

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTOS E NATIMORTALIDADE EM SUÍNOS  
NO SUL DO BRASIL**

**Caroline Argenta Pescador**

**Porto Alegre  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CAUSAS INFECCIOSAS DE ABORTOS E NATIMORTALIDADE EM SUÍNOS  
NO SUL DO BRASIL**

**Caroline Argenta Pescador**

**Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de concentração  
em Cirurgia, Morfologia e Patologia  
Animal, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul.**

**Orientador: David Driemeier**

**Co-orientador: Luís Gustavo Corbellini**

**Porto Alegre  
2008**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais Ivete Terezinha Argenta Pescador e Clóvis Alberto Pescador (*in memoriam*) que apesar de todas as dificuldades sempre priorizaram a educação de suas duas filhas. Ao meu orientador, professor David Driemeier pelos ensinamentos passados durante estes sete anos de convivência e também pela total liberdade oferecida para realizar este trabalho. Agradeço ao meu Co-orientador, professor Luís Gustavo Corbellini, pelo incentivo de fazer com que eu desse sempre um passo a frente como profissional, buscando sempre algo mais. Agradeço ao professor Fernando Osorio, David Steffen e Judith Galeota da Universidade de Nebraska, Lincoln, (EUA) pela oportunidade de complementar a análise deste trabalho nesta instituição e por terem me recebido tão bem em Nebraska. Não posso deixar de agradecer as técnicas do Centro de Diagnóstico Veterinário de Nebraska, Liping Xie, Jules Russ e Quin pela grande amizade e por todo conhecimento transmitido durante os cinco meses de estudo no Diagnostic Veterinary Center (VDC). Agradeço as técnicas Marília e Ângela do Setor de Patologia Veterinária UFRGS pela imensa ajuda oferecida. Agradeço aos alunos de graduação e pós-graduação do SPV-UFRGS, especialmente ao Paulo Mota Bandarra, Nadia Aline Bobbi Antoniassi, Adriana da Silva Santos e Eduardo Conceição de Oliveira pelo auxílio no andamento do projeto. Agradeço também ao professor David E. Barcellos (UFRGS) e ao médico veterinário Luiz Mezzomo (Sadia) pelos contatos e materiais enviados.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE TABELAS .....  | 5  |
| GLOSSÁRIO .....   | 6  |
| LISTA DE FIGURAS .....  | 7  |
| RESUMO .....  | 8  |
| ABSTRACT .....  | 9  |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 12 |
| 2.1 Influência de patógenos específicos no aborto suíno .....   | 12 |
| 2.2 Procedimentos de necropsia .....  | 13 |
| 2.2.1 Exame do feto e placenta .....  | 13 |
| 2.2.2 Exame de natimortos .....   | 16 |
| Morte pré-parto .....   | 17 |
| Morte intra-parto .....   | 17 |
| Morte pós-parto .....   | 17 |
| 2.3 Exame laboratorial .....  | 19 |
| 2.4 Principais rotas de acesso ao sistema reprodutivo da fêmea suína .....  | 21 |
| 2.5 Causas infecciosas associadas à falhas reprodutivas em suínos .....   | 22 |
| 2.5.1 Agentes virais .....  | 22 |
| Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) .....  | 22 |
| Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS) .....  | 25 |
| Parvovírus suíno (PPV) .....  | 27 |
| Outros agentes virais .....   | 28 |
| 2.5.2 Agentes bacterianos .....   | 29 |
| <i>Leptospira</i> sp. ....  | 29 |
| Outros agentes bacterianos .....  | 30 |
| 3. ARTIGOS .....  | 33 |
| 3.1 Artigo 1: “Diagnostic survey of swine abortion, mummified fetuses and stillborn piglets in Southern Brazil.” .....                              | 34 |
| 3.2 Artigo 2: “Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil.” ..... | 52 |
| .....   | 53 |
| 3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em um feto suíno abortado.” .....                                    | 54 |
| 3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em um feto suíno abortado.” .....                                    | 55 |
| 3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em um feto suíno abortado.” .....                                    | 56 |
| 3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em um feto suíno abortado.” .....                                    | 57 |
| 3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em um feto suíno abortado.” .....                                    | 58 |
| 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....   | 75 |
| 4.1 Levantamento das causas de aborto suíno .....   | 75 |
| 4.2 Co-infecção entre Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e Parvovírus suíno (PPV) em fetos suínos abortados .....                                       | 78 |
| 4.3 CONCLUSÕES .....  | 81 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 82 |

