostras refrigeradas de soro pareado das fêmeas suínas, soro dos fetos abortados ou fluidos corporais caso não haja disponibilidade de sangue e soro dos leitões natimortos antes da ingestão do colostro, para pesquisa de anticorpos. Na espécie suína os anticorpos maternos não atravessam a barreira transplacentária e a presença de anticorpos no soro de fetos com mais de 16 cm (idade gestacional de aproximadamente 70 dias) é devido a sua imunocompetência, tornando-o capaz de responder à infecção pelo PVS1 através da produção de anticorpos (CASTRO e REUSCHELE, 1992; MORAES e COSTA, 2007). Contudo, para a pesquisa do agente viral recomenda-se enviar ao laboratório fetos mumificados menores de 16 cm, pois estes ainda não tornaram-se imunocompetentes.

O isolamento viral pode ser utilizado para diagnóstico devido ao efeito citopático que o PVS1 causa em determinadas células, como descritos no item 1.2, porém a técnica não é muito eficaz devido à nula ou baixa infecciosidade do vírus a partir de tecidos provenientes de aborto ou fetos mumificados (ROEHE et al., 2007). Geralmente, quando esses tecidos chegam ao laboratório, encontram-se autolisados, o que dificulta a replicação viral. Além disso, é uma técnica demorada por, muitas vezes, necessitar de sucessivas passagens até causar o efeito citopático.

Uma técnica laboratorial para detecção de antígenos do PVS1, citada na literatura, é a imunohistoquímica (IHQ) (KIM e CHAE, 2004). Estudos concluíram que o uso do formaldeído, para fixação dos tecidos, proporciona boa preservação da morfologia celular, no entanto, causa alterações estruturais importantes nos antígenos teciduais, dificultando ou impedindo o reconhecimento pelos anticorpos na técnica de IHQ (FOX et al., 1985; MACINTYRE, 2000; RAMOS-VARA e BEISSENHERZ, 2000). Além disso, os tecidos fetais mumificados comumente encontram-se autolisados, o que

também compromete os resultados. No entanto, muitas das alterações produzidas pela fixação com formaldeído podem ser revertidas usando diversos métodos de recuperação antigênica (SHI et., 1997), tornando possível, muitas vezes, a realização da técnica.

Devido aos avanços da biologia molecular, a detecção direta do PVS1 pode ser realizada por diferentes métodos baseados na detecção de sequências virais específicas. A hibridização de ácidos nucleicos foi o primeiro método desenvolvido com esta tecnologia (ORAVEERAKUL et al., 1990), apresentando boa sensibilidade e especificidade (WALDVOGEL et al., 1995). Entretanto, a necessidade de preparo de sondas específicas para o uso possa ter sido a causa da baixa difusão deste método. Por sua vez, com a PCR (*Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase) foi possível unir sensibilidade, especificidade e praticidade. Foram descritas duas técnicas de PCR, uma por um grupo americano (MOLITOR et al., 1991) e outra por um grupo brasileiro (SOARES et al., 1999), as quais apresentam alvos genômicos distintos. A técnica de PCR americana é projetada para amplificar a região correspondente às proteínas VP, enquanto a técnica brasileira é para amplificar a região codificante das proteínas não estruturais (NS). Ambas as técnicas são sensíveis para o diagnóstico do PVS1, sendo a região codificante das proteínas NS bastante conservada do PVS1. Para este método diagnóstico recomenda-se enviar ao laboratório órgãos refrigerados de fetos mumificados ou natimortos, bem como sangue ou fluido corporal. Nos trabalhos de SOARES et al. (1999), MALDONADO et al. (2005) e BACCARO et al. (1999) os órgãos de eleição foram pulmão, baço, fígado e rim. A PCR em tempo real é descrita atualmente como um método eficiente de diagnóstico para o PVS1. Além da sensibilidade e especificidade da PCR convencional, a PCR em tempo real possui como vantagens a capacidade de quantificação e leitura automatizada, fazendo dela uma técnica rápida e eficaz (WILHELM et al., 2006; MCKILLEN et al., 2007).

Além dos sinais clínicos e exames laboratoriais é importante realizar o diagnóstico diferencial de outras doenças que também causam problemas reprodutivos como, leptospirose, brucelose, doença de Aujeszky, síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos, entre outras. É importante lembrar que, na infecção pelo PVS1 não há manifestações clínicas de doença em qualquer

categoria animal e que abortos são raros. (MORAES e COSTA, 2007; ROEHE et al., 2007).

1.7 CONTROLE

Até o presente momento não há um tratamento específico para PVS1. Com isso, medidas gerais de manejo devem ser adotadas a fim de promover um bom estado sanitário para o rebanho (MENGELING, 1999, ROEHE et al., 2007). Por ser uma doença endêmica, a vacinação é a principal medida adotada, pois objetiva estimular a imunidade do plantel, principalmente das nulíparas, evitando a infecção de embriões e fetos (ROEHE et al., 2007).

Durante a década de 70, as primeiras vacinas desenvolvidas foram preparadas com o vírus inativado (SUZUKI e FUJIZAKI, 1976; JOO e JOHNSON, 1977; MENGELING et al., 1979). Nos anos seguintes, a cepa de baixa patogenicidade, a NADL-2, foi amplamente utilizada para a elaboração da vacina inativada (ZEEUW et al., 2007).

Vários testes experimentais já foram realizados para a obtenção de outros tipos de vacinas para a parvovirose suína. Dentre elas, a expressão em *Lactobacillus casei* carreadores de proteínas do capsídeo do PVS1 (YIGANG e YIJING, 2008), a atenuação viral (FUJISAKI et al., 1982; IZUMIDA et al., 1986), o uso do vírus da doença de Aujeszky como vetor para expressão do PVS1 (WU et al., 2006) e o uso de partículas recombinantes do tipo *virus-like particles* (VLP) (MATINEZ et al., 1992; MARANGA et al., 2002; PAN et al., 2008). Apesar destes estudos terem apresentado resultados promissores, a vacina inativada ainda é amplamente utilizada devido a sua grande margem de segurança.

No Brasil, são comercializadas apenas vacinas inativadas, as quais podem ser monovalentes ou combinadas com antígenos de outros vírus e/ou bactérias, as quais são denominadas polivalentes (MORAES e COSTA, 2007).

Os programas de vacinação utilizados nas granjas variam de acordo com a categoria do animal (leitoas de reposição, porcas em produção e reprodutores machos suínos) (ROEHE et al., 2007).

Antes do advento da vacinação, utilizava-se o método de *feedback* contra a parvovirose suína. O objetivo deste método era estabelecer uma infecção natural das leitoas geralmente um mês antes da cobertura. A imunização era estimulada através do contato direto com porcas do plantel ou da transferência das leitoas para as instalações previamente utilizadas pelas porcas. Outra maneira de estimular a imunidade era oferecer fezes, restos de placentas e fetos mumificados às leitoas antes da cobertura. O *feedback* deixou de ser utilizado por apresentar um alto risco sanitário, pois pode-se disseminar no rebanho outras doenças de impacto econômico (ROEHE et al., 2007).

Contudo, a adoção de um bom programa de vacinação é considerada uma forma eficaz de controle da parvovirose suína (MENGELING, 1999; ROEHE et al., 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Implantar e validar técnicas de diagnóstico laboratorial para detecção de ácidos nucleicos e antígenos de parvovírus suíno em infecções naturais em rebanhos suínos que apresentam problemas reprodutivos e realizar caracterização desses isolados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diagnosticar o PVS1, através da *nested-PCR*, em tecidos e líquido estomacal de fetos;
- Diagnosticar o PVS1, através da *nested-PCR*, em ovário, útero e fluido folicular de porcas descartadas;
- Padronizar *nested-PCR* com controle interno de amplificação;
- Avaliação histopatológica dos tecidos positivos na *nested-PCR*;

- Padronizar a técnica de imunohistoquímica para PVS1 em tecidos fetais;
- Padronizar PCR para o Parvovírus Suíno Tipo 4 (PVS4).
- Clonagem, sequenciamento e análise filogenética de fragmentos amplificados de PVS1 isolados a partir de amostras obtidas durante o estudo;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DO PROJETO

O projeto foi desenvolvido na cidade de Concórdia/SC no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Suínos e Aves), especificamente no Complexo de Sanidade e Genética Animal, laboratórios de Virologia e Histopatologia.

3.2 METODOLOGIA

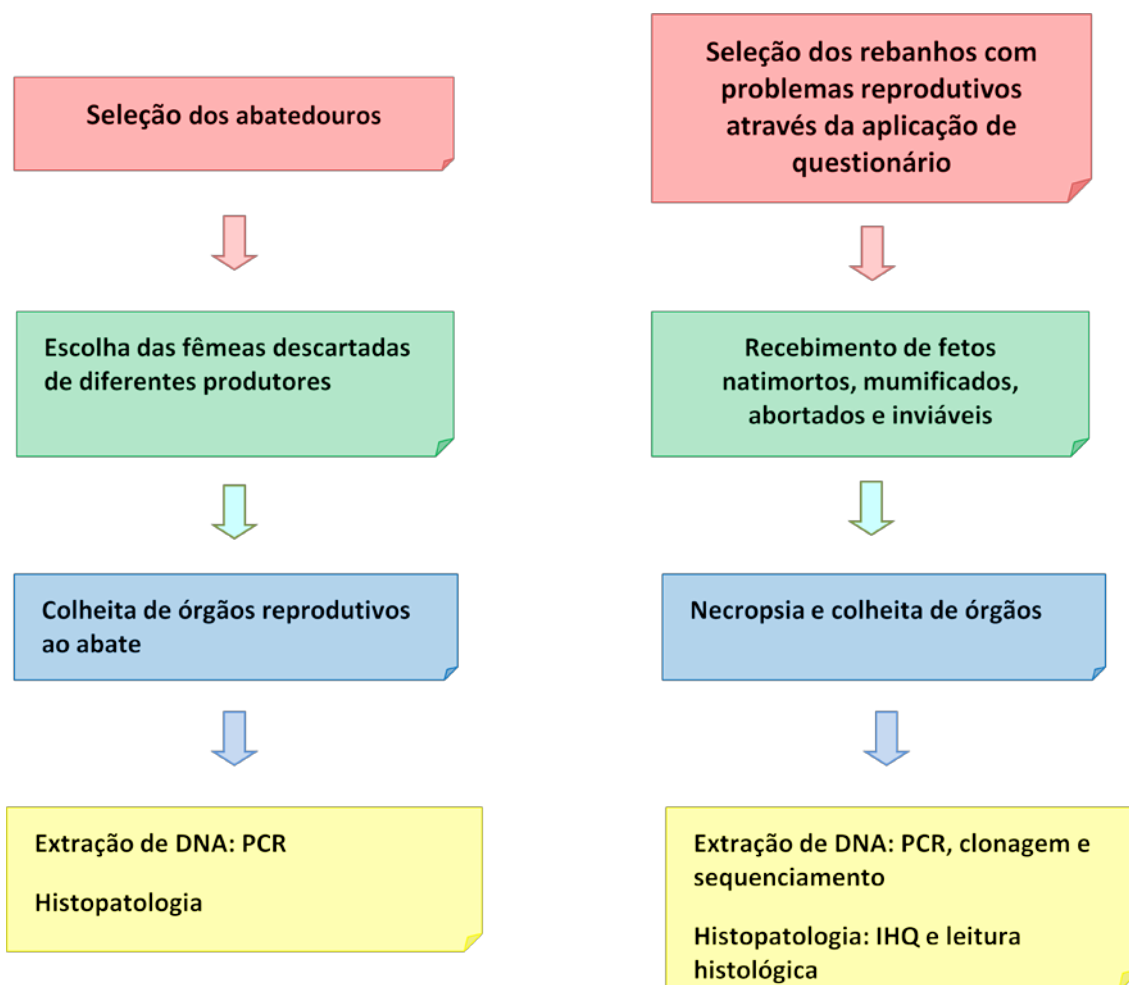


Figura 2. Metodologia para colheita de material e desenvolvimento do projeto.

3.3 SELEÇÃO DOS REBANHOS

Primeiramente, foram contatados vários produtores de suínos dos Estados de Santa Catarina e Paraná para participarem do projeto cujo objetivo foi diagnosticar patógenos causadores de falhas reprodutivas em matrizes suínas. Os rebanhos foram selecionados através da aplicação de um questionário (ANEXO), com o qual era feito o levantamento das variáveis reprodutivas da granja. O rebanho, para ser incluído no projeto, deveria apresentar pelo menos uma das variáveis acima ou abaixo dos níveis de interferência. Foram selecionados 27 rebanhos e as amostras colhidas de julho de 2008 a julho de 2009.

3.4 SELEÇÃO DOS ABATEDOUROS

Foram escolhidos ao acaso, quatro frigoríficos de Concórdia/SC e região para a colheita de amostras de órgãos reprodutivos de porcas descartadas desconsiderando a causa do descarte.

3.5 COLHEITA DAS AMOSTRAS

3.5.1 Granjas

Em cada um dos 27 rebanhos, foram escolhidas ao acaso cinco porcas que haviam abortado ou parido leitões mortos, mumificados ou inviáveis para a produção. De cada porca (leitegada) eram colhidos dois leitões. Leitões natimortos, mumificados e fetos abortados eram enviados ao laboratório sob refrigeração para necropsia, e os leitões inviáveis eram enviados vivos e abatidos através de eletrochoque para seguidamente serem necropsiados. No total foram colhidos 230 leitões, os quais foram numerados e identificados de 1 a 230. Os leitões foram necropsiados e um fragmento de cada órgão (cérebro, cerebelo, medula, linfonodo submandibular, timo, coração, pulmão, fígado, baço, rim, linfonodo mesentérico e linfonodo inguinal) foi colhido, armazenado em placa estéril e acondicionado a -70°C , para futura extração de DNA. Da mesma forma, um fragmento de cada órgão foi colhido e armazenado em formalina 10% tamponada (ANEXO) para exame histopatológico. O líquido estomacal de 109 fetos foi colhido através de aspiração com seringa descartável estéril, armazenado em microtubo e estocado a -70°C .

3.5.2 Abatedouros

Nos quatro abatedouros selecionados, foram escolhidas ao acaso cinco granjas e de cada uma, três a cinco porcas, desconsiderando a causa do descarte. No total foram 83 porcas selecionadas. De cada porca, foram colhidos um fragmento de cada corno uterino da porção média e os dois ovários. Um fragmento de útero foi armazenado a -70°C e o outro fixado em

formalina 10% tamponada. Da mesma forma procedeu-se com os ovários. Fluidos foliculares foram obtidos de ovários de 71 porcas, totalizando 71 amostras de fluidos. A colheita foi realizada através de aspiração com seringas e agulhas descartáveis estéreis, e armazenados a -70°C.

3.6 EXTRAÇÃO DE DNA

Os órgãos e líquido estomacal dos fetos, os ovários, úteros e fluido folicular das porcas descartadas foram submetidos à extração de DNA pelo método da Proteinase K e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (SAMBROOK et al, 1989). Para líquido estomacal de fetos e fluido folicular de porcas, aliquotou-se 250 µL da amostra. Os tecidos fetais e das porcas foram macerados (aproximadamente 1 g da amostra) até ficar homogêneo. A digestão de todas estas amostras (órgãos, líquido estomacal dos fetos, ovários, úteros e fluido folicular das porcas) foi feita com 1 mL de tampão de lise 2 X (ANEXO) e 20 µL de Proteinase K (Invitrogen™ - ANEXO). A extração foi feita com fenol (Invitrogen™), clorofórmio (Sigma®) e álcool isoamílico (Vetec®), nas proporções 25:24:1. Em seguida, o DNA foi precipitado com acetato de sódio (ANEXO) a um volume final de 10% da solução e 1 mL de etanol absoluto gelado (-20°C), permanecendo em freezer a -70°C por quatro horas ou a -20°C por 16 horas, para precipitar o DNA. Após, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, realizou-se lavagem com etanol 70% gelado (-20°C), o DNA precipitado foi ressuspensão com TE conforme o tamanho do pellet (30 µL para *pellet* "invisível", 50 µL para *pellet* pequeno e 100 µL para *pellet* grande) e armazenado a -70°C.

3.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para amplificação de um segmento do genoma do PVS1, foram utilizadas sequências de *primers* específicas para o gene que codifica a proteína não estrutural NS1 do PVS1, uma região bastante conservada entre os isolados do vírus. Os *primers* para as reações de PCR e *nested-PCR*, que

permitiram a amplificação de produtos de 469 e 225 pares de bases, respectivamente, foram descritos por SOUCIE et al em 2000, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Sequências e posições de nucleotídeos dos *primers* da PCR e *nested-PCR* para PVS1.

<i>Primers</i>	Sequências	Posição dos nucleotídeos
<i>Outer-forward</i>	5'- AAC TTT CCA TTT AAT GAC TG -3'	1570 – 1589
<i>Outer-reverse</i>	5'- TGA GAG TCT GTT GGT GTA -3'	2021 – 2038
<i>Nested-forward</i>	5'- CAG GAA ACT TCT CTA ACC -3'	1622 – 1640
<i>Nested-reverse</i>	5'- GCA GTT TTC TGG TTA GGT -3'	1829 – 1846

Fonte: SOUCIE, et al, 2000.

Para a preparação das reações foi utilizado um kit comercial (Invitrogen[™] - *Taq* DNA Polimerase, 10 X PCR *Buffer*, Magnésio 50 mM). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL por amostra, sendo 109,4 ng de DNA (2,5 µL) da amostra a ser testada e 22,5 µL de uma mistura contendo 16,1 µL de água ultrapura estéril, 2,5 µL de 10X *Buffer*, 0,75 µL de Magnésio 50 mM, 2 µL de dNTP (Promega[®] - contendo dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM e dTTP 100 mM), 0,5 µL de cada *primer outer-forward* e *outer-reverse* (10 pmol) e 0,15 µL da enzima *Taq* polimerase (5 U/µL). Para a *nested-PCR* foi feita a mesma reação anterior, porém, substituindo o DNA por 2,5 µL do produto amplificado diluído a 1:100.

Para controle negativo das reações, utilizou-se 2,5µL de água ultrapura. Já para o controle positivo, foi utilizado 109,4 ng de um DNA sabidamente positivo para o PVS1.

A amplificação das reações foi realizada em termociclador (MJ Research, Inc[®]) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento dos primers a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 90 segundos, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, em cuba horizontal da seguinte maneira: 16 µL da reação de amplificação junto com 1,5 µL de tampão de corrida gLB (ANEXO) foram

aplicados em gel de agarose 1% (Invitrogen® - ANEXO) corado com 5 µL de Brometo de Etídio (5 µg/mL - SIGMA®). Cinco µL de um marcador de peso molecular de 100 pares de bases foram aplicados no gel, a fim de comparar com o peso molecular do fragmento amplificado. Para a eletroforese, cobriu-se o gel com TBE a 0,5 X (ANEXO) ajustando a fonte a 100 V por aproximadamente 50 minutos. A visualização do produto amplificado foi realizada por transiluminação em luz ultravioleta.

3.8 PADRONIZAÇÃO DE *nested*-PCR COM CONTROLE INTERNO DE AMPLIFICAÇÃO (CIA)

Um controle interno de amplificação (CIA) de 100 pb foi desenhado, pela Invitrogen™, para a *nested*-PCR dos tecidos fetais e dos órgãos reprodutivos de porcas a partir da região amplificada pelos *primers nested-forward* e *nested-reverse* do PVS1. O CIA liofilizado (34,4 nM) foi ressuspenso em 68,8 µL de TE, apresentando uma concentração final de 500 pmol. Desta concentração fez-se cinco diluições (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000 e 1:100.000). Aplicou-se, em gel de agarose 1%, 5 µL do CIA a 500 pmol e 5 µL de cada diluição (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000 e 1:100.000), a fim de verificar qual diluição se apresentaria menos intensa mas possível de visualização. Da diluição 1:10.000, aplicou-se 1 µL, 5 µL e 10 µL, em gel de agarose 1%, e também o produto da *nested*-PCR feita com 1 µL, 5 µL e 10 µL, desta diluição, objetivando-se verificar com qual quantidade aplicada da diluição não seria mais visualizada em gel e qual quantidade da diluição ainda seria visualizada quando na reação de *nested*-PCR.

3.9 EXAME HISTOPATOLÓGICO

Todos os tecidos fetais e das porcas de descarte, fixados em formalina 10% tamponada, foram processados em equipamento histotécnico automático, seguindo as etapas de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo a quatro µm e corados pela técnica de HE (Hematoxilina Eosina) (LUNA, 1968) para serem visualizados em

microscópio óptico. Foram anotados os tipos de lesões encontradas nos tecidos fetais. O fragmento uterino das porcas foi classificado de acordo com a gravidade e tipo de lesões encontradas, em: normal - UN (sem alterações), endometrite catarral - ECA (discreta infiltração inflamatória mista ou com predomínio de mononucleares no endométrio e/ou no lúmen das glândulas/órgão), endometrite purulenta - EP (acentuada infiltração e exsudação de neutrófilos no endométrio e/ou no lúmen das glândulas/órgão) e endometrite crônica - ECR (infiltração inflamatória mononuclear e fibroplasia ao redor de glândulas endometriais e/ou na lâmina própria/epitélio). Já nos ovários, foram avaliados os indicativos quanto ao período do ciclo estral das porcas, classificando-os em ciclando, em anestro ou em ovário cístico, conforme a presença de folículos em crescimento, cistos foliculares ou corpos lúteos após a ovulação.

3.10 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EM TECIDOS FETAIS

Foram testadas amostras de tecidos fetais que resultaram positivas para PVS1 nos testes por *nested*-PCR e também amostras de tecidos cedidas gentilmente por Caroline Argenta Pescador, do Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT. Como controle positivo da técnica utilizou-se cortes de linfonodos de animal positivo para PCV2 e cortes de pulmão de animal positivo para *Mycoplasma*. Para controle negativo foram utilizados cortes de tecidos de animais SPF (*Specific Pathogen Free* – livre de patógenos específicos), provenientes da Embrapa Suínos e Aves.

3.10.1 Preparação das lâminas e reidratação dos tecidos

As lâminas de vidro foram submersas em solução de poly-L-lisina (Sigma Aldrich®) 10% em água destilada por 5 minutos, secas em estufa a 60°C para receberem os cortes de tecidos seccionados em 3-4 µm de espessura. Em seguida, foram colocadas em estufa a 60°C por 20 minutos, desparafinadas com três banhos de xilol por 10 minutos cada, reidratadas em

solução de álcool decrescente de 100%, 96%, 80% e 70%, por 5 minutos em cada concentração, e lavadas por cinco minutos em solução salina tamponada - PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) (Anexo).

3.10.2 Recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase

Para a recuperação dos antígenos virais no material fixado foram avaliados os seguintes reagentes: pepsina, tripsina e proteinase K.

As amostras de tecidos fetais foram tratadas com os reagentes citados acima diluídos em PBS nas seguintes concentrações: 10% tripsina, 0,04% pepsina ou proteinase K (20 mg/mL). Os tecidos foram incubados por 10 minutos em câmara úmida colocada em estufa a 37°C e posteriormente lavadas com PBS por 5 minutos.

Outra tentativa com pepsina foi utilizando-a a 0,04% em PBS por 10 minutos em câmara úmida em estufa a 37°C e posteriormente lavadas com PBS por 5 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram colocadas em tampão citrato (ANEXO) por duas vezes, durante cinco minutos cada, em forno de microwaves doméstico a 700 w de potência. Em seguida, foram lavadas com PBS por cinco minutos.

A proteinase K também foi testada nas concentrações 0,05% e 0,1%, em PBS, por 10 minutos em câmara úmida, em estufa a 37°C e posteriormente lavadas com PBS por 5 minutos.

Testou-se a recuperação antigênica com três recuperadores, cada um com seu tempo de incubação e entre eles foram feitas lavagens por cinco minutos em PBS: proteinase K 0,1%, tripsina 10% e pepsina 0,04% em PBS com 15, 10 e 10 minutos de incubação, respectivamente, em câmara úmida, em estufa a 37°C, seguindo lavagem em PBS por cinco minutos entre cada recuperação.

Outras duas tentativas foram as seguintes, ambas com 15, 10 e 10 minutos de incubação, respectivamente, em câmara úmida, em estufa a 37°C, seguindo lavagem em PBS por cinco minutos entre cada recuperação: (1) Proteinase K 0,05%, tripsina 10% e pepsina 0,04%; (2) Proteinase K 0,05%, pepsina 0,04% e tripsina 10%.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da imersão das lâminas por cinco minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (ANEXO), seguido de lavagem das mesmas em PBS por cinco minutos e secagem das bordas dos tecidos para a aplicação do anticorpo primário.

3.10.3 Anticorpos primário e secundário

O anticorpo primário utilizado foi anticorpo monoclonal anti-PVS1 (IgG1 - NADL-8, VMRD[®]) nas diluições 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600. Foram aplicados sobre cada corte de tecido, cobrindo-o completamente. As lâminas foram incubadas durante duas horas em câmara úmida em estufa a temperatura de 37°C e em seguida lavadas em PBS por 5 minutos.

O anticorpo monoclonal na diluição 1:200 também foi testado com incubação durante 14-16 horas (*overnight*) em câmara úmida na temperatura de 4°C.

Como anticorpo secundário utilizou-se o anticorpo biotinizado, fornecido pelo kit "LSAB System HRP" (Dako Cytomation[®]), o qual foi aplicado sobre os tecidos, que foram incubados durante 30 minutos em câmara úmida em estufa a 37°C, seguido por lavagem em PBS por cinco minutos. Após, as lâminas foram novamente incubadas durante 30 minutos em câmara úmida a 37°C com o conjugado "Streptavidin – HRP" cobrindo cada tecido. Fez-se nova lavagem em PBS e as bordas dos tecidos foram secadas com papel absorvente para aplicação do revelador.

3.10.4 Revelação e contracoloração

Dois protocolos foram testados. Um dos reveladores utilizados foi o AEC (3-amino-9-dietilcarbazol), da seguinte maneira: a solução estoque (ANEXO), a solução trabalho (ANEXO) e a solução de peróxido de hidrogênio a 3% foram preparadas imediatamente antes do uso. Os tecidos foram cobertos com a solução e a reação foi monitorada em microscópio óptico. Após, os cortes foram lavados em água destilada por cinco minutos e, em seguida,

contracolorados com hematoxilina de Mayer (ANEXO) por dois minutos e novamente lavados em água destilada durante cinco minutos. As lâminas foram montadas com solução gelatina-glicerol.

O outro revelador utilizado foi o substrato Diaminobenzidina (DAB Kit LSAB – Dako[®]), o qual também foi preparado imediatamente antes do uso conforme instruções do fabricante (ANEXO). O substrato foi aplicado de modo a cobrir toda a extensão dos tecidos e em seguida as lâminas foram monitoradas em microscópio óptico para observar o tempo de ocorrência da reação. Para paralisar a reação, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos, seguida pela contracoloração em hematoxilina de Harris (ANEXO) por um minuto e nova lavagem em água destilada por 5 minutos. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas por passagem rápida em soluções crescentes de álcool (80%, 90% e 100%) e montadas com lamínulas e Entellan (Merck[®]).

3.10.5 Leitura e interpretação

A leitura do teste foi realizada em microscópio óptico, observando-se presença e distribuição do antígeno viral nos tecidos. Para melhor interpretação dos resultados, estabeleceram-se os seguintes parâmetros: reação negativa para ausência de marcação no tecido; reação positiva fraca para marcação em menos de 25% do tecido; reação positiva moderada para marcação entre 25 e 50% do tecido e reação positiva forte para marcação acima de 50% do tecido.

3.11 PADRONIZAÇÃO DE PCR PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO TIPO 4 (PVS4).

Dois pares de *primers* foram elaborados (Invitrogen[™]) para serem utilizados nos testes de padronização da amplificação de dois segmentos do genoma do PVS4 (BLOMSTRÖM, A.L, 2009). Os *primers* para as reações de PCR são os seguintes: *primer forward* - 5' TTCGGCAGGCGGAGGCTTTGTTTA 3' (Posição: 1069-1092) e *primer reverse* - 5' GCTCTTCCAGGCCCGTGTTTATT 3' (Posição: 1343-1320), que

amplificam 275 pb e *primer forward* - 5' TATGTGGGCTGGGCAAGGAATGTC 3' (Posição: 2851-2874) e *primer reverse* - 5' GTTGCGGAATGCTATCAGGCTCTT 3' (Posição: 3290-3267), amplificando 440 pares de base.

Para a padronização da PCR foi utilizado o kit comercial Invitrogen™ (*Taq* DNA Polimerase, 10X PCR *Buffer*, Magnésio 50 mM), variando quantidades de magnésio 50 mM (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 µL), dNTP 100mM (0,5 e 1,0 µL), primers 10 pmol (0,5 e 1,0 µL) e temperatura de anelamento dos *primers* (55°; 57°; 60°; 61°; 62°; 63°; 64°; 65° e 68°C). Como controle positivo fez-se uso de 109,4 ng (1,0; 1,5 e 2,0 µL) de DNA positivo de órgãos reprodutivos de porcas e, como controle negativo água ultrapura.

3.12 CLONAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Três amostras de DNA de órgãos de fetos (positivos para o PVS1 na *nested-PCR* foram submetidas a clonagem com o Kit TOPO TA cloning® (Invitrogen™). Primeiramente, o produto da *nested-PCR* das três amostras de DNA foi purificado utilizando-se o Kit Macherey-Nagel NucleoSpin Extract II, seguindo as recomendações do fabricante.

3.12.1 Ligação do fragmento ao vetor

Para cada amostra de DNA purificado (inserto) foram feitas duas ligações, uma utilizando 0,5 µL de DNA e 3,5 µL de água ultrapura, e outra 1,0 µL de DNA e 3,0 µL de água ultrapura. Para cada ligação também se utilizou 1,0 µL do vetor pCR®2.1-TOPO® 3,9 kb e 1,0 µL de *Salt Solution*, totalizando 6,0 µL cada ligação. As ligações foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente.

3.12.2 Transformação das células competentes

As cepas de *Escherichia coli* DH5 α competentes foram transformadas para as clonagens com pCR[®]2.1-TOPO[®] 3,9 kb da seguinte forma: foram adicionados a 100 μ L de células competentes 2 μ L das ligações, que foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos. Após, foi realizado o choque térmico em banho-maria a 42°C durante 30 segundos, seguindo de nova incubação em banho de gelo durante dois minutos. Posteriormente, foram adicionados 250 μ L de meio SOC (ANEXO) às células transformantes, incubando-as sob agitação a 200 rpm a 37°C durante uma hora e 30 minutos.

3.12.3 Clonagem em pCR[®]2.1-TOPO[®] 3,9 kb

Em capela de fluxo laminar, preparou-se placas com meio LB (ANEXO) com ampicilina (50 μ g/mL – 1 μ L/1mL) e algumas placas sem ampicilina, para serem utilizadas como controle (apenas com DH5 α). Próximo a chama do bico de Bunsen, foram preparadas duas placas para cada transformação, colocando 100 μ L de cada transformação inserto/vetor em cada placa. As placas foram colocadas em estufa, a 37°C por 18 a 21 horas. Após esse período, verificou-se nas placas o crescimento de colônias bacterianas. Em tubos de 15 mL, colocou-se 3 mL de meio LB líquido e 3 μ L de ampicilina (50 μ g/mL). Com uma alça de sementeira, algumas colônias foram selecionadas e semeadas em meio LB líquido com ampicilina. Os tubos foram incubados sob agitação a 200 rpm a 37°C durante 18 a 21 horas. Tubos com meio turvo são um bom indicativo de amostras positivas (bactérias transformadas inserto/vetor).

3.12.4 Extração do DNA plasmideal recombinante

Para extração do DNA plasmideal, aliquotou-se 1,5 mL do crescimento bacteriano, submetendo-o a centrifugação a 8000 rpm a 4°C por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão com 100 μ L de Solução I gelada (ANEXO). Adicionou-se 200 μ L de Solução II (ANEXO), invertendo gentilmente o microtubo cinco a seis vezes para misturar o conteúdo. No

microtubo em gelo, adicionou-se 150 µL de Solução III gelada (ANEXO), também invertendo gentilmente o microtubo. Após incubar a amostra em gelo por cinco minutos, centrifugou-a a 12.500 rpm a 4°C por 10 minutos. Em capela de exaustão, o DNA plasmideal foi extraído com 220µL de fenol e 220µL de clorofórmio, centrifugando em seguida a 12.500 rpm a 4°C durante cinco minutos. A fase superior foi recuperada em tubos novos e então precipitada com 900 µL de etanol absoluto na temperatura ambiente, por dois minutos. O passo seguinte foi centrifugar a amostra a 12.500 rpm a 4°C durante cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e ao microtubo adicionado 1mL de etanol 70% gelado (ANEXO). Novamente centrifugou-se a 12.500 rpm a 4°C durante cinco minutos. O etanol foi descartado, o *pellet* desidratado à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de TE com RNase (20 µg/mL). As amostras de DNA em suspensão foram incubadas a 37°C por 10 minutos para produzir uma suspensão homogênea de DNA. Após, as mesmas foram incubadas em temperatura ambiente e finalmente armazenadas a -20 °C.

3.12.5 Comprovação da eficiência da clonagem

Para comprovar que a clonagem foi bem sucedida, aplicou-se 4 µL do DNA plasmideal em gel de agarose 1% para verificar as características moleculares da sequência e também analisou-se o DNA por *nested*-PCR para PVS1.

3.13 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE PVS1 ISOLADAS A PARTIR DE TECIDOS FETAIS

A reação de sequenciamento foi preparada a partir do DNA purificado utilizando-se um kit comercial (DYEanamic ET terminators sequencing kit - GE Healthcare®). As leituras foram executadas utilizando-se o equipamento tipo ABI3130 (Applied Biosystems®), segundo orientações do fabricante.

Os dados gerados pelo sequenciamento foram primeiramente levados ao programa *Sequence Scanner* (Applied Biosystems®) o qual permite

visualizar erros nas leituras (falha na reação, sinal baixo, problemas na injeção) e análise da qualidade das mesmas. Após, as sequências de boa qualidade foram agrupadas para a formação da sequência consenso através do programa Vector NTI (Invitrogen®).

Posteriormente a formação da sequência consenso, a mesma foi submetida ao programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), contido no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*). O BLAST permite a busca de sequências depositadas neste banco de dados, as quais sejam similares às alinhadas no Vector NTI (KREUZER, 2002).

As sequências foram então submetidas aos programas BioEdit, versão 7.0.5 (HALL, 1999) e MEGA 4.0 (KUMAR et al., 2004), o qual oferecem ferramentas para analisar sequências de DNA e possibilitam que sejam realizadas análises filogenéticas numa perspectiva evolutiva. As sequências foram então alinhadas progressivamente utilizando-se o software Clustal W (THOMPSON et al., 1994). Assim, as sequências mais similares, ou seja, aquelas que apresentam maior homologia são alinhadas primeiramente. Então, progressivamente, grupos mais distantes são alinhados até que se obtenha um alinhamento global (KUMAR, TAMURA e NEI, 2004).

Em seguida, o método de agrupamento *neighbor-joining* foi empregado visando a elaboração de uma “árvore guia”, a qual foi utilizada para gerar o alinhamento global. Esse procedimento fornece um resultado próximo do ótimo, especialmente quando o conjunto de dados contém sequências com grau variado de divergência (NEI e KUMAR, 2000). A árvore foi construída utilizando-se 250 repetições de *Boot-strapping* (artifício utilizado visando testar a robustez do arranjo filogenético), tendo sido escolhido o modelo Kimura 2 parâmetros para a construção da matriz que deu origem a árvore filogenética.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLHEITA DAS AMOSTRAS

4.1.1 Granjas

Dos 27 rebanhos participantes do projeto, foi colhido um total de 230 leitões entre natimortos, mumificados, abortados e inviáveis para a produção, os quais foram necropsiados para a colheita dos órgãos (Figuras 4 e 5).

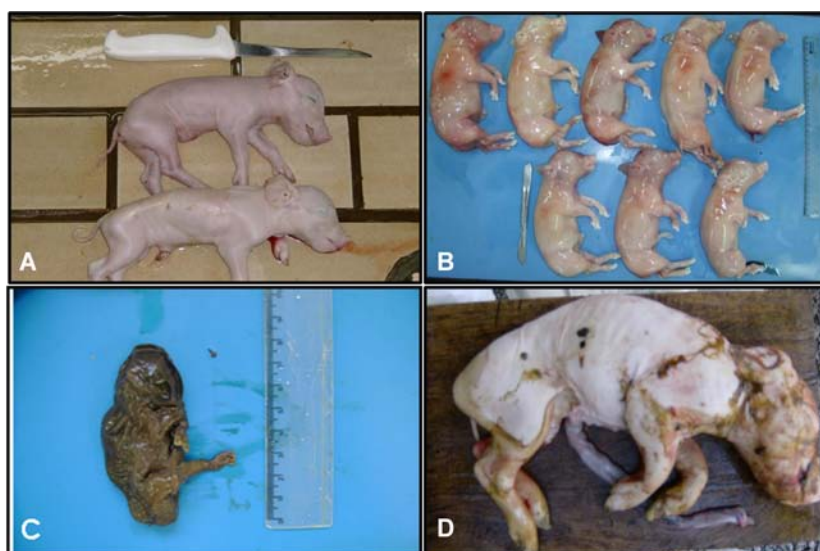


Figura 4. Amostras de leitões recebidos. A) Leitões inviáveis eutanasiados; B) Leitegada abortada; C) Feto mumificado; D) Leitão natimorto.