## **LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Estimativa da idade gestacional de fetos suínos.....   | 14 |
| Tabela 2. Características externas do leitão ao nascer e principais alterações macroscópicas à necropsia, relacionadas ao momento da morte (pré-parto, intra-parto e pós-parto). ..... | 18 |
| Tabela 3 Amostras necessárias para o diagnóstico de aborto em suínos. ....   | 20 |
| Tabela 4. Frequência percentual de agentes infecciosos diagnosticados em levantamentos de causas de perdas reprodutivas em suínos. ....  | 31 |

## GLOSSÁRIO

**Aborto/abortamento** – é definido como nascimento/expulsão da leitegada antes do término do período normal (fisiológico) de gestação da fêmea suína. Qualquer leitegada nascida antes do dia 110 de gestação é considerada um aborto quando nenhum dos fetos sobrevive além de 24 horas (Sobestiansky *et al.*, 2007).

**Natimorto** – é o feto que morre após 90 dias de gestação, podendo ser classificado em tipo I: quando a morte ocorre antes do término da gestação (morte pré-parto) e tipo II: quando a morte ocorre durante o parto (morte intra-parto) (Sobestiansky *et al.*, 2007).

**Nested-PCR** – é uma variação da reação em cadeia pela polimerase que envolve dois conjuntos de primers para amplificar um fragmento. O objetivo é melhorar a eficiência da reação. Information about *Nested-PCR* or polymerase chain reaction. Disponível em <[www.pcrstation.com/nested-pcr/](http://www.pcrstation.com/nested-pcr/)>. Acesso em 23 de julho de 2008.

**Slippers** – extensões de tecido cartilaginoso provinda da cápsula decidual que recobre os cascos dos fetos (Carr *et al.*, 1990), podendo ser também denominada de chinelas (Dial *et al.*, 1992).

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Desenho esquemático demonstrando a medição da nuca até a inserção da cauda de um feto suíno.....  | 14 |
| Figura 2. A. Feto suíno. Áreas de hemorragia na pele. B. Língua. Hiperplasia epitelial. C. Placenta. Áreas esbranquiçadas na superfície. D. Vesículas (aréolas) na superfície placentária.....  | 15 |
| Figura 3. Natimortalidade pré, intra e pós-parto em suínos. A. Morte de fetos suínos pré-parto. Fetos mumificados. B. Morte de fetos intra-parto. Extensões de tecido cartilaginoso nos cascos. C. Ausência de tecido cartilaginoso (chinelas). D. Morte de fetos intra-parto. Pulmão de coloração vermelha púrpura sem evidência de aeração. E. Morte de fetos intra-parto. Presença de mecônio (material de coloração amarelada) sobre a pele. F. Morte pós-parto. Pulmão aerado..... | 19 |