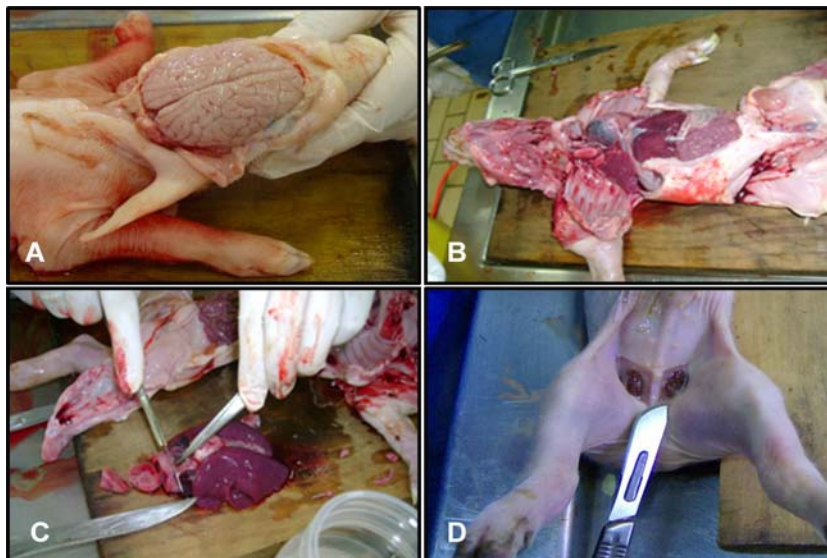


Figura 5. Necropsia e colheita de órgãos de fetos suínos. A) Colheita de tecido nervoso: cérebro, cerebelo e medula; B) Abertura das cavidades torácica e abdominal; C) Colheita de fragmentos de coração e pulmão; D) Linfonodos inguinais.

Houve o recebimento de fetos de diversos tamanhos e algumas vezes fetos em estado avançado de autólise. Na granja, ao obter leitões natimortos, mumificados ou abortados, a recomendação dada aos produtores era a de armazenar esses animais imediatamente sob refrigeração, além de não poder exceder 12 horas entre a colheita dos fetos e a entrega dos mesmos na Embrapa – Suínos e Aves para a realização das necropsias. Desta forma, os órgãos dos fetos permanecem em bom estado de conservação, tendo um ótimo aproveitamento para a realização dos exames laboratoriais. Porém, algumas vezes ocorreu do recebimento dos fetos ser realizado várias horas após o recomendado, resultando em animais com órgãos em estado avançado de autólise, impedindo a utilização destes para a realização do projeto.

Naturalmente, a chance de encontrar órgãos de fetos natimortos e mumificados com início de autólise é considerável, por isso, para um diagnóstico laboratorial eficaz leva-se muito em conta as condições em que as amostras são armazenadas e colhidas.

4.1.2 Abatedouros

Dos quatro abatedouros selecionados, foram colhidas amostras de útero e ovário de 83 porcas e de fluido folicular ovariano de 71 delas. A escolha das

porcas para a obtenção das amostras foi realizada ao acaso, desconsiderando a causa do descarte. A Figura 6 apresenta algumas das amostras colhidas.

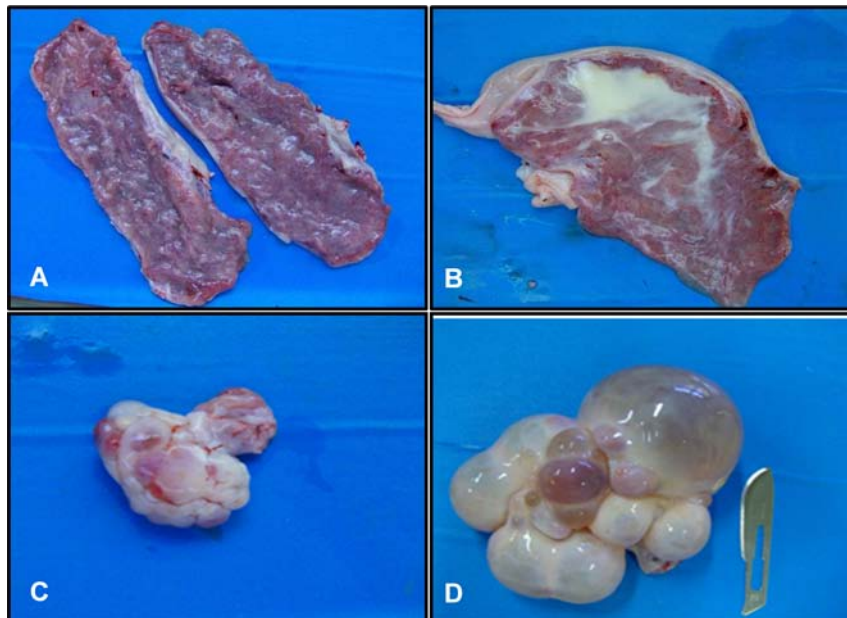


Figura 6. Órgãos reprodutivos de fêmeas suínas. A) Útero com mucosa normal; B) Útero com exsudato purulento; C) Ovário ciclando; D) Ovário cístico.

4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Até a presente data, o PVS1 segue sendo relatado em diversos países e correlacionado com problemas reprodutivos em fêmeas suínas (THACKER E GONZALEZ, 1988; MOSCARI et al., 1983; ROBINSON et al., 1985). Portanto, um dos objetivos do trabalho foi verificar a presença de PVS1 em material proveniente de fêmeas suínas com patologias reprodutivas.

O DNA do PVS1 foi amplificado de amostras originárias de porcas de cinco rebanhos dos 27 inclusos no estudo.

Dos 230 fetos necropsiados o material genético do PVS1 foi diagnosticado em órgãos de seis deles (2,61%). O DNA foi detectado através da técnica de *nested-PCR*, que amplificou fragmentos de 225 pares de base, como demonstrado na Figura 7.

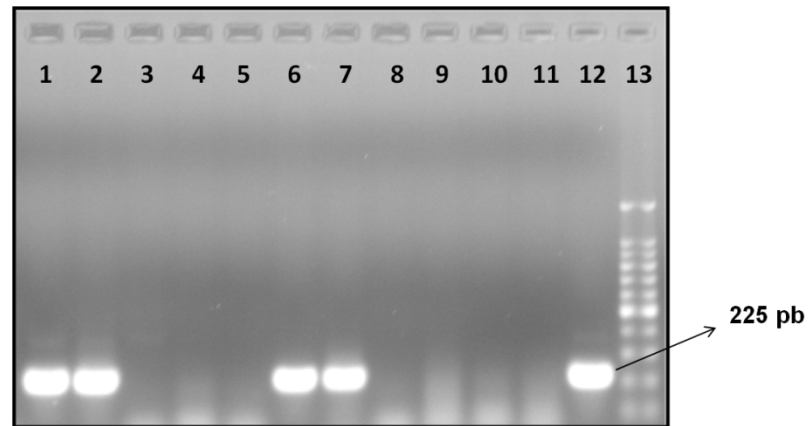


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PVS1 em órgãos de fetos. (1) Baço – feto 24; (2) Cerebelo – feto 24; (3) Baço – feto 25; (4) Coração – feto 25; (5) Fígado – feto 25; (6) Linfonodo inguinal – feto 25; (7) linfonodo mesentérico – feto 25; (8) Pulmão – feto 25; (9) Controle negativo 1 (água ultrapura); (10) Controle negativo 2 (água ultrapura); (11) Controle negativo 3 (água ultrapura); (12) Controle positivo PVS1 (pool de órgãos feto 24); (13) Marcador 100 pb (Cenbiot[®]).

A relação dos fetos e seus respectivos órgãos positivos para PVS1 na técnica de *nested*-PCR estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição do PVS1 em órgãos de fetos por *nested*-PCR.

Órgãos	Fetos						n
	24	25	36	50	229	230	
Coração	+	-	-	-	-	-	1/6
Pulmão	+	-	-	-	-	+	2/6
Fígado	+	-	-	-	-	-	1/6
Baço	+	+	-	-	-	-	2/6
Timo	-	-	-	-	-	-	0/6
Rim	+	-	-	-	-	-	1/6
Linfonodo submandibular	-	-	-	-	-	-	0/6
Linfonodo Inguinal	+	-	-	-	+	-	2/6
Linfonodo mesentérico	+	+	-	-	-	-	2/6
Cérebro	+	+	-	-	-	-	2/6
Cerebelo	+	+	-	+	-	-	3/6
Medula	+	+	+	-	-	-	3/6

(n) número de órgãos positivos sobre o total de analisados; (+) amostra positiva; (-) amostra negativa; (24), (25) e (50): fetos natimortos; (36): feto abortado; (229) e (230): leitões inviáveis.

Entre as amostras positivas analisadas, observou-se que o cerebelo e a medula foram os órgãos onde o DNA do PVS1 foi identificado com maior frequência (em 50% das amostras positivas). Estes resultados confrontam com os achados de WOLF et al. (2008), onde observaram uma maior incidência do PVS1 no pulmão e coração de fetos mumificados.

O pulmão, o baço, o linfonodo inguinal, o linfonodo mesentérico e o cérebro, tiveram o DNA do PVS1 presente em 33,33% das amostras positivas. ORAVEERAKUL et al. (1993) e WILHELM et al. (2005) examinaram a

distribuição do PVS1 em diferentes tecidos de fetos infectados experimentalmente e também constataram o vírus no pulmão, baço e cérebro.

Já no coração, no fígado e no rim o material genético viral estava presente em 16,67% das amostras positivas, conforme demonstrado na Figura 8. Foi possível constatar que o timo e o linfonodo submandibular de nenhum dos animais foram positivos para o PVS1. Porém, em trabalhos realizados por ORAVEERAKUL et al. (1993), WILHELM et al. (2005) e WOLF (2008), o PVS1 foi detectado no timo.

Cabe salientar que em alguns dos fetos analisados ácidos nucleicos do PVS1 foram encontrados em mais de um órgão.

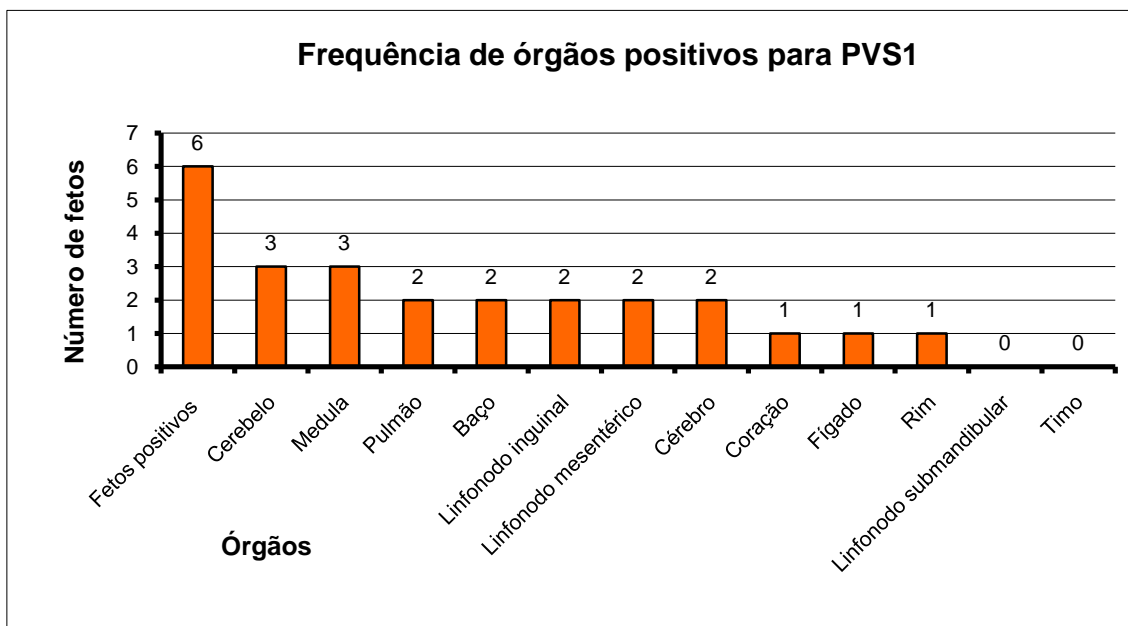


Figura 8. Frequência dos órgãos positivos dos fetos para PVS1.

Estudos anteriores relatam uma presença significativa do material genético do PVS1 em tecidos fetais através da PCR como, SOARES et al. (1999), que diagnosticaram 23 (95,8%) amostras positivas (fígado, pulmão, rim) das 24 testadas, entre aborto, múmia e natimorto. Através da *nested*-PCR, WOLF (2008) pesquisou o PVS1 em 108 amostras de tecidos de fetos natimortos, abortados e mumificados, detectando o DNA viral em 82,4% das amostras.

De 28 fetos abortados, mumificados e natimortos, WOLF et al. (2008) detectaram o PVS1 em 27 (96,4%) deles. Já com menor frequência, ALTHERR

et al. (2003), num total de 279 fetos abortados, detectaram o PVS1 em 65 (23,3%) fetos e, PESCADOR (2008), detectou o material genético do PVS1 em 17 (14,5%) fetos de um total 117 amostrados.

Por outro lado, MALDONADO et al. (2005), analisaram amostras de tecidos (pulmão, coração, baço, fígado e rim) de 239 fetos abortados e natimortos na Espanha e, nenhum feto apresentou infecção pelo PVS1. Eles se surpreenderam devido a doença ser endêmica no país, no entanto, segundo eles, a maioria das granjas, se não todas, são vacinadas contra a parvovirose suína. Além de levar em conta a vacinação, a qual diminui as chances de infecção, observa-se que no trabalho destes autores foram analisadas amostras apenas de alguns órgãos dos fetos, o que poderia estar mascarando a positividade da enfermidade em algum rebanho. Pois quando comparado ao trabalho descrito aqui, foi obtido 50% de positividade em amostras de medula e cerebelo, órgãos que não foram avaliados no trabalho citado. Com isso, é importante colher o maior número possível de órgãos por animal, a fim de certificar a presença ou ausência da infecção.

No trabalho apresentado aqui, a baixa detecção do PVS1 em tecidos fetais também causou estranheza, pois o vírus é endêmico no Brasil. No entanto, 100% dos rebanhos colaboradores do projeto são vacinados contra a parvovirose suína, podendo justificar o reduzido número de fetos infectados. Outro fator que pode ter influenciado para esta baixa positividade é a idade gestacional dos fetos recebidos para a necropsia. A maioria desses fetos eram natimortos acima de 16 cm, ou seja, já possuíam o sistema imune ativo produzindo anticorpos contra o PVS1.

BACCARO et al. (1999) examinaram órgãos (pulmão, baço, fígado e rim) de 407 fetos natimortos, abortados e mumificados, diagnosticando o PVS1 em 36 deles (9%). Das 50 granjas estudadas nove (18%) apresentaram resultado positivo para a parvovirose suína. Resultado semelhante foi encontrado nesse estudo onde, de 230 fetos analisados, seis (2,61%) foram positivos e, dos 27 rebanhos analisados quatro (14,81%) foram positivos para o PVS1. Em ambos os trabalhos observou-se alta frequência de amostras negativas.

Líquidos estomacais de 109 fetos foram colhidos e através da *nested*-PCR o DNA do PVS1 foi detectado em três deles (2,75%) (Figura 9).

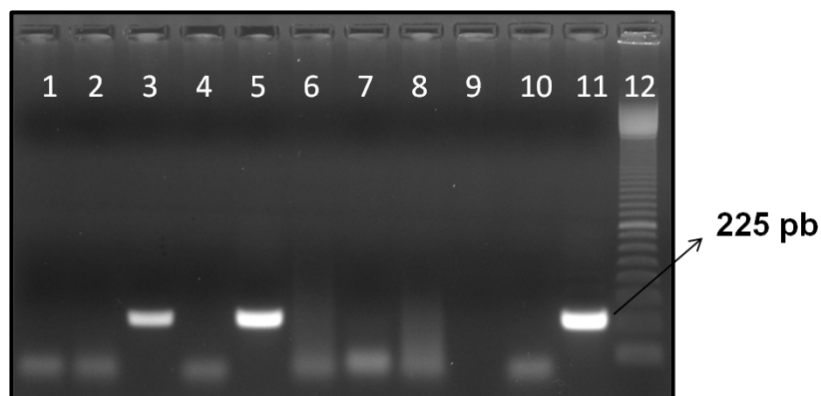


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PVS1 em líquido estomacal de fetos. (1) Feto 92; (2) Feto 93; (3) Feto 95; (4) Feto 94; (5) Feto 96; (6) Feto 97; (7) Feto 98; (8) Feto 101; (9) Nada aplicado; (10) Controle negativo (água ultrapura); (11) Controle positivo PVS1 (pool de órgãos feto 24); (12) Marcador 100 pb (Amersham®).

No Brasil, MORENO et al. (2007) pesquisaram o PVS1 em líquido estomacal e órgãos como pulmão, baço, fígado e rim de 1727 fetos natimortos, mumificados e abortados dos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás. Foi reportado que 17% das amostras testadas foram positivas para PVS1, todavia não foram detalhadas quantas amostras de líquido estomacal estavam incluídas nesse total de positivas. Desta forma, não foi possível fazer uma comparação com os resultados do trabalho apresentado aqui.

Exceto este estudo anteriormente citado, não se encontrou outro relato na literatura sobre PCR para detecção do PVS1 em líquido estomacal fetal. Todavia, CORTEZ et al. (2001) relatam os resultados de uma técnica de extração de DNA de conteúdo estomacal através de fervura para amplificação por PCR de sequências de *Brucella*.

Os três líquidos estomacais positivos para o PVS1 do presente trabalho eram provenientes de fetos natimortos cujo seus órgãos foram negativos na técnica de *nested*-PCR. Devido a patogenia do vírus no feto não estar totalmente esclarecida torna difícil uma conclusão para este fenômeno. Desta

forma, o líquido estomacal de fetos devem ser melhor avaliado e considerado como amostra importante para se estudar a patogenia reprodutiva em suínos.

Das 83 porcas descartadas nos quatro abatedouros de suínos que fizeram parte do projeto, o material genético do PVS1 estava presente em órgãos reprodutivos de seis delas (7,23%). Considerando os locais onde houve reação positiva, uma porca teve reação no útero e no ovário, duas no fluido folicular e ovário, uma apenas no fluido folicular e duas somente no ovário. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 3. A Figura 10 apresenta o resultado de uma reação de *nested*-PCR das amostras das porcas descartadas.

Tabela 3. Resultado da *nested*-PCR de fluido folicular, ovário e útero de seis das 83 porcas descartadas.

Porcas positivas	Fluido folicular	Ovário	Útero
27	-	+	-
53	+	+	-
54	+	+	-
55	+	-	-
56	-	+	+
74	-	+	-

(+) Resultado Positivo; (-) Resultado Negativo

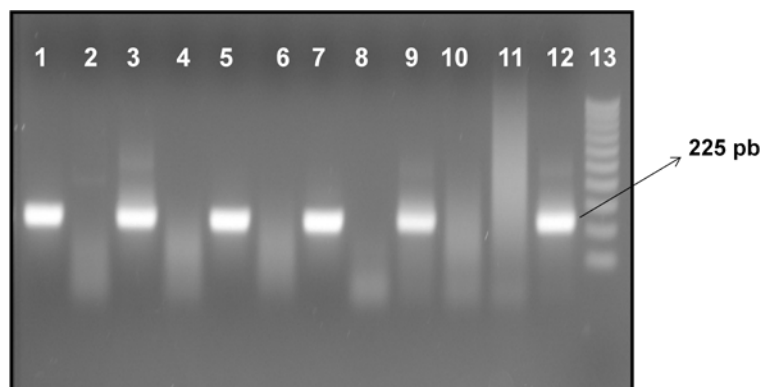


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1%. Detecção de PVS1 em órgão reprodutivo de porcas descartadas. (1) Ovário - Porca 27; (2) Útero - Porca 27; (3) Ovário - Porca 53; (4) Útero - Porca 53; (5) Ovário - Porca 54; (6) Útero - Porca 54; (7) Ovário - Porca 74; (8) Útero - Porca 74; (9) Ovário - Porca 56; (10) Controle negativo 1 (água ultrapura); (11) Controle negativo 2 (água ultrapura); (12) Controle positivo PVS1 (pool de órgãos feto 24); (13) Marcador 100 pb (Biorad®).

Um trabalho semelhante foi realizado por POGRANICHNIY et al. (2008), onde colheram fluido folicular ovariano de 49 porcas abatidas e através da técnica de PCR detectaram o material genético do PVS1 em seis amostras (12,2%). No estudo apresentado, foram colhidos fluidos foliculares de 71 porcas, sendo 4,23% positivos para o PVS1.

GIVENS et al. (2007) relatam que, embora geralmente seja aceito que o uso da transferência de embriões é mais seguro para a distribuição de germoplasma quando comparado com a movimentação de animais pós natal, o risco de transmissão de agentes infecciosos através da transferência de embriões deve ser considerado.

Na espécie suína, a associação entre os embriões e os patógenos tende a ser mais forte, mesmo após lavagem prolongada dos embriões com tripsina, procedimento utilizado para gerar embriões livres de patógenos específicos, (STRINGFELLOW, 1998).

Segundo MOLITOR et al. (1991), cerca de 30.000 embriões de suínos foram transferidos em 2005 em todo o mundo e este número tende a aumentar. Os autores também revelam que o material obtido a partir dos abatedouros muitas vezes é utilizado para a produção de embriões *in vitro*, reforçando que o

potencial epidemiológico de tecnologias modernas deve ser monitorado continuamente.

Vários patógenos, inclusive o PVS1, mostraram-se aderir fortemente à superfície da zona pelúcida, representando um risco para os embriões produzidos *in vitro* (STRINGFELLOW et al., 1998). Desta forma, maiores taxas de morte embrionária e menores taxas de prenhez após a transferência de embriões pode estar associada a essas tecnologias. Para GIVENS et al. (2007) testar todos os materiais de abatedouro para contaminantes é um controle crítico para a produção e transferência de embriões *in vitro*, restando determinar se a quantidade de PVS1 que está associado com os embriões é suficiente para constituir uma dose infecciosa para os animais receptores.

Enfim, como no trabalho de POGGRANICHNIY et al. (2008), o estudo apresentado aqui reportou a presença do PVS1 em amostras de fluido folicular ovariano, identificando um risco potencial de afetar a segurança das tecnologias de transferência de embriões em suínos.

RITTERBUSCH et al. (2009a, 2009b) realizaram a mesma pesquisa porém, buscando diagnosticar o material genético do PCV1, PCV2, TTV1 e TTV2 em útero, ovário e fluido folicular ovariano de porcas abatidas. Por *nested-PCR*, das 83 porcas analisadas, os autores verificaram a presença de PCV1 em líquido folicular de seis porcas (8,45%) e em pool de ovário e útero de oito (9,63%). O PCV2 foi detectado em apenas uma amostra de fluido folicular (1,14%), porém presente em quatro amostras de órgãos (4,81%). A presença do TTV1 e do TTV2 foi verificada em 25 (30,12%) e 41 (49,34%) porcas, respectivamente. Comparando com os dados do trabalho apresentado aqui, observou-se maior frequência de TTV1 e TTV2 nos órgãos reprodutivos das porcas descartadas, seguido pelo PCV1, PVS1 e em menor frequência pelo DNA do PCV2. Estudos como estes ajudam a esclarecer a patogênese da transmissão viral aos conceptos, juntamente com outros trabalhos que têm relatado a importância do sêmen na transmissão da parvovirose suína e outros vírus (GUÉRIN e POZZI, 2005).

4.3 PADRONIZAÇÃO DE *nested*-PCR COM CONTROLE INTERNO DE AMPLIFICAÇÃO (CIA)

Um controle interno de amplificação (CIA) de 100pb foi desenhado (Invitrogen™) para a *nested*-PCR do PVS1 a partir da região amplificada pelos *primers nested forward* e *nested reverse*.

Iniciou-se o teste de padronização com diluições do CIA a 500 pmol (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000 e 1:100.000). Aplicando-se, em gel de agarose 1%, 5 µL do CIA a 500 pmol e 5 µL de cada diluição (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000 e 1:100.000) (Figura 14), verificou-se qual diluição se apresentou menos intensa mas possível de visualização. A diluição selecionada para prosseguir no teste de padronização foi a 1:10.000. Aplicando-se 1 µL, 5 µL e 10 µL, em gel de agarose 1%, e também o produto da *nested*-PCR feita com 1 µL, 5 µL e 10 µL, desta diluição, verificou-se qual a quantidade aplicada da diluição não foi mais visualizada em gel e a quantidade da diluição que ainda seria visualizada quando na reação de *nested*-PCR.

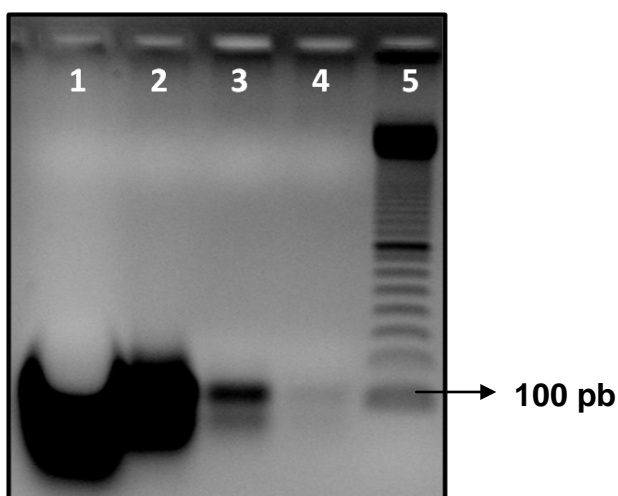


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização de *nested*-PCR de PVS1 com CIA. Aplicação de 5 µL do CIA a 500 pmol: (1) 500 pmol; (2) Diluição 1:10; (3) Diluição 1:100; (4) Diluição 1:1000; (5) Marcador 100 pb (Amersham®).

A padronização da *nested*-PCR com controle interno de amplificação ou CIA foi feita utilizando 1 μ L do CIA de 100 pb (500 pmol) diluído a 1:10.000, por amostra, na reação de *nested*-PCR. A reação de *nested*-PCR com CIA foi testada com tecidos fetais e tecidos de órgãos reprodutivos de fêmeas suínas descartadas. O fragmento de 100 pb do CIA foi amplificado em todas as reações (Figuras 15 e 16).

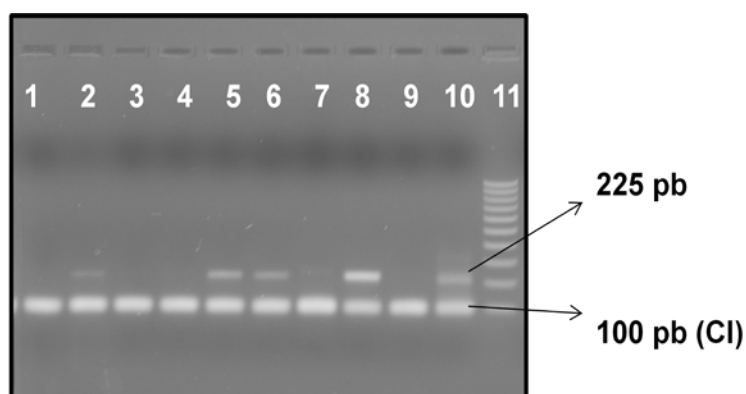


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1%. *Nested*-PCR de tecidos fetais para o PVS1 com CIA. (1) Timo - Feto 24, (2) Coração - Feto 24; (3) Coração - Feto 25; (4) Pulmão - Feto 25; (5) Baço - Feto 25; (6) Medula - Feto 36; (7) Cérebro - Feto 36; (8) Cerebelo - Feto 50; (9) Controle negativo (água ultrapura); (10) Controle positivo PVS1 (pool de órgãos feto 24); (11) Marcador de peso molecular 100 pb (Biorad®).

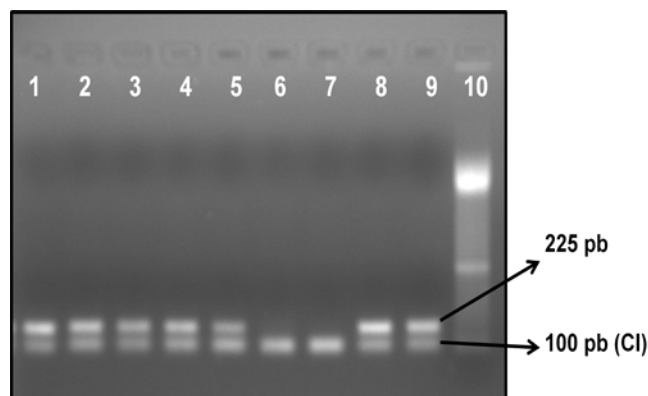


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1%. *Nested-PCR* de órgãos reprodutivos de porcas descartadas com CIA. (1) Ovário - Porca 27; (2) Ovário - Porca 53; (3) Ovário - Porca 54; (4) Ovário - Porca 56; (5) Ovário - Porca 74; (6) Controle negativo 1 (água ultrapura); (7) Controle negativo 2 (água ultrapura); (8) Controle positivo-1 PVS1 (pool de órgãos feto 24); (9) Controle positivo-2 PVS1 (pool de órgãos feto 24); (10) Marcador de peso molecular (Cenbiot®).

A sensibilidade, a especificidade e a rapidez são fatores positivos que nos permitem optar pelo uso da técnica de PCR para diagnóstico. Porém, há algumas desvantagens como a possibilidade de gerar resultados falso-negativos. Esses resultados podem não ser distinguidos entre uma reação realmente negativa e uma reação negativa por consequência do mau funcionamento dos reagentes, do termociclador ou por inibidores da PCR na matriz da amostra (FREITAS et al., 2006). Devido ao fato de várias amostras do presente estudo terem resultado negativas na PCR para o material genético do PVS1, foi utilizado um controle interno de amplificação em cada reação para indicar possíveis resultados falso-negativos.

Segundo MALLORNY et al. (2003), um CIA é uma sequência de DNA não-alvo, mas presente no tubo da reação, e amplificada juntamente com a sequência-alvo. Um resposta negativa (sem sinal ou banda) numa PCR sem um CIA pode significar que não há sequência-alvo na reação, como também que a reação foi inibida devido a um funcionamento inadequado do termociclador, preparação incorreta da reação da PCR, baixa atividade da polimerase ou presença de substâncias inibidoras na amostra. Já, em uma PCR com CIA, um sinal de controle sempre vai ser produzido quando houver

uma sequência não-alvo presente. No entanto, quando não houver a produção do sinal do CIA e nem da sequência-alvo, a reação de PCR foi falha. Logo, o CIA numa PCR indicará resultados falso-negativos se a concentração estiver ajustada corretamente.

Enfim, as reações de PCR com CIA proporcionam maior confiabilidade nos resultados.

4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS POSITIVOS NA *nested*-PCR

Avaliações histopatológicas foram realizadas nos órgãos dos seis fetos que resultaram positivos para PVS1 pela técnica de *nested*-PCR, totalizando 19 cortes de tecidos analisados. Lesões microscópicas discretas foram encontradas em tecidos como pulmão, fígado, rim e medula do feto 24 (Figura 11).

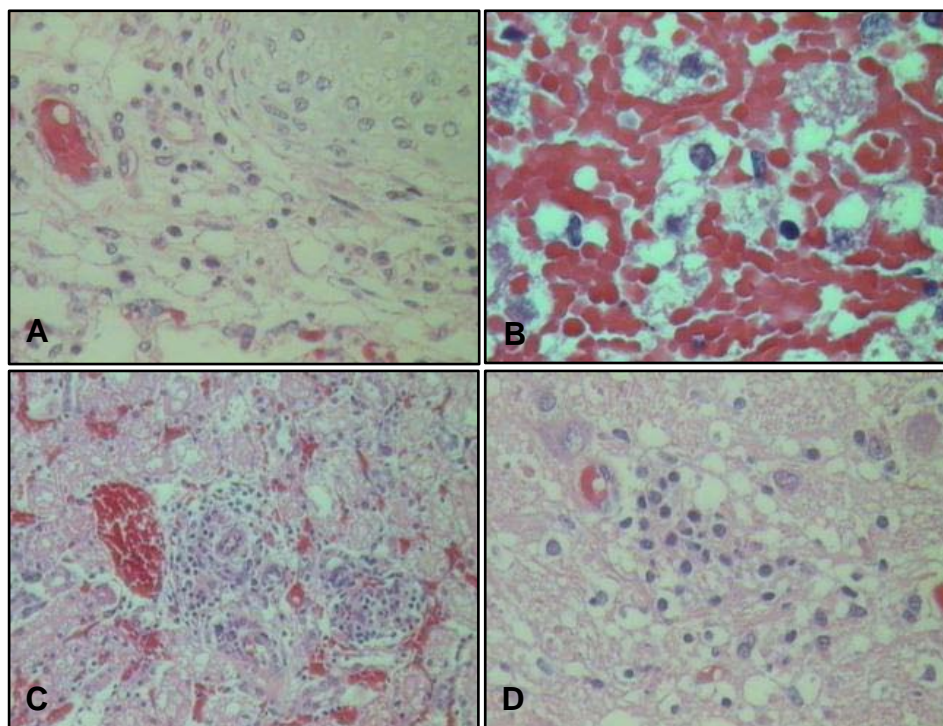


Figura 14. Cortes histológicos de tecidos do feto 24. (A) Pulmão (aumento 50X): discreto infiltrado inflamatório mononuclear; (B) Fígado (aumento 100X): hemorragia difusa e degeneração hidrópica; (C) Rim (aumento 25X): hemorragia difusa e focos inflamatórios mononucleares na medular; (D) Medula (aumento 50X): discreta gliose. Fonte: Sá Rocha, 2009.

Achados histopatológicos foram vistos por VAN LEENGOED et al. (1983) em leitões natimortos provenientes de porcas naturalmente infectadas pelo PVS1. As lesões encontradas foram congestão e necrose hepática, acúmulo de fluido nas cavidades corporais, miocardite e encefalite.

Alguns estudos têm demonstrado que lesões histopatológicas significativas dificilmente são observadas em fetos infectados experimentalmente por PVS1 (CULTIP et al., 1975). No entanto, LENGHAUS et al. (1978), numa infecção experimental intra-uterina aos 35, 50 e 60 dias de gestação, observaram mudanças histológicas nos tecidos fetais, como necrose e corpúsculos de inclusão intranuclear nas células do fígado, pulmão, rim e cerebelo. Em fetos infectados no último estágio da gestação foram detectadas células mononucleares em diversos tecidos.

Para PROZESKY et al. (1980), lesões microscópicas são mais pronunciadas em fetos inoculados aos 71 dias de gestação, muito mais severas quando inoculados aos 79 e 80 dias de gestação e, ausente em fetos inoculados aos 96 dias. Considerando este estudo, a estimativa da idade gestacional de fetos suínos, apresentada por BARLOW (1998) (Tabela 4) e o tamanho dos fetos do estudo apresentado aqui (Tabela 5), cinco dos seis fetos analisados não apresentaram lesões microscópicas e supostamente estavam acima dos 91 e 100 dias gestacionais, concordando com o trabalho de PROZESKY et al. (1980).

Tabela 4. Estimativa da idade gestacional de fetos suínos conforme seu tamanho.

Idade gestacional (dias)	Medida (cm)
34	4
40	6
52	10
61	13
70	16
82	20
91	23
100	26

Fonte: BARLOW (1998)

Tabela 5. Tamanho de cada leitão positivo na *nested*-PCR do presente estudo.

Leitões	Medida* (cm)
24 - Natimorto	30
25 - Natimorto	31,5
36 - Aborto	23
50 - Natimorto	32
229 - Inviável	30
230 - Inviável	30

* As medidas foram adquiridas considerando o início do focinho até a inserção da cauda.

Avaliações histopatológicas também foram realizadas no útero e ovário das seis porcas positivas para PVS1 pela técnica de *nested*-PCR, totalizando 12 cortes de tecidos analisados.

Na avaliação histológica do tecido uterino, em duas porcas (2,40%) foram observadas lesões de endometrite catarral, com discreta infiltração inflamatória no endométrio e lâmina própria do útero; em mais duas porcas (2,40%) observou-se endometrite purulenta apresentando exsudato celular purulento no lúmen uterino; e nas outras duas porcas (2,40%) não foram visualizadas alterações histológicas, possuindo útero normal (Figura 12).

Estudos mostram que inflamação, hipertrofia endotelial, bem como infiltrado de células mononucleares foram observados no epitélio uterino de porcas positivas para o PVS1 (MORAES & COSTA, 2007).