## RESUMO

O estudo resultou em dois artigos principais relacionados ao aborto suíno de origem viral e outros dois relatos de caso de aborto suíno de origem bacteriana. O primeiro artigo retrata a análise de 117 casos de aborto durante 1,5 anos. A causa de aborto foi identificada em 25,5% dos casos. Infecção por parvovírus suíno foi observada em 16,2% dos fetos. Aborto bacteriano foi diagnosticado em 5,1% dos casos (6/117), seguido por infecção de PCV2 (3,4%) e associações (2,5%). No segundo artigo, casos de aborto e natimortalidade suína por co-infecção entre circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e parvovírus suíno (PPV) foram descritos, onde sete de 121 (5,78%) fetos suínos abortados apresentavam lesões compatíveis com origem viral e foram positivos pelas técnicas de imunistoquímica e PCR para PCV2. Além disso, três (2,47%) desses sete casos também foram confirmados como co-infectados com PPV através da PCR. Dilatação ventricular, áreas pálidas no miocárdio e edema de mesocólon foram as alterações macroscópicas observadas. Lesões microscópicas incluíram miocardite não supurativa, necrose e fibrose cardíacas, focos de mineralização e corpúsculos de inclusão em cardiomiócitos e pneumonia intersticial mononuclear. O terceiro artigo retrata lesões de pele observadas em um feto suíno abortado devido à infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae*, enfatizando seus aspectos macroscópicos, histopatológicos e microbiológicos. No quarto artigo é descrito um caso de aborto suíno por *Escherichia coli* O157: H7 em que dois fetos analisados apresentavam lesões macroscópicas caracterizadas por líquido e fibrina na cavidade torácica e abdominal e petéquias no pericárdio. Microscopicamente foram observadas broncopneumonia supurativa e pleurite supurativa foram observadas. O teste de imunistoquímica foi positivo para *E. coli* O157: H7.



## ***ABSTRACT***

This study resulted in two main articles on viral swine abortion and two articles describing bacterial swine abortion. The first article 117 cases of swine abortion were analyzed during 1.5 year period. The cause of swine abortion was identified in 25.5% of cases. Parvovirus infection was observed in 16.2% of fetuses. Bacterial infection accounted for 5.1% (6/117) followed by PCV2 infection 3.4% (4/117) and associations 2.5% (3/117). In the second article swine abortion and stillbirth cases by co-infection between porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus was describe in which 7/121 (5.78%) swine fetuses had lesions consistent with viral cause and showed both positive anti-PCV2 immunostaining as well as PCV2-PCR. In samples from 3 (2.47 per cent) of these 7 fetuses, co-infection with PPV was confirmed by *Nested-PCR*. Ventricular dilatation, myocardial pale areas, and mesocolic edema were the gross lesions observed. Microscopic lesions included non-suppurative myocarditis, myocardial necrosis and fibrosis, mineralization foci and intranuclear inclusion bodies in cardiomyocytes, and interstitial mononuclear pneumonia. In the third article describes skin lesions in an aborted swine fetus due to *Erysipelothrix rhusiopathiae* with special emphasis on macroscopic, histopathology and microbiology aspects. In the forth article a case about swine abortion due to *Escherichia coli* O157:H7 is described, in which two fetuses analyzed showed macroscopic lesions characterized by fluid with fibrin exudation in the corporal cavities and petechial hemorrhages in the pericardium. Microscopically, these lesions were characterized by focally-extensive suppurative pleuritis and fibrin-purulent interstitial bronchopneumonia in which were abundant gram-negative rods with morphology consistent with *Escherichia coli*. The immunohistochemistry test was positive for *E. coli* O157:H7.

## 1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma das atividades econômicas mais importantes da Região Sul do Brasil. Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina concentram 43% do rebanho suíno brasileiro e são responsáveis por mais de 83% das exportações de carne suína no país. (IBGE, 2007).

Taxas elevadas de abortos em granjas suínas é uma causa de falhas reprodutivas na suinocultura brasileira. Os abortos diminuem a produtividade do rebanho, principalmente, por diminuir o número de leitões nascidos vivos e por aumentar significativamente o descarte de animais e as taxas de reposição de matrizes. A infecção pelo vírus de Aujeszky em uma granja, por exemplo, pode resultar em perda total do rebanho para o produtor e suspensão de exportações de carne do estado atingido, afetando sobremaneira a economia local.