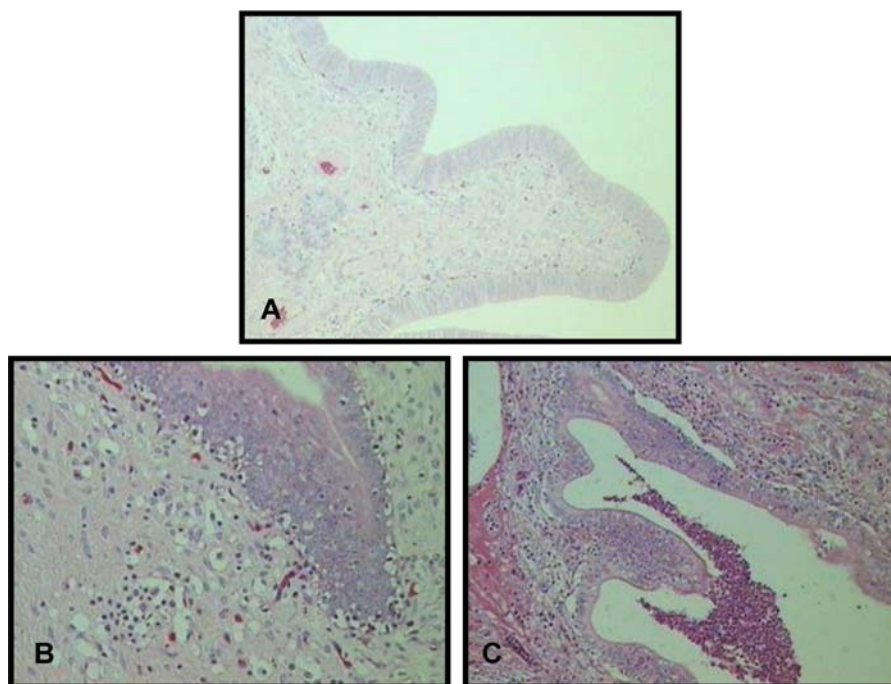


Figura 15. Cortes histológicos de tecidos uterinos. Aumento 50X. (A) Útero normal, sem alterações histológicas; (B) Endometrite catarral: discreta infiltração inflamatória no endométrio e lâmina própria do útero; (C) Endometrite purulenta: exsudato celular purulento no lúmen uterino.

Observa-se que a presença do vírus não cursa necessariamente com lesão no tecido uterino. O presente estudo não considerou a causa do descarte das porcas, porém os dados sugerem que a presença do PVS1 pode estar relacionada com alterações no aparelho reprodutivo de fêmeas suínas em produção.

Os ovários foram avaliados quanto ao período do ciclo estral das porcas e classificados como ciclando, em anestro ou ovário cístico, de acordo com a presença de folículos em crescimento, corpos lúteos após a ovulação ou cistos foliculares. Das seis porcas positivas para PVS1 por *nested*-PCR uma (1,20%) estava em anestro e cinco (6,02%) encontravam-se ciclando, indicando que a presença do vírus não interferiu no ciclo estral dessas porcas.

Os resultados do exame histopatológico dos ovários e úteros podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados do exame histopatológico do ovário e útero das seis fêmeas positivas para o PVS na *nested*-PCR, de um total de 83 porcas analisadas

Porcas positivas	Exame histopatológico					
	Ovário			Útero		
	Ovário Ciclando	Ovário Cístico	Ovário em Anestro	SA	ECA	EP
27	+	-	-	-	+	-
53	+	-	-	+	-	-
54	+	-	-	-	-	+
55	+	-	-	-	-	+
56	+	-	-	+	-	-
74	-	-	+	-	+	-

(+) Resultado Positivo; (-) Resultado Negativo; (SA) Sem Alteração; (ECA) Endometrite Catarral; (EP) Endometrite Purulenta.

Podemos verificar que a presença do PVS1 nos tecidos reprodutivos não prejudicou o funcionamento dos ovários. Contudo, mais estudos precisam ser feitos para esclarecer a patogenia do vírus nestes tecidos.

MOREIRA et al. (2003) realizaram um estudo para avaliar microscopicamente os ovários de 104 matrizes suínas em produção no Estado de Goiás. Os autores encontraram 51 (49%) porcas com os ovários em atividade cíclica, e pequenos cistos foliculares e luteínicos. Relacionando com nossa pesquisa, encontramos menor frequência (6,02%) de ovários cíclicos e nenhum cisto ovariano, pois a nossa avaliação foi somente nos órgãos reprodutivos positivos na técnica de *nested*-PCR, ou seja, em um número bem menor de porcas.

Estudos como estes ajudam a esclarecer a patogenia do vírus e outras pesquisas estão sendo realizadas para estabelecer se há relação entre a presença do vírus e ocorrência de problemas que levam ao descarte das porcas.

4.5 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) EM TECIDOS FETAIS

Os órgãos positivos dos fetos na *nested*-PCR foram testados para a IHQ com os protocolos citados no item 3.9, porém em nenhum houve a reação

antígeno-anticorpo esperada. Por outro lado, o tecido (pulmão) cedido gentilmente por Caroline Argenta Pescador da UFMT apresentou o antígeno viral através do protocolo com a recuperação antigênica feita por Proteinase K 0,05%, Pepsina 0,04% e Tripsina 10%, e aplicação do anticorpo primário diluído a 1:200. Seguindo os parâmetros para a interpretação do resultado, considerou-se uma reação positiva fraca com marcação em menos de 25% do tecido (Figura 13).



Figura 16. Tecido positivo nos testes de IHQ para detecção do PVS1, corado com AEC. Pulmão: reação localizada no parênquima alveolar.

Conforme estudos realizados por FOX et al. (1985) e RAMOS-VARA e BEISSEHERZ (2000), concluiu-se que o uso do formaldeído, para fixação dos tecidos, proporciona boa preservação da morfologia celular, no entanto, causa alterações estruturais importantes nos antígenos teciduais, dificultando ou impedindo o reconhecimento pelos anticorpos na técnica de IHQ. Suspeita-se que, a dificuldade tida no presente trabalho, para conseguir a reação esperada pela a técnica de IHQ, seja devido às alterações nos antígenos teciduais, conforme mencionado pelos autores acima, além de muitos tecidos fetais apresentarem-se autolisados e provavelmente com pouco antígeno.

SHI et al. (1991) estudaram que, muitas das alterações produzidas pela fixação com formaldeído podem ser revertidas usando diversos métodos de recuperação antigênica. No presente estudo, foram testados vários protocolos para recuperação antigênica, porém, podem não ter sido suficientes para o resultado esperado ou realmente os tecidos testados apresentavam pouca

quantidade de antígenos. No entanto, cabe ressaltar que uma reação tecidual foi obtida com sucesso, apesar de única e localizada (Figura 13).

KIM e CHAE (2004) obtiveram resultados diferentes aos do presente estudo. Eles detectaram antígeno do PVS1 em suínos naturalmente e experimentalmente infectados. De 200 tecidos, dos 20 suínos naturalmente infectados, 45 (22,5%) foram positivos para o PVS1 na IHQ. Os tecidos positivos foram pulmão, tonsila, linfonodo, baço, timo, intestino, fígado e rim.

PESCADOR (2008), em seu experimento, realizou IHQ dos tecidos dos 20 fetos positivos pela *nested*-PCR onde, apenas um, foi positivo na IHQ. O antígeno foi visualizado no tecido pulmonar caracterizado pela marcação da coloração em célula epitelial do bronquíolo.

O tamanho ou a idade dos fetos positivos na *nested*-PCR pode ter influenciado a baixa concentração de antígeno na IHQ, pois fetos acima de 16 cm ou com idade gestacional acima de 70 dias são imunocompetentes, respondendo contra a infecção do PVS1, reduzindo a concentração de antígeno viral.

Neste estudo, a *nested*-PCR por ser um método diagnóstico mais sensível foi o teste ideal. Portanto, recomenda-se testar tecidos fetais por *nested*-PCR, independente do tamanho ou idade do feto e a IHQ pode ser usada para diagnosticar outros agentes virais e não o PVS1.

4.6 PADRONIZAÇÃO DE PCR PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO TIPO 4 (PVS4)

Em 2005, pesquisadores do *National Animal Disease Center / Agricultural Research Service / United States Department of Agriculture* (NADC / ARS / USDA, Ames, Iowa, Estados Unidos) identificaram um novo agente viral a partir de órgãos de suínos de um rebanho que apresentou um quadro agudo de mortalidade associado ao PCV2 (dados não publicados). Através de análises por *microarray* e sequenciamento, concluíram que se tratava de um novo parvovírus suíno, denominado por eles de Parvovírus Suíno Tipo 4 (PVS4). Estudos complementares sobre este agente estão em andamento e incluem a investigação de sua distribuição mundialmente e qual a patogenia no hospedeiro suíno. Desta forma, um dos objetivos do trabalho apresentado aqui foi desenhar *primers* específicos e padronizar a reação de PCR para o PVS4,

utilizando amostras colhidas neste estudo para um levantamento da sua distribuição. As reações foram denominadas de “275 pb” e “440 pb” (conforme o número de nucleotídeos amplificados por cada par de *primer*) e os resultados dos testes estão descritos a seguir.

Para a padronização da PCR variou-se quantidades de magnésio 50 mM (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 μ L), dNTP 100mM (0,5 e 1,0 μ L), *primers* 10 pmol (0,5 e 1,0 μ L) e temperatura de anelamento dos *primers* (55°; 57°; 60°; 61°; 62°; 63°; 64°; 65° e 68°C), podendo ser visualizado na Figura 17. Como controle positivo fez-se uso de 109,4 ng (1,0; 1,5 e 2,0 μ L) de DNA positivo de órgãos reprodutivos de porcas e, como controle negativo água ultrapura.

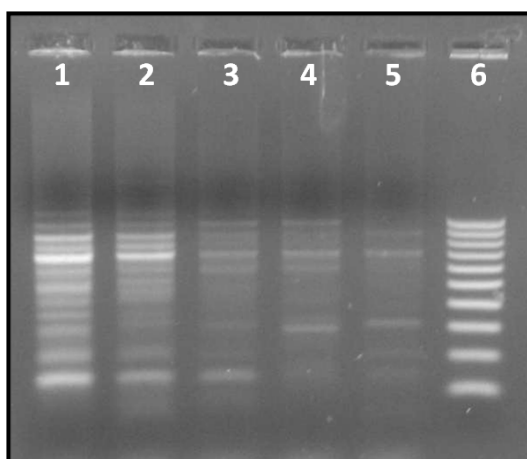


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização do *primer* “275 pb” do PVS4. Amostras 1 a 5 contém 17,85 μ L de água ultrapura; 2,5 μ L de *Buffer* 10X; 1,5 μ L de Magnésio; 1,0 μ L de dNTP; 0,5 μ L dos *primers* Forward e Reverse, 0,15 μ L de *Taq* DNA Polimerase e 1,0 μ L de DNA de PVS1. (1) Temperatura de anelamento 61°C; (2) Temperatura de anelamento 62°C; (3) Temperatura de anelamento 63°C; (4) Temperatura de anelamento 64°C; (5) Temperatura de anelamento 65°C; (6) Marcador de peso molecular 100 pb (Biorad®).

A reação, para a PCR utilizando o par de *primer* “275 pb”, foi padronizada para um volume de 25 μ L contendo 109,4 ng de DNA (1,5 μ L); 0,5 μ L de cada *primer* (*forward* e *reverse*) com concentração 10 pmol; 1,0 μ L de

dNTP 100 mM; 1,5 μ L de Magnésio 50 mM, 2,5 μ L de *Buffer* 10x, 17,35 μ L de água ultrapura e 0,15 μ L de *Taq* DNA polimerase. Para amplificação do DNA foi utilizado programa que compreende desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos; anelamento dos *primers* a 65°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, seguidos por extensão final por 10 minutos a 72°C (Figura 18).

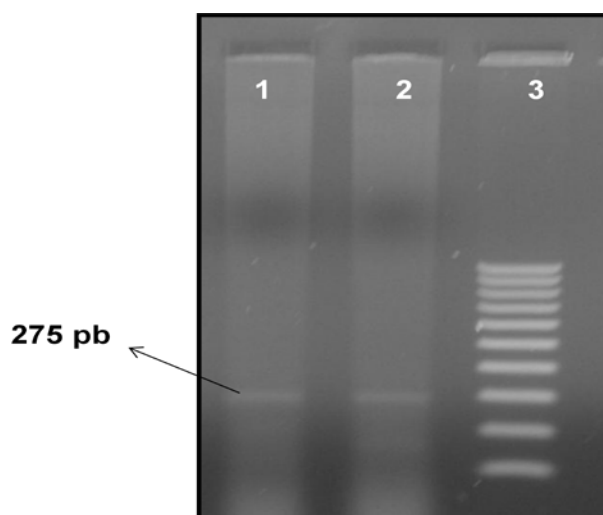


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização de PCR para o PVS4 com o par de *primer* “275 pb”. (1) Temperatura de anelamento 65°C (DNA positivo PVS1 ovário porca 74); (2) Temperatura de anelamento 68°C (DNA positivo ovário porca 74); (3) Marcador de peso molecular 100 pb (Biorad®).

Estas condições, quando determinadas como sendo ideais, foram aplicadas com amostras de tecidos de fetos positivos na *nested*-PCR para o PVS1 (Figura 19). Devido essas amostras apresentarem material genético positivo para o PVS1, pensou-se na hipótese de também haver DNA do PVS4 no material.

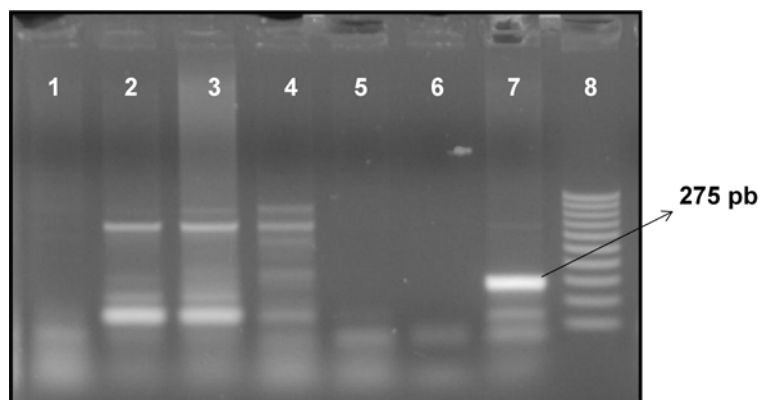


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1%. PCR de tecidos fetais para o PVS4 com o par de *primer* “275 pb”. (1) Pulmão - Feto 229; (2) Linfonodo inguinal - Feto 229; (3) Coração - Feto 230; (4) Pulmão - Feto 230; (5) Linfonodo inguinal - Feto 230; (6) Controle negativo (água ultrapura); (7) Controle positivo PVS1 (Ovário porca 74); Marcador de peso molecular 100 pb (Biorad®).

O resultado obtido não foi satisfatório, observando que quando utilizou-se amostras de tecidos fetais outras sequências foram amplificadas pelos *primers* utilizados. Desta forma, os tecidos fetais foram testados com o outro par de *primer* (“440 pb”).

A reação de PCR utilizando o par de *primer* “440 pb”, foi padronizada para um volume de 25 μ L contendo 109,4 ng de DNA (1,5 μ L); 0,5 μ L de cada *primer* (*forward* e *reverse*) com concentração 10 pmol; 1,0 μ L de dNTP 100 mM; 1,5 μ L de Magnésio 50 mM, 2,5 μ L de *Buffer* 10x, 17,35 μ L de água ultrapura e 0,15 μ L de *Taq* DNA polimerase. Para amplificação do DNA foi utilizado programa que compreende desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 segundos; anelamento dos *primers* a 63°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos, seguidos por extensão final por 10 minutos a 72°C (Figura 20).

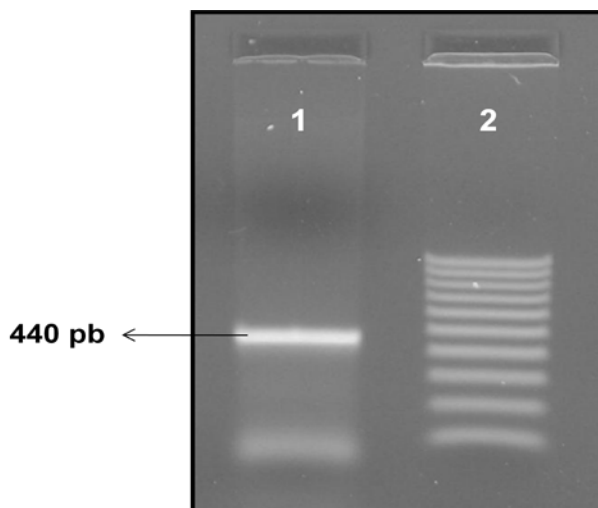


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1%. Teste de padronização de PCR para o PVS4 com par de *primer* “440 pb”. (1) Temperatura de anelamento 63°C (DNA positivo PVS1 ovário porca 74); (2) Marcador de peso molecular 100 pb (Biorad®).

Estas condições, quando determinadas como sendo ideais, também foram aplicadas com amostras de tecidos fetais (Figura 21).

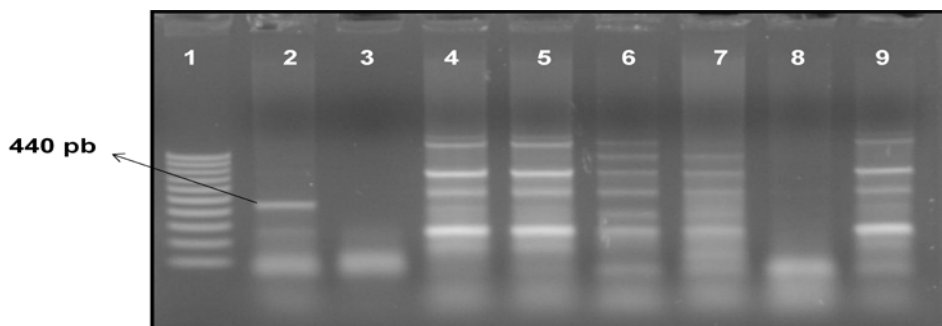


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1%. PCR de tecidos fetais para o PVS4 com o par de *primer* “440 pb”. (1) Marcador de peso molecular 100 pb (Biorad®); (2) Controle positivo PVS1 (Ovário porca 74); (3) Controle negativo (água ultrapura); (4) Coração - Feto 229; (5) Pulmão - Feto 229; (6) Linfonodo inguinal - Feto 229; (7) Coração - Feto 230; (8) Pulmão - Feto 230; (9) Linfonodo inguinal - Feto 230.

No resultado desta PCR, observou-se que a reação positiva padronizada para o PVS4 através de órgão reprodutivo de porca funcionou como esperado,

porém, aqui também houve amplificação de sequências inespecíficas nas amostras de tecidos fetais.

Não obstante, para este par de *primer* (“440pb”) também foram testadas amostras de líquido estomacal de fetos (Figura 22).

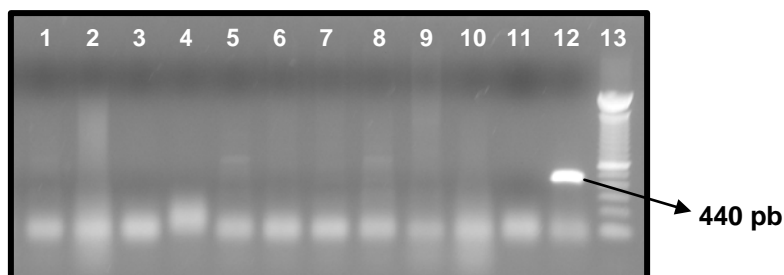


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1%. PCR de líquido estomacal de fetos para o PVS4 com o par de *primer* “440 pb”. (1) Feto 93; (2) Feto 109; (3) Feto 113; (4) Feto 125; (5) Feto 156; (6) Feto 182; (7) Feto 200; (8) Feto 212; (9) Feto 225; (10) Feto 234; (11) Controle negativo (água ultrapura); (12) Controle positivo PVS4 (DNA plasmideal PVS4 NADC/ARS/USDA); (13) Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®).

Na reação de PCR das amostras de líquido estomacal fetal não houve amplificação de sequências inespecíficas como na PCR das amostras de órgãos fetais, como também nenhuma amostra resultou positiva.

Devido a PCR para o PVS4 estar padronizada com os dois pares de *primers* (“275 pb” e “440 pb”) e não funcionar para órgãos fetais, concluímos que o DNA destes tecidos apresenta elementos que interferem na amplificação gerando produtos inespecíficos, não justificando uma nova padronização da PCR já estabelecida. Sendo assim, sugere-se sequenciar estes fragmentos amplificados com peso molecular aproximado para posterior caracterização molecular.

Amostras de órgãos reprodutivos de porcas como útero, ovário e fluido folicular ovariano foram testados utilizando o par de *primer* “440 pb”.

Para as reações do controle positivo, utilizamos o DNA plasmideal do PVS4 cedido gentilmente pelo *National Animal Disease Center* (NADC). Os resultados podem ser visualizados na Figura 23.

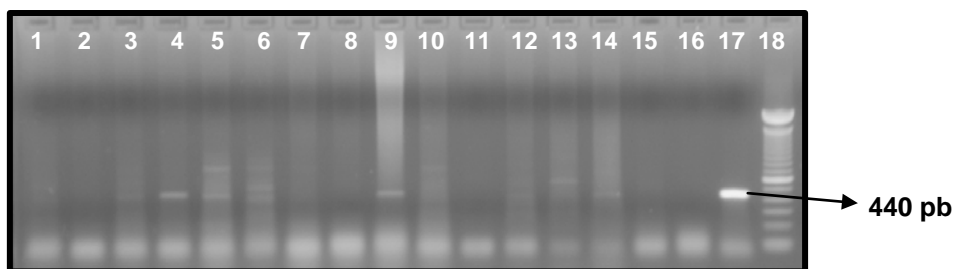


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1%. PCR de pool de tecidos (ovário e útero) e fluido folicular ovariano de porcas descartadas para o PVS4 com o par de *primer* “440 pb”. (1) Pool porca 6; (2) Pool porca 14; (3) Pool porca 21; (4) Pool porca 32; (5) Pool porca 39; (6) Pool porca 42; (7) Pool porca 57; (8) Pool porca 63; (9) Pool porca 82; (10) Pool porca 90; (11) Fluido folicular porca 4; (12) Fluido folicular porca 10; (13) Fluido folicular porca 16; (14) Fluido folicular porca 28; (15) Fluido folicular porca 31; (16) Controle negativo (água ultrapura); (17) Controle positivo PVS4 (DNA plasmideal PVS4 NADC/ARS/USDA); (18) Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®).

As amostras de pools de órgãos das porcas 6, 21, 32, 39, 42, 82, e fluido folicular ovariano das porcas 10 e 28 foram consideradas positivas. Nota-se que com estes tecidos não houve amplificação de bandas inespecíficas com a mesma intensidade como em tecidos fetais.

Em resumo, padronizou-se um teste de PCR para diagnóstico do PVS4. Amostras de órgãos reprodutivos de porcas descartadas resultaram positivas para o novo parvovírus suíno. Sendo assim, os resultados desta pesquisa são úteis e estão disponíveis para pesquisar a distribuição do vírus no país e também sua patogenia. Pesquisas sobre a importância do PVS4 e quais lesões ou perdas, se existentes para o suíno devem ser investigadas.

4.7 CLONAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Ao acaso, três amostras de DNA purificado de órgãos de fetos positivos para o PVS1 na *nested*-PCR foram submetidas a clonagem utilizando-se o kit comercial Kit TOPO TA cloning® da Invitrogen™.

A ligação do inserto foi realizada com o vetor pCR®2.1-TOPO® 3,9 kb (Figura 24) e a transformação em cepas de *Escherichia coli* DH5α competentes.

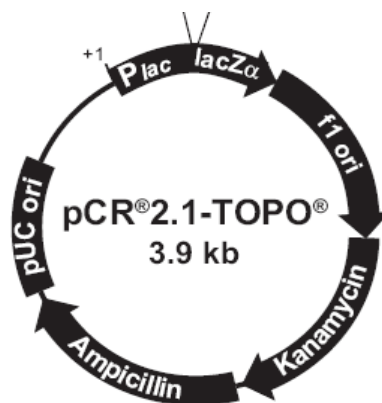


Figura 24. Representação do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] usado neste estudo. Fonte: TOPO TA cloning, Invitrogen[®].

Posteriormente, foram preparadas placas com meio de cultura específico para as células competentes transformadas crescerem e, após esse período, verificou-se nas placas o crescimento de colônias bacterianas (Figura 25).



Figura 25. Colônias bacterianas crescidas em meio LB.

Com uma alça de semeadura, algumas colônias foram selecionadas e semeadas em meio específico para seu crescimento. Após este período, os tubos com meio turvo foram um bom indicativo de amostras positivas (bactérias transformadas inserto/vetor).

Alíquotas com meio de crescimento bacteriano foram preparadas para realização da extração do DNA plasmideal recombinante (Figura 26).



Figura 26. Alíquota de meio com crescimento bacteriano para extração de DNA plasmideal de PVS1.

Para a comprovação da eficiência da clonagem aplicou-se o DNA plasmideal extraído em gel de agarose 1% e também fez-se *nested-PCR* deste material (Figura 27).

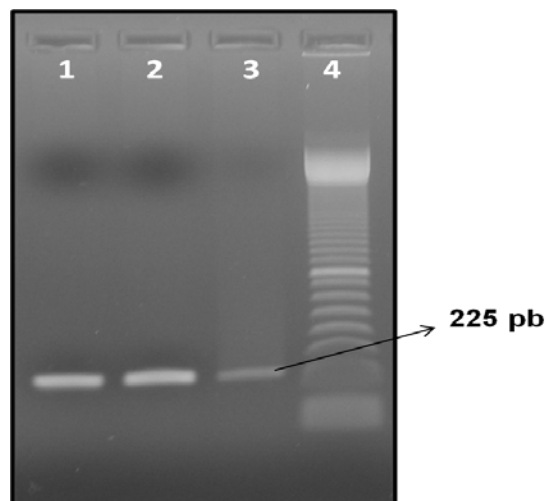


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose 1%. *Nested-PCR* de DNA plasmideal de clones de amostras positivas de tecidos fetais para PVS1 (1, 2 e 3); (4) Marcador 100pb (Amersham®).

4.8 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE PVS1 ISOLADAS A PARTIR DE TECIDOS FETAIS

Amostras de tecidos fetais e plasmídeos contendo o gene amplificado foram sequenciadas através da metodologia de terminação da cadeia utilizando-se kit comercial (DYEanamic ET terminators sequencing kit - GE healthcare, Giles, United Kingdom) e equipamento tipo ABI3130 (Applied Biosystems[®]), segundo orientações do fabricante.

As amostras de tecidos fetais foram denominadas de: 24 CF; 24 P; 24 LM; 24 CE e 25 MR. Já as amostras de DNA plasmídeos de: C1B; C2B; E1A e E1D.

A qualidade dos dados gerados no sequenciamento foi analisada através do programa *Sequence Scanner* (Applied Biosystems).

Após, quatro sequências de amostras de tecidos fetais foram agrupadas para a formação da sequência consenso através do programa Vector NTI (Invitrogen[®]).

Após a formação da sequência consenso, foi utilizado o programa BLAST para buscar sequências depositadas neste banco de dados que fossem similares às alinhadas no Vector NTI.

A amostra 24 LM foi a que obteve melhor resultado no sequenciamento, apresentando um número maior de nucleotídeos, portanto, foi a amostra escolhida para as análises a seguir. A figura 28 apresenta sequências depositadas no BLAST que são similares à sequência 24 LM.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU790642.1	Porcine parvovirus strain ZJ, complete genome	394	394	100%	1e-106	100%
AY390557.1	Porcine parvovirus strain VRI-1 non-structural protein 1 (NS1), capsid	394	394	100%	1e-106	100%
AY684871.1	Porcine parvovirus isolate 27a NS1 gene, partial cds; and VP1 and VP2	394	394	100%	1e-106	100%
FJ853420.1	Porcine parvovirus strain Tai'an NS1 gene, complete cds	388	388	100%	5e-105	99%
FJ822039.1	Porcine parvovirus strain Nanjing200802 NS1 and NS2 genes, complete cds	388	388	100%	5e-105	99%
FJ822038.1	Porcine parvovirus strain Nanjing200801, complete genome	388	388	100%	5e-105	99%
EU707335.1	Porcine parvovirus strain S-1 non-structural protein 1 (NS1) gene, complete cds	388	388	100%	5e-105	99%
AY502114.1	Porcine parvovirus NS1 (NS1) gene, complete cds	388	388	100%	5e-105	99%
AY686601.1	Porcine parvovirus strain NJ non-structural protein 1 (NS1) gene, complete cds	388	388	100%	5e-105	99%
AY684872.1	Porcine parvovirus isolate vaccine virus IDT NS3, NS1, NS2, VP1, and VP2	388	388	100%	5e-105	99%
AY684866.1	Porcine parvovirus isolate Challenge NS3, NS1, NS2, VP1, and VP2	388	388	100%	5e-105	99%
U44978.1	Porcine parvovirus strain Kresse, complete genome	388	388	100%	5e-105	99%
L23427.1	Porcine parvovirus (NADL-2) DNA fragment encoding PT4 and PT40	388	388	100%	5e-105	99%
M38367.1	Porcine parvovirus NS1, VP1, VP2 genes, complete cds	388	388	100%	5e-105	99%
M32787.1	Porcine parvovirus capsid protein genes, complete cds and nonstructural proteins	388	388	100%	5e-105	99%
D00623.1	Porcine parvovirus genome, almost complete sequence encoding NS1, NS2, VP1, and VP2	388	388	100%	5e-105	99%
EU790641.1	Porcine parvovirus strain BO, complete genome	383	383	100%	2e-103	99%
DQ675456.1	Porcine parvovirus strain SR-1, complete genome	383	383	100%	2e-103	99%
DQ499631.2	Porcine parvovirus strain SR-1 NS1 protein (NS1) gene, complete cds	383	383	100%	2e-103	99%
AY789534.1	Porcine parvovirus strain HN-Z3 nonstructural protein 1 (NS1) gene, complete cds	383	383	100%	2e-103	99%
AY789532.1	Porcine parvovirus strain NJ-2 nonstructural protein 1 (NS1) gene, complete cds	383	383	100%	2e-103	99%
AY739664.1	Porcine parvovirus strain nanjin-1 nonstructural protein 1 (NS1) gene, complete cds	383	383	100%	2e-103	99%
AY789533.1	Porcine parvovirus strain HN-Z1 nonstructural protein 1 (NS1) gene, complete cds	377	377	100%	1e-101	98%
AY583318.1	Porcine parvovirus strain China, complete genome	377	377	100%	1e-101	98%
AY684869.1	Porcine parvovirus isolate PPV/Tornau/1/02 NS3, NS1, NS2, VP1, and VP2	377	377	100%	1e-101	98%
EU659112.1	Feline panleukopenia virus isolate FPV-4.us 64 non-structural proteins	215	215	88%	8e-53	87%
EF988660.1	Feline panleukopenia virus strain XJ-1 non-structural protein 1 (NS1) gene, complete cds	215	215	88%	8e-53	87%
EU659121.1	Canine parvovirus isolate CPV-411b .us.98 non-structural protein 1, complete cds	209	209	88%	4e-51	86%

Figura 28. Sequências depositadas no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI, similares à sequência 24 LM do presente estudo. O retângulo vermelho demonstra três sequências (EU790642.1; AY390557.1; AY684871.1) com 100% de identidade com a sequência da amostra 24 LM. O retângulo rosa demonstra as sequências que apresentam 99% e 98% de identidade com a amostra 24 LM.

No quadro abaixo (Figura 29) está representada a homologia entre a sequência da amostra 24 LM e a sequência do parvovírus suíno cepa ZJ (EU790642.1), obtida no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI.

```

>gb|EU790642.1| Porcine parvovirus strain ZJ, complete genome
Length=5031

Score = 394 bits (213), Expect = 1e-106
Identities = 213/213 (100%), Gaps = 0/213 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      AGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGGTCAAACAATTAG 60
            |||
Sbjct 1623   AGGAAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCCGGTCAAACAATTAG 1682

Query 61     AATTGACCAAAAAGGTAAGGAAGCAAAACAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTAC 120
            |||
Sbjct 1683   AATTGACCAAAAAGGTAAGGAAGCAAAACAATTGAACCAACTCCTGTAATAATGACTAC 1742

Query 121    AAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATACACAACC 180
            |||
Sbjct 1743   AAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATACACAACC 1802

Query 181    AATAAGAGACAGAATGTTAAACATAAACCTAAC 213
            |||
Sbjct 1803   AATAAGAGACAGAATGTTAAACATAAACCTAAC 1835

```

Figura 29. Homologia entre a sequência 24 LM e a sequência do parvovírus suíno cepa ZJ (EU790642.1). (Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI).

Já a Figura 30, apresenta a análise de nucleotídeos entre as regiões sequenciadas das amostras do presente estudo (24 CE; 25 MR; 24 LM; 24 CF) e amostras homólogas contidas no GenBank. Observa-se que os nucleotídeos são praticamente iguais, sendo que a única diferença é a substituição de uma Adenina por uma Citosina, como pode ser visualizado na região em destaque dentro do retângulo rosa.

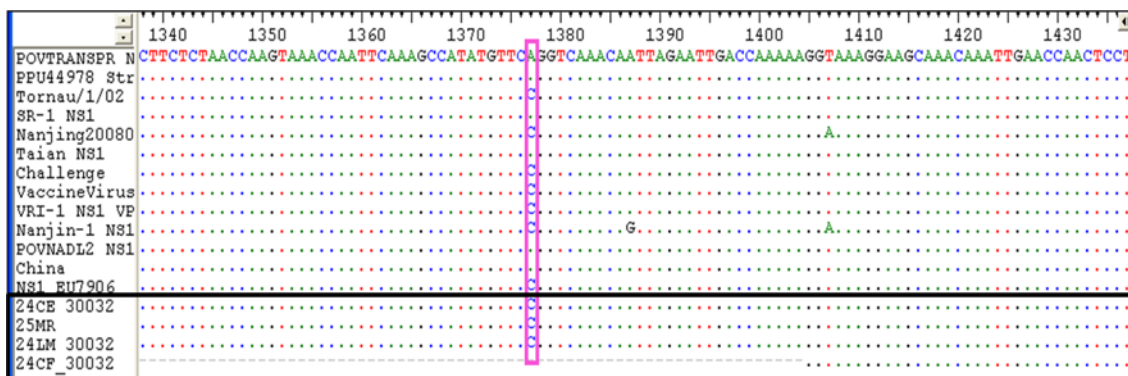


Figura 30. Análise de nucleotídeos entre as regiões sequenciadas das amostras do presente estudo (24 CE; 25 MR; 24 LM; 24 CF – retângulo preto) e as amostras homólogas contidas no GenBank. (Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI). Retângulo rosa: substituição de uma Adenina por uma Citosina.

Essa troca de nucleotídeos, porém, não chegou a alterar o aminoácido (Serina “S”, posição N° 459) formado na proteína NS1, como pode ser visualizado em destaque (retângulo azul) na Figura 31.

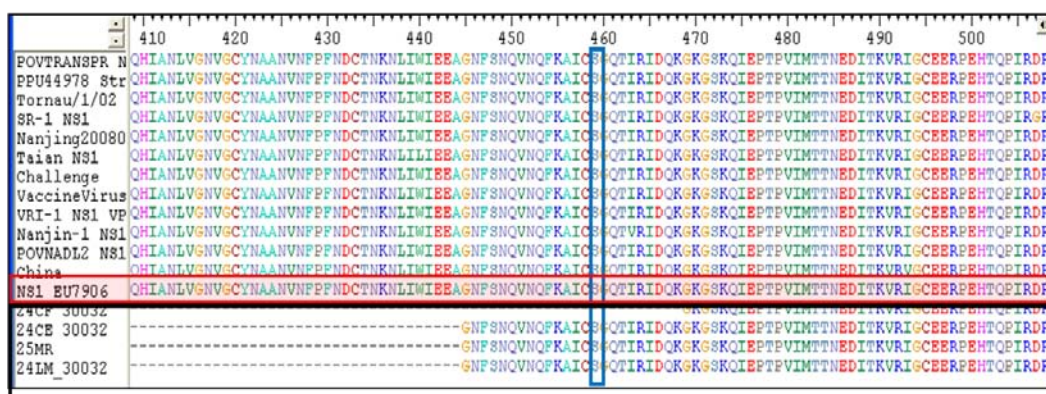


Figura 31. Análise de aminoácidos da proteína NS1 das amostras 24 CE; 25 MR; 24 LM; 24 CF e das amostras homólogas contidas no GenBank. (Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI). Retângulo azul: aminoácido Serina de todas as amostras. Retângulo preto: aminoácidos da proteína NS1 das amostras de tecidos fetais do presente estudo. Retângulo vermelho: Aminoácidos da proteína NS1 da amostra ZJ (EU790642.1).

Ainda na Figura 31, nota-se que os aminoácidos das amostras estudadas (retângulo preto) são idênticos aos da proteína NS1 da amostra ZJ (EU790642.1) usada como modelo (retângulo vermelho).

Além das análises anteriormente executadas, as sequências do presente estudo foram submetidas ao programa MEGA para a construção de uma árvore filogenética. Tais sequências foram alinhadas pelo programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994). A árvore filogenética está apresentada na Figura 32.