Aborto suíno é definido como o nascimento/expulsão da leitegada antes do término normal (fisiológico) de gestação da fêmea suína. O período médio normal de gestação é de 114 dias. Qualquer leitegada nascida antes do 110<sup>o</sup> dia de gestação é considerada um aborto quando nenhum dos fetos sobrevive além de 24 horas (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

Muitos agentes infecciosos têm sido incriminados em casos de abortos e falhas reprodutivas em suínos em diversas partes do mundo (NEILL *et al.*, 1985; SADTLER *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 1995; WALDVOGEL *et al.*, 1995, ROSSOW *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1997; SCRUGGS & SORDEN, 2001; FRANTZ *et al.*, 2002; MALDONADO *et al.*, 2005). Alguns têm sido implicados de maneira individual e esporádica, enquanto outros têm sido considerados agentes responsáveis por epidemias de aborto e morte fetal em diversas granjas (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

Um estudo realizado nos Estados Unidos com 824 fetos suínos abortados, durante um período de seis anos, constatou que 22% dos casos foram ocasionados por vírus e 16,5% por agentes bacterianos. Dentre as causas virais, o Enterovírus foi o mais freqüentemente isolado (10,9%), seguido por Parvovírus (4,9%), Reovírus (4,4%), Aujeszky (1%) e Adenovírus (0,8%). Leptospirose foi à infecção bacteriana mais comumente observada, sendo diagnosticada em 9,8% dos casos (KIRKBRIDE *et al.*, 1978). Na Espanha, a análise de 293 fetos suínos abortados identificou 9% de fetos infectados pelo vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Porcina (PRRSV), sendo

este indicado como o principal agente de abortos naquele país (MALDONADO *et al.*, 2005).

Entretanto, o diagnóstico etiológico de abortos é bastante difícil e em geral conclusivo em apenas 30-40% dos casos (STRAW *et al.*, 1999). Não é possível determinar causas de aborto somente através do exame clínico. É necessária a colheita apropriada de material para exames sorológicos, histopatológicos e bacteriológicos, entre outros (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

No Brasil, informações muito limitadas estão disponíveis sobre causas infecciosas de aborto em suínos. Em um trabalho realizado em Porto Alegre, a coleta de amostras de tecidos fetais de duas propriedades com histórico de abortos, retornos ao estro e descargas vulvares revelou o isolamento de *Arcobacter* spp (OLIVEIRA *et al.*, 1997). Um estudo soroepidemiológico realizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento em conjunto com a Embrapa Suínos e Aves indicou ausência de casos de PRRSV no Brasil e uma prevalência inferior a 0,8% na população suína testada (ZANELLA, 2001). Recentemente, Borges *et al.*, (2005), analisaram fatores de risco de mumificação fetal e natimortalidade em quatro rebanhos suínos no Brasil e observaram que quanto maior o tamanho da leitegada, maior foram as perdas fetais por mumificação e natimortalidade.

O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento das causas de aborto em suínos na Região Sul do Brasil através de técnicas de imunodiagnóstico, PCR, exames histopatológicos e testes microbiológicos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Influência de patógenos específicos no aborto suíno

Doenças reprodutivas na suinocultura industrial causam extenso prejuízo econômico em todo o mundo. Em suínos a manifestação clínica de doenças reprodutivas é bastante variável podendo oscilar desde a infecção subclínica à interrupção da gestação. O padrão da doença é largamente influenciado pela fisiologia reprodutiva do suíno e pelo patógeno envolvido (GRESHAM *et al.*, 2003).

Na fêmea suína, a interrupção da gestação pode causar efeitos na fêmea e na leitegada, afetando todo o concepto simultaneamente, resultando em mumificação fetal ou aborto devido à septicemia, toxemia e piroxia (GRESHAM *et al.*, 2003).

O período fetal inicia por volta dos 35 dias de gestação, e neste estágio a fase de ossificação esquelética começa. Antes desse período se o feto morre, mumifica, ou ocorre aborto, muitas vezes há retorno ao cio/estro. O período de imunocompetência fetal inicia a partir de 70 a 75 dias de gestação, podendo os fetos suínos a partir deste período se tornar mais resistentes à infecção (BARLOW, 1998).

Um grande número de agentes infecciosos tem sido associado ao aborto e falhas reprodutivas em suínos e incluem certos tipos de vírus (ex: vírus de Aujeszky, vírus da Influenza suína, vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Porcina (PRRSV), vírus da Peste suína e Adenovírus), agentes bacterianos específicos (ex: *Erysipelothrix rhusiopathie*, *Leptospira pomona*, *Brucella suis*) e protozoários (ex: *Toxoplasma gondii*). Recentemente o circovírus suíno tipo 2 (PCV2), agente etiológico da Síndrome Multissistêmica do Definhamento, foi associado com abortamento tardio em porcas (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

Segundo Wrathall (1971), os agentes infecciosos associados com doença reprodutiva em suínos podem ser classificados em três grupos: o grupo 1 compreende bactérias e fungos comensais ou ambientais e que ocasionalmente são reconhecidos como patógenos oportunistas. Alguns microrganismos como espécies de *Streptococcus* sp. e *Aspergillus* sp. podem produzir severa doença sistêmica na fêmea suína ocasionando rápida perda da gestação, estão incluídos neste grupo. Adicionalmente, bactérias como *Erysipela*, *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp, *Staphylococcus* spp, dentre outras, estão comumente associadas com incidentes esporádicos de falha reprodutiva.

Endometrite supurativa e aborto também pertencem a este grupo; o grupo 2 compreende microorganismos presentes de forma endêmica na maioria de rebanhos suínos como, por exemplo, o Parvovírus porcino (PPV); e o grupo 3: compreende microorganismos que causam severa doença reprodutiva e apresentam significativa importância econômica. Neste grupo estão incluídas enfermidades como PRRS, circovirose suína, doença de Aujeszky e leptospirose. Entretanto, a importância destes vários microorganismos como causa de doença reprodutiva em suínos podem apresentar diversas variações entre laboratórios de todo o mundo (BROLL *et al.*, 1993; MALDONADO *et al.*, 2005).

## 2.2 Procedimentos de necropsia

### 2.2.1 Exame do feto e placenta

Baseia-se inicialmente em um exame externo cuidadoso com o objetivo de averiguar possíveis alterações macroscópicas que possam auxiliar no diagnóstico. Qualquer anormalidade fetal como, por exemplo, fenda palatina, rins policísticos, agenesia ou outra anormalidade visceral deve ser registrada. Todos os fetos suínos incluindo suas placentas devem ser coletados, pesados e medidos da nuca até a inserção da cauda (BARLOW, 1998), pois geralmente a entrada de agentes infecciosos no útero gravídico poderá causar a morte de fetos em diferentes idades gestacionais (Tabela 1). Usando a fórmula abaixo, pode ser calculada a idade gestacional aproximada dos fetos (Figura 1).

|   |
|---|
| <b>Fórmula:</b> Idade gestacional aproximada (dias) = 21 + (3x a medida da nuca até a inserção da cauda em cm). |
|---|



**Figura 1.** Desenho esquemático demonstrando a medição da nuca até a inserção da cauda de um feto suíno.

Fonte: Barlow, 1998. A guide to the investigation of porcine abortion/stillbirth. Farm Animal Practice. In Practice, 559-564.

Tabela 1. Estimativa da idade gestacional de fetos suínos.

| Idade Gestacional (dias) | Medida (cm) | Peso corporal (g) sem placenta. |
|--------------------------|-------------|---------------------------------|
| 34                       | 4           | -                               |
| 40                       | 6           | -                               |
| 52                       | 10          | -                               |
| 61                       | 13          | 100                             |
| 70                       | 16          | 190                             |
| 82                       | 20          | 370                             |
| 91                       | 23          | 557                             |
| 100                      | 26          | 800                             |

Fonte: Barlow, 1998. A guide to the investigation of porcine abortion/stillbirth. Farm Animal Practice. In Practice, 559-564.

É conveniente o envio de fetos suínos abortados refrigerados (não congelados) juntamente com a placenta para serem necropsiados. Rotineiramente pode-se limitar a investigação com a análise de três fetos suínos e todos os mumificados de uma leitegada. Embora os procedimentos de necropsia possam variar entre laboratórios, é importante