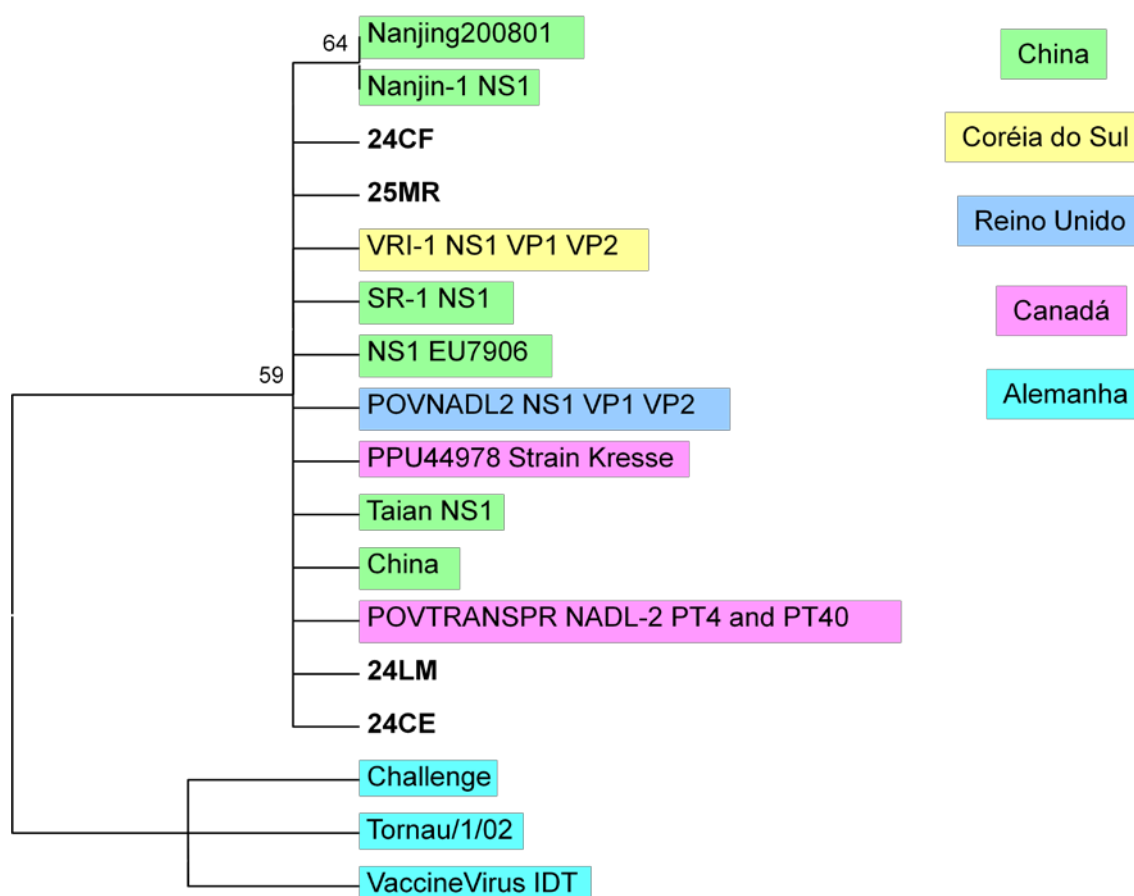


Figura 32. Análise filogenética de sequências de amostras de tecidos fetais do presente estudo (24 CF; 24 LM; 24 CE; 25 MR) e de sequências homólogas encontradas no GenBank.

Conforme a Figura 32, as sequências das amostras 24 CF; 24 LM; 24 CE e 25 MR agruparam com isolados da China (FJ822038.1; AY739664.1; DQ499631.2; FJ853420.1; AY583318.1; EU790641.1), da Coréia do Sul (AY390557.1), do Reino Unido (M38367.1) e do Canadá (U44978.1),

mostrando que isolados similares aos dos tecidos fetais deste estudo estão presentes em vários países. No entanto, as amostras identificadas no trabalho apresentado aqui não possuem grande homologia com as amostras isoladas da Alemanha (AY684866.1; AY684869.1; AY684872.1), conforme mostrado na árvore filogenética.

Com relação a amostras brasileiras contidas no GenBank não foi possível fazer uma correlação com as amostras apresentadas neste estudo, pois as sequências brasileiras amplificadas e sequenciadas derivam de outro alvo genômico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com a técnica de *nested-PCR* foi possível detectar o material genético do PVS1 em órgãos e líquido estomacal de fetos, porém a frequência foi baixa;

- Em amostras de útero, ovário e fluido folicular ovariano de fêmeas descartadas, o material genético do PVS1 foi diagnosticado através da *nested-PCR*, no entanto a frequência foi baixa;

- Avaliações histopatológicas foram realizadas nos órgãos dos seis fetos que resultaram positivos para PVS1 pela técnica de *nested-PCR*, e lesões microscópicas discretas foram encontradas em tecidos como pulmão, fígado, rim e medula do feto. Com isso conclui-se que a presença do vírus no órgão não cursa, necessariamente, com lesão tecidual.

- Da avaliação histológica dos órgãos reprodutivos das porcas, foi alta a ocorrência de lesões inflamatórias no endométrio. Verificou-se, também, que a presença do PVS1 nos tecidos reprodutivos não prejudicou o funcionamento dos ovários;

- A *nested-PCR* com controle interno de amplificação para o PVS1 foi padronizada e pode ser implantada nos testes diagnósticos dando mais confiabilidade nos resultados;

- A técnica de imunohistoquímica para o diagnóstico do PVS1 foi padronizada em tecido fetal, porém para diagnóstico recomenda-se utilizar a técnica de *nested-PCR* por ser mais sensível. Sugere-se que a IHQ possa ser utilizada para diagnóstico de outros agentes virais e não para o PVS1.

- Padronizou-se um teste de PCR para diagnóstico do PVS4. Amostras de órgãos reprodutivos de porcas descartadas resultaram positivas para o novo parvovírus suíno. Sendo assim, os resultados desta pesquisa são úteis e estão disponíveis para pesquisar a distribuição do vírus no país e também sua patogenicidade. Pesquisas sobre a importância do PVS4 e quais lesões ou perdas, se existentes para o suíno devem ser investigadas.

- Amostras de DNA de tecidos fetais foram clonadas com sucesso. Objetiva-se realizar clonagem de mais amostras positivas de DNA para o PVS1.

- Fragmentos amplificados de PVS1 isolado a partir de amostras obtidas durante o estudo foram sequenciados e analisados com amostras depositadas no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). Observou-se que os isolados do trabalho apresentado aqui foram similares aos de diversos países, porém não se comparou com amostras brasileiras por serem alvos genômicos distintos. Futuras pesquisas vão ser realizadas para o isolamento de mais amostras de PVS1 e sequenciamento de todo o genoma viral.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam baixa frequência do PVS1 nos rebanhos analisados, bem como nos órgãos reprodutivos de porcas descartadas, considerando baixo o envolvimento do PVS1 nas falhas reprodutivas. Além disso, as técnicas padronizadas podem ser incorporadas na rotina de diagnóstico de PVS1 e PVS4.

ANEXOS

ANEXO - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PRODUTORES DE SUÍNOS PARA SELEÇÃO DOS REBANHOS PARA A REALIZAÇÃO DO PROJETO.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SEG - Sistema Embrapa de Gestão

Índices reprodutivos da granja nos últimos 6 meses considerando objetivo e momento de interferência			
Problemas na gestação	Objetivo	Nível de interferência	Situação da granja
Retorno ao cio (Total)- %	10	15	
Retorno regular - %	6	8	
Retorno irregular - %	3	5	
Negativo (teste prenhez) %	3	5	
Aborto %	2	4	
Falsa gestação - %	1	3	
Natimorto - %	7	10	
Mumificado - %	3	5	

ANEXO – MEIOS E SOLUÇÕES

DNA

TAMPÃO DE LISE 2 X

- Para 100 mL, misturar:
- 4 mL de NaCl 5 M
- 10 mL de Tris 1 M pH 7,5
- 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0
- 5 mL de SDS 20%
- 77 mL de água ultra pura estéril
- Estocar temperatura ambiente.

NaCl 5 M

- 116,90 g de NaCl
- 380 mL de água ultra pura
- Agitar com barra magnética até entrar em solução
- Completar com água ultra pura até 400 mL
- Autoclavar
- Armazenar a temperatura ambiente.

TRIS 1 M Ph 7,5

- Tris 1 M pH 7,5
- 48,44 g de Tris Base
- 350 mL de água ultra pura
- Misturar com barra magnética até entrar em solução.
- Ajustar pH para 7,5 com HCl concentrado (de 28 a 30 mL)
- Completar volume até 400 mL com água ultra pura
- Autoclavar 30 minutos a 121°C
- Estocar a temperatura ambiente.

EDTA 0,5 M Ph 8,0

- 77,44 g de EDTA 2H₂O
- 300 mL de água ultra pura
- Medir o pH observando que o EDTA não entra em solução até que atinja pH 8,0, por isso, começar a misturar com barra magnética adicionando NaOH 10 N até chegar a pH 8,0
- Completar a solução para 400 mL
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos
- Armazenar a temperatura ambiente.

SDS 20%

- 40 g de SDS
- 150 mL de água ultra pura
- Aquecer em banho-maria 56°C alguns minutos
- Misturar com barra magnética até entrar em solução
- Filtrar em membrana de 0,45 µm
- Armazenar a temperatura ambiente.

PROTEINASE K

- Deve ser ressuspensa em tampão próprio, seguindo normas do fabricante, de modo a apresentar concentração final de 20 µg/µL.

FENOL EQUILIBRADO

- Descongelar 500 g de fenol a 65°C (500 g = 500 mL);
- Adicionar 0,5 g de 8-hidroxyquinoline e misturar;
- Colocar 500 mL de Tris Base 1 M pH 8,0;
- Acrescentar 500 mL da solução de fenol;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Descartar a fase aquosa;
- Colocar o fenol num funil de decantação;
- Adicionar 500 mL de Tris Base 0,1 M;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Medir o pH da fase aquosa, que deve ser maior que 7,5;
- Distribuir o fenol em frascos de 50 mL (25 mL de fenol e 25 mL de Tris 0,1 mL);
- Armazenar a -20°C.

TRIS BASE 1 M PH 8,0

- 121,14 g de Tris Base
- 850 mL de água ultra pura
- Misturar até entrar em solução
- Ajustar o pH 8,0 com HCl concentrado
- Completar a solução para 1000 mL
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos
- Armazenar a temperatura ambiente.

TRIS BASE 0,1 M PH 8,0

- Fazer diluição 1:10 da solução Tris Base pH 8,0 (100 mL de Tris base 1 M e 900 mL de água ultrapura estéril).

ACETATO DE SÓDIO 3 M PH 5,2

- 163,24 g de $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ e 98,40 g de $C_2H_3O_2Na$ anidro
- 350 mL de água ultra pura
- Misturar com barra magnética até entrar em solução
- Ajustar pH com ácido acético glacial (50 mL)
- Completar solução para 400 mL com água ultra pura
- Autoclavar
- Armazenar a temperatura ambiente.

ETANOL 75%

- 75 mL de etanol
- 25 mL de água ultra pura estéril
- Misturar e conservar a $-20^{\circ}C$.

TAMPÃO TE

- 10 mM Tris Base pH 7,5
- 1 mM EDTA 0,5 M pH 8,0

TAMPÃO DE CORRIDA gLB (Gel Loading Buffer)

- 0,025 g de Azul de Bromofenol;
- 0,025 g Xileno Cianol;
- 1,5 g Ficol;
- Água Ultrapura até completar 10 mL;
- Dissolver em banho-maria e armazenar a $4^{\circ}C$.

AGAROSE 1%

- 1 g de agarose;
- 100 mL de TBE 0,5X
- Misturar e aquecer em microndas até a agarose se dissolver
- Após esfriar, adicionar 5 μ L de Brometo de Etídio

TBE 5 X

- 54 g de Tris base;
- 27,5 g de ácido bórico;
- 20 mL de EDTA 0,5M pH 8,0;
- 900 mL de água ultrapura;
- Agitar com barra magnética até entrar em solução;
- Acrescentar água ultrapura com a quantidade necessária para completar 1 litro;
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos;
- Estocar em temperatura ambiente.

TBE 0,5 X

- 900 mL de água destilada;
- 100 mL de TBE 5X estéril.

HISTOPATOLOGIA**FORMALINA 10% TAMPONADA**

- 9 litros de água destilada
- 1 litro de formaldeído
- 65 g de fosfato de sódio dibásico
- 40 g de fosfato de sódio monobásico.

IMUNOHISTOQUÍMICA**PBS** (*Phosphate Buffered Saline*)**Solução estoque** (Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4)

- Fosfato de sódio dibásico (NaHPO₄) 7H₂O: 11,4 g
- Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 2H₂O: 3,3 g ou (NaH₂PO₄) 2O: 2,54 g ou 2,92 g
- Manter a solução estoque refrigerada.

Solução trabalho (Tampão fosfato salino 0,01 M pH 7,2-7,4)

- Solução estoque: 100 mL
- Cloreto de sódio: 8,5 g
- Água destilada: 900 mL

Solução de lavagem: PBS Tween

- Solução trabalho: 1000 mL
- Tween: 500 µL

TBS

- 5,9 g de Tris base;
- 8,7 g NaCl;
- Completar com 1 litro de água destilada (pH 7,6);
- Para TBS 0,05% Tween, somente adicione 0,5 ml de Tween 20 a solução acima.

TRIPSINA

- 10 mg de tripsina;
- 10 mL de TBS;
- Diluir em gelo, armazenar no congelador e aquecer a 37°C na hora de utilizar.

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) 3%

- 3 mL H₂O₂;
- 97 mL de água destilada.

DILUENTE DE SORO

- 100 mL PBS (solução trabalho);
- 0,1 g BSA (albumina bovina);
- 0,5 g azida sódica.

AEC

- Solução estoque: 20 mg de AEC em 2,5 mL de dimetilformamida (manter a 4°C);
- Solução trabalho: 0,1 mL da solução estoque em 1,9 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0;
- Adicionar 20 µl de H₂O₂ 3%, imediatamente antes do uso

{ H₂O₂ 30 volume – 0,1 mL
H₂O destilada – 0,9 mL

HEMATOXILINA DE MAYER

- Hematoxilina: 1 g;
 - Iodato de sódio: 0,2;
 - Alúmen de potássio ou amônia: 50 g;
 - Ácido cítrico: 1 g;
 - Cloral hidratado: 50 g;
 - Água destilada: 1 L;
- Dissolver o alúmen, a hematoxilina, o iodato, o ácido cítrico e por último o cloral. Coloração final vermelho violeta.

HEMATOXILINA DE HARRIS

- Dissolver 1 g de hematoxilina em 10 mL de álcool 100% em um becker.
- Dissolver 20 g de sulfato de alumínio e potássio em 200 mL de água destilada em um erlenmeyer com ajuda de calor (fogão). Adicionar à solução de hematoxilina (fora do fogo). Levar a mistura à fervura rápida, e em seguida, adicionar 0,5 g de óxido de mercúrio. Esfriar em banho-maria 56°C por 5 minutos e em seguida, colocar em água corrente para o resfriamento da solução. Armazenar em frasco âmbar.

TAMPÃO CITRATO pH 6, 10 mM

- Ácido cítrico monohidratado ($H_3C_6H_5O_7H_2O$): 2,1 g;
- Água destilada: 1000 mL;
- Ajustar o pH para 6 com NaOH 2 N. 91

DAB

- 1 mL de *buffer* (provido pelo Kit Dako);
- 1 gota de solução DAB.

CLONAGEM

SOB (*Super Optimal Broth*)

- Para preparar 50 mL:
- 1,0 g de Bacto Tripton;
- 0,25 g de Bacto Yeast Extract;
- 0,5 mL de NaCl 1 M (1 mL do 5 M);
- 0,125 mL de KCl 1 M (0,5 mL do 250 mM);
- 40 mL de água ultrapura;
- Dissolver por agitação;
- Ajustar pH para 7,0 com NaOH 5 M;
- Autoclavar por 15 minutos a 121°C.

SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite*)

- Valores para cinco microtubos:
- 4,9 mL de meio SOB;
- 50 µL de magnésio estoque;
- 50 µL de glicose 2 M.

LB (Meio de crescimento bacteriano "Luria – Bertani")

- Para preparar 100 mL:
- 1,0 g de Bacto Tripton;
- 0,5 g de Bacto Yeast Extract;
- 0,5 g de NaCl;
- 1,5 g de Ágar Noble.

SOLUÇÃO I

- 5,0 mL de Glicose 2 M (a concentração final ficará 50 mM);
- 2,5 mL de Tris pH 8 1 M (a concentração final ficará 25 mM);
- 2,0 mL de EDTA pH 8 0,5 M (a concentração final ficará 10 mM);
- 100 mL de água ultrapura;
- Autoclavar 15 minutos a 121°C;
- Conservar a 4°C.

SOLUÇÃO II (PREPARAR NA HORA DO USO)

- NaOH 10 N estéril (a concentração final ficará 0,2 N);
- SDS 10% estéril (concentração final ficará 1%);
- Água ultrapura.

SOLUÇÃO III

- 60 mL de Acetato de Potássio 5 M estéril;
- 11,5 mL de Ácido acético glacial;
- 28,5 mL de Água ultrapura;
- Estocar a 4°C.

FENOL EQUILIBRADO

- Descongelar 500 g de fenol a 65°C (500 g = 500 mL);
- Adicionar 0,5 g de 8-hidroxyquinoline e misturar;
- Colocar 500 mL de Tris Base 1 M pH 8,0;
- Acrescentar 500 mL da solução de fenol;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Descartar a fase aquosa;
- Colocar o fenol num funil de decantação;
- Adicionar 500 mL de Tris Base 0,1 M;
- Misturar delicadamente;
- Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
- Coletar o fenol em um Becker;
- Medir o pH da fase aquosa, que deve ser maior que 7,5;
- Distribuir o fenol em frascos de 50 mL (25 mL de fenol e 25 mL de Tris 0,1 mL);
- Armazenar a -20°C.

ETANOL 75%

- 70 mL de etanol;
- 30 mL de água ultra pura estéril;
- Misturar e conservar a -20°C.

TE COM RNase

- 10 mM Tris Base pH 7,5;
- 1 mM EDTA 0,5 M pH 8,0;
- 1 mg/mL RNase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRISMAT - Associação dos criadores de suínos do Mato Grosso.

<http://www.acrismat.com.br/novo_site/site/estatistica_nacional.php> Acesso em: Janeiro 2010.

ALMOND, G.W., FLOWERS, W.L., BATISTA, L. D'ALLAIRE, S. Diseases of the reproductive system. In: STRAW, B.E.; ZIMMERMAN, J.,J.; D'ALLAIRE, S.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 9.ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, Cap.6, p.113-147, 2006.

ALTHERR, B.; ZIMMERMANN, P.; ETSCHMANN, B.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Detection of porcine circovirus type 2 (pcv2) and porcine parvovirus (ppv) in aborted fetuses. **4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases**, Roma, p. 218-219, 2003.

ANDREWS, C. H. Generic names of viruses of vertebrates. **Virology**, v.40, p.1070-1071, 1970.

BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; SHYNIA, L.T.; DOTO, D.S.; HIROSE, F.H.; SOARES, R.M.; CORTES, A. Diagnóstico diferencial das alterações reprodutivas de origem infecciosa através da reação em cadeia pela polimerase. In: IX Congresso da ABRAVES. Belo Horizonte, 1999. **Anais...** Belo Horizonte, 1999.

BACHMANN, P.A. Vorkommen und verbreitung Von Picodna (Parvo) - virus beim chwein. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 16, p. 341, 1969.

BARLOW, A. A guide to the investigation of porcine abortion/stillbirth. In **Practice**, v. 20, p. 559-564, 1998.

BERGERON, J.; MENEZES, J.; TIJSSEN, P. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of NADL-2 strain of porcine parvovirus. **Virology**, v. 197, p. 86-98, 1993.

BERSANO, J.G.; SCHOTTEN, M.H.S.; KROEFF, S.S.; BASTOS, G.M. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o parvovírus suíno no Estado de São Paulo. In: VI Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, **Anais...** São Paulo, v. 30, p.17, 1993.

BLOMSTRÖM, A.L.; BELÁK, S.; FOSSUM, C.; MCKILLEN, J.; ALLAN, G.; WALLGREN, P.; BERG, M. Detection of a novel porcine bocavirus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. **Virus Research**, v. 146, p. 125–129, 2009.

BRAILOVSKY, C. Research on the rat K virus (*Parvovirus ratti*). I. A method of titration by plaques and its application to the study of the multiplication cycle of the virus. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 110, p. 49-59, 1966.

BROLL, S.; WALDVOGEL, A.S.; ROSSKOPF, M.; CORBOZ, L.; POSPISCHIL, A. The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. **Zentralblatt Veterinärmedizin B**, v. 40, n. 9-10, p. 641-653, 1993.

BROWN, Jr.T.T. Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies virus, and transmissible gastroenteritis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 1033-1036, 1981.

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

CASTRO, A. E. HEUSCHELE, W. P. **Veterinary Diagnostic Virology A Practitioner's Guide**. U.S.A.: Mosby Year Book, p. 232-236, 1992.

CHAPMANN, M.S.; ROSSMANN, M.G. Structure, sequence and function correlations among parvoviruses. **Virology**, v. 194, p. 491-508, 1993.

CITIZENDIUM, The Citizens Compendium

<<http://en.citizendium.org/wiki/Parvovirus>>. Acesso em: Abril 2010.

COACKEY, W.; SMITH, V. W. Porcine parvovirus in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.48, n.9, p.536, 1972.

CORTEZ, A.; SCARCELLI, E.; SOARES, R.M. Detection of Brucella DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. **Aust Vet J**, v. 79, p. 500-501, 2001.

CRAWFORTH, L.V.; FOLLET, E.A.C; BURDON, M.G.; MCGEOCH, D.J. The DNA of a minute virus of mice. **Journal of General Virology**, v. 4, p. 37, 1969.

CUNNINGHAM, C. H. **A Laboratory Guide in Virology**. 7. ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing Company, p. 48, 1973.

CUTLIP, R.C.; MENGELING, W.L. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of eight-and-ten week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. **American Veterinary Research**, v. 36, p. 1751-1754, 1975.

DUHAMEL, G.E.; BARGAR, T.W.; SCHMITT, B.J.; MOLITOR, T.W.; LU, W. Identification of parvovirus-like virus particles in intestinal crypt epithelial cells of pigs with diarrhea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 96-98, 1991.

DUNNE, H. W. Abortion, stillbirth, fetal death, and infectious infertility. In: Dunne, H. W. **Disease of Swine**. 3.ed. Ames: Iowa States University Press, p.836-868, 1970.

ELIAS, D.; ELIASOVÁ, E.; PAULÍK, S.; PISTL, J. isolation of four strains of porcine parvovirus in Slovak Republic. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 48, p. 85-88, 2004.

FENATI, M.; ARMAROLI, E.; CORRAIN, R.; GUBERTI, V. Indirect estimation of porcine parvovirus maternal immunity decay in free-living wild boar (*Sus scrofa*) piglets by capture-recapture data. **The Veterinary Journal**, v. 180, p. 262-264, 2008.

FENNER, F. BACHMANN, P. A. GIBBS, E. P. J. MURPHY, F. A. STUDDERT, M. J. WHITE, D. O. **Virologia Veterinária**. Zaragoza, Espanha: Acribia, p. 421-427, 1992.

FONI, E.; GUALANDI, G.L. A serological survey of swine parvovirus infection in Italy. **Microbiologica**, v. 12, n. 3, p. 241-245, 1989.

FOX, C.H.; JOHNSON, F.B.; WHITING, J.; ROLLER, P.P. Formaldehyde fixation. **J Histochem Cytochem**, v. 33, p. 845-853, 1985.

FREITAS, E.I.; LEMOS, A.L.; AUGUSTUS, V.M. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 1073-1083, 2006.

FUJISAKI, Y.; MURAKAMI, Y.; SUZUKI, H. Establishment of an attenuated strain of porcine parvovirus by serial passage at low temperature. **National Institute of Animal Health**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1982.

GENOV, I.; SURTMADZHIEV, K.; FODOROV, V.; MERMERSKY, K. Parvoviruses isolated from pigs in Bulgaria. **Veterinaria Sbirka**, v.68, n.6, p.3-6, 1971.

GIVENS, M.D.; GARD, J.A.; STRINGFELLOW, D.A. Relative risks and approaches to biosecurity in the use of embryo technologies in livestock. **Theriogenology**, v. 68, p. 298-307, 2007.

GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, p. 270-285, 2008.

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

GUÉRIN, B.; POZZI, N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. **Theriogenology**, v. 63, p. 556-572, 2005.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. 41: p. 95-98, 1999.

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.

HOHNDATSU, T.; BABA, K.; IDE, S.; TSUCHIMOTO, M.; NAGANO, H.; YAMAGAMI, T.; YAMAGISHI, H.; FUJISAKI, Y.; MATUMOTO, M. Detection of antibodies against porcine parvovirus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Microbiology**, v. 17, p. 11-19, 1988.

HORWITZ M.S. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Org.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott- Raven, p. 2197- 2229, 1996.

HUYSMAN, C.N.; VANLEENGOED, L.A.M.G.; DEJONG, M.C.M.; VANOSTA, A.L.M. Reproductive failure associated with porcine parvovirus in an enzootically infected-pig herd. **Veterinary Record**, v. 131, p. 503-506, 1992.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses.

<<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: Janeiro 2010.

IZUMIDA, A.; FURUKAWA, M.; KUBOTA, M.; TAKUMA, H.; TAWARA, K.; KODAMA, K.; KODA, Y. Establishment of the attenuated strain of porcine parvovirus for the live vaccine and its biological-immunological characteristics. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 48, n. 2, p. 293-303, 1986.

JOHNSON, R. H. Isolation of swine parvovirus isolation in Queensland. **Australian Veterinary Journal**, v.49, n.3, p.157-159, 1973.

- JOHNSON, R. H.; COLLINGS, D. F. Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus. **Veterinary Record**, v.85, p.446, 1969.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary Pathology**, 6. ed. U.S.A.: Williams e Wilkins Companhia, p. 257-263, 1997.
- JOO, H.S.; DONALDSON, C.R.; JOHNSON, R.H. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. **Archives of Virology**, v. 51, p. 123-129, 1976.
- JOO, H.S.; JOHNSON, R.H. Serological response in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. **Australian Veterinarian Journal**, v. 53; p. 550-553, 1977.
- KIM, J.; CHAE, C.A. Comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally co-infected pigs. **Journal of Veterinary diagnostic investigation**, v. 16, p. 45-50, 2004.
- KRESSE, J.I.; TAYLOR, W.D.; STEWART, W.W.; EERNISSE, K.A. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. **Veterinary Microbiology**. v. 10, p. 525-531, 1985.
- KREUZER, H. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2002.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. **MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment**. Brief. Bioinform. v. 5, p. 150-163, 2004.
- LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y.; TSE, H.; FU, C.T.Y.; AU, W.; CHEN, X.; TSOI, H.; TSANG, T.H.F.; CHAN, J.S.Y.; TSANG, D.N.C.; LI, K.S.M.; TSE, C.W.S.; NG, T.; TSANG, O.T.Y.; ZHENG, B.; TAM, S.; CHAN, K.; ZHOU, B.; YUEN, K. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1840-1848, 2008.
- LAWSON, J. R. Infectious infertility of swine. In: Meeting of the Expert Panel of Livestock Infertility, Rome 1961, **Reports...**, p. 67, Rome, 1961.
- LENGHAUS, C.; FORMAN, A.J.; HALE, C.J. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pigs fetuses with porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 418-422, 1978.

LÜ, J.; ZHAO, J.; FANG, L.; HE, Q.; CAO, S.; CHEN, H. A slide latex agglutination test for the rapid detection of antibodies in serum against porcine parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, p. 59-61, 2006.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. McGraw Hill Book Company: New York, p. 260, 1968.

MACINTYRE, N. Unmasking antigens for immunohistochemistry. **Br. J Biomed Sci**, v. 8, p. 190-196, 2001.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTÍNEZ-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, p. 454-456, 2005.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RADSTROM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOOFFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **Int J Food Microbiol**, v. 83(1), p. 39-48, 2003.

MARANGA, L.; RUEDA, P.; ANTONIS, A.F.; VELA, C.; LANGEVELD, J.P.; CASAL, J.I.; CARRONDO, M.J. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 59, p. 45-50, 2002.

MARTINS, R.M.; ROEHE, P.M.; GUIMARÃES, L.J.; BANGEL, E.V., GUIZZAROI, I.I.; BRUCHMAN, H.A.; VIDOR, T. Sorologia de parvovírus suíno em granjas do Estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: Congresso Nacional de Veterinários Especialistas em Suínos, Curitiba, 1984. **Anais...** Curitiba, p. 39, 1984.

MARTÍNEZ, C.; DALSGAARD, K.; LÓPEZ de TURISO, J.A.; CORTÉS, E.; VELA, C.; CASAL, J.I. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. **Vaccine**, v. 10, n. 10, p. 684-690, 1992.

MAYR, A.; GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. Porto Alegre, RS: Sulina, p. 197-220, 1972.

MCKILLEN, J.; HJERTNER, B.; MILLAR, A.; MCNEILLY, F.; BELÁK, S.; ADAIR, B.; ALLAN, G. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 155-165, 2007.
MENGELING, W. L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, n.11, p.2239-2248, 1972.

MENGELING, W.L.; CUTLIP, R.C. 1975. Pathogenesis of *in utero* infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. **Am J Vet Res**, v. 36, p. 1173-1177, 1975.

MENGELING, W.L.; BROWN, T.T.; PAUL, P.S.; GUTEKUNST, D.E. Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. **American Journal of Veterinary Research**, V. 40, p. 204-207, 1979.

MENGELING, W.L. Porcine Parvovirus. In STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (Org.). **Diseases of Swine**. 8.ed. Iowa State University Press: Ames, Cap.8, p. 119-124, 1999.

MENGELING, W.L.; LARGER, K.M.; VORWALD, A.C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. **Animal Reproductive Science**, v. 60-61, p. 199-210, 2000.

MIRANDA, A.C.C.; REIS, R.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.M.G. Avaliação da sensibilidade de linhagens celulares ao parvovirus suíno (PVS). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 250-250, 1992.

MOLITOR, T.W.; ORAVEERAKUL, K.; ZHANG, Q.Q.; CHOI, C.S.; LUDEMANN, L.R. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the 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. (Org.). **Virologia Veterinária**, Santa Maria: UFSM, p. 275-296, 2007.

MOREIRA, F.; SOBESTIANSKY, J.; PILATI, C.; HINSHING, C.; LINHARES, D. C. Avaliação dos aspectos microscópicos dos ovários de matrizes suínas abatidas, oriundas de granjas da microrregião de Rio Verde-GO. In: XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. Goiânia. **Anais...** v. 2, p. 201-202, 2003.

MORENO, A.M.; PAIXÃO, R.; OLIVEIRA JÚNIOR, F.T.T.; GOBI, D.D.; NOVITA, S.M.; COUTINHO, T.A.; BACCARO, M.R. Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento em suínos no Brasil. In: XIII Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos **Anais...** Florianópolis. p. 249-252, 2007.

MORIMOTO, T.; KURIGI, H.; MIURA, Y.; SUJIMORI, T.; FUJISAKI, Y. Isolation of Japanese encephalitis virus and hemagglutinating DNA virus from the brain of stillborn piglets. **National Institute of Animal Health**, v.12, p.127-136, 1972.

MOSCARI, E.; KUDRON, E.; SZALAY, D.; HORVATH, I.; SZABO, L.; TOPLAK, L. Isolation of porcine parvovirus (PPV) from swine herds affected by reproductive failure, and serologic evidence of infection in Hungarian large swine herds. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 31, p. 5-15, 1983.

MUZYCZKA, N.; BERNIS, K.I. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: GRIFFIN, D.M.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**, v.2, 4 ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2327-2359, 2001.

NASH, W.A. Porcine parvovirus survey. **Veterinary record**, v. 126, p. 175-176, 1990.

NEI, M. e KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford Univ. Press, 2000.

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

ORAVAINEN, J.; HEINONEN, M.; TAST, A.; VIROLAINEN, J.V.; PELTONIEMI, O.A.T. High Porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 57-61, 2005.

ORAVEERAKUL, K.; CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 85-91, 1990.

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

PAN, Q.; HE, K.; HUANG, K. 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.

PESCADOR, C.A. Causas infecciosas de abortos e natimortalidade em suínos no Sul do Brasil. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS, Porto Alegre, p. 96-96, 2008.

POGRANICHNIY, R.; LEE, K.; MACHATY, Z. Detection of porcine parvovirus in the follicular fluid of abattoir pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 16, n. 5, p. 244-246, 2008.

PROZESKY, L. et al. Lesions resulting from inoculation of porcine fetuses with porcine parvovirus. **Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 269-274, 1980.

RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, M.E. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p.307-311, 2000.

RASBECH, N. O. A review of the causes of reproductive failure in swines. **British Veterinary Journal**, v.125, p.599-616, 1969.

RITTERBUSCH, G.A.; SÁ ROCHA, C.; SIMON, N.; MORÉS, N.; AMARAL, A.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Baixa presença de circovírus suíno tipo 1 e tipo 2 (PCV1 e PCV2) em ógãos reprodutivos e fluido folicular ovariano de fêmeas descartadas. In: XIV Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos (ABRAVES). **Anais...** Uberlândia, p. 315-316, 2009a.

RITTERBUSCH, G.A.; SÁ ROCHA, C.; SIMON, N.L.; MORÉS, N.; AMARAL, L.A.; CARON, L.; ZANELLA, E.L.; VIANCELLI, A.; CIACCI-ZANELLA, J.R. Presence of Torque Teno Virus (TTV1 and TTV2) DNA in reproductive organs of sows. In: XX National Meeting of Virology. **Virus Reviews & Research**. Brasília, v. 14, p. 143, 2009b.

RIVERA, E.; CONCHA, C.; BRAGANÇA, M.; GUNNARSSON, A.; KARLSSON, K.A. Acute outbreak of porcine parvovirus infection in Mozambique. **Tropical Animal Health and Production**, v. 27, p. 217-220, 1995.

RIVERA, E.; SJÖLAND, L.; KARLSSON, K.A. A solid phase fluorescent immunoassay for the rapid detection of virus antigen or antibodies in fetuses infected with porcine parvovirus. **Archives of Virology**, v. 88, p. 19-26, 1986.

ROBINSON, B.T.; CARTWRIGHT, S.F.; DANSON, D.L. Porcine parvovirus: a serological survey in the United Kingdom January 1984 to January 1985. **Veterinary Record**, v. 117, p. 611-612, 1985.

ROIC, B.; CAJAVEC, S.; TONCIC, J.; MADIC, J.; LIPEJ, Z.; JEMERSIC, L.; LOJKIC, M.; MIHALJEVIC, Z.; CAC, Z.; SOSTARIC, B. Prevalence of antibodies to porcine parvovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, p. 796-799, 2005.

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

RUCKERBAUER, G.M.; DULAC, G.C.; BOULANGER, P. Demonstration of parvovirus in Canadian swine and antigenic relationships with isolates from other countries. **Can J Comp Med**, v. 42(3), p. 278-285, 1978.

RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; VIDAL, D.; HÖFLE, U.; VILLANÚA, D.; GAUSS, C.; SEGALÉS, J.; ALMERÍA, S.; MONTORO, V.; GORTÁZAR, C.

Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance.

Theriogenology, v. 65, p. 731-743, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHI, S-R.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. **J Histochem Cytochem**, v. 45, p. 327-343, 1997.

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

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

SOARES, R.M.; DURIGON, E.L.; BERSANO, J.G.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 191-198, 1999.

SOUKIE, J.M.; ERDMAN, D.D.; EVATT, B.L.; ANDERSON, L.J.; TOROK, T.J.; EL-JAMIL, M.; BARNHART, E.; TEPPER, M.; BURRIL, H.N.; PICKETT, A.M.; MENGELING, W.L. Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate. **Transfusion Complications**. v. 40, p. 708-711, 2000.

STRINGFELLOW, D.A. Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos. In: Stringfellow DA, Seidel SM, eds. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, Illinois: International Embryo Transfer Society; p. 79-84, 1998.

STRECK, F.A. Detecção e caracterização de amostras de parvovírus suíno. **Dissertação de Mestrado**. UFRGS, Porto Alegre, p. 116-116, 2009.

SUZUKI, H.; FUJISAKI, Y. Immunizing effects of inactivated porcine parvovirus vaccine on piglets. **Bulletin of the National Institute of Animal Health**, v. 72, p. 17-23, 1976.

TAYLOR, D.J. **Pig Diseases**. 6. ed. Cambridge: Lennoxton, p. 18-22, 1995.

THACKER, B. J.; GONZALEZ, P. L. Infectious reproductive diseases in swine. **Compendium on 1988**;

THACKER, B.J.; LARSEN, RE.; JOO, HS.; LEMAN, AD.; SWIGUEGUEN, B. The diseases transmissible with artificial insemination. **J Am Vet Med Assoc**, v. 185, p. 511-516, 1984.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice**. *Nuc. Acid. Res.* v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOO, H.L.; SEAMAN, J.T.; LITTLEJOHNS, I.R.; LOVE, R.J. Evaluation of a gel diffusion precipitin test for porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, p. 161-165, 1983.

VAN LEENGOED, L.A.; VOS, J.; GRUYS, E.; RONDHUIS, P.; BRAND, A. Porcine Parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. **Vet Q.**, v. 5(3), p. 131-41. Review. PubMed PMID: 6314634, 1983.

WALDVOGEL, A.S.; BROLL, S.; ROSSKOPF, M.; SCHWYZER M.; POSPISCHIL, A. Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 377-385, 1995.

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

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

WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. **Journal of Virological Methods**, v. 134, p. 257-260, 2006.

WOLF, V.H.G. Pesquisa da presença de parvovírus suíno (PVS) em tecidos de fetos de suínos. **Tese de Doutorado**. Unicamp. Campinas. 2008.

WOLF, V.H.G.; MENOSSE, M.; MOURÃO, G.B.; GATTI, M.S.V. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 509-517, 2008.

WU, F.S.; LI, W.G.; FAN, S.H.; WANG, Y.; TANG, G.F. Construction of the pseudorabies virus transfer vector to express porcine parvovirus VP2 gene. **Chinese Henan Agricultural Sciences**, v. 2, p. 102-104, 2006.

YIGANG, X.U.; YIJING, L.I. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. **Immunology**, v. 124, p. 68-75, 2008.

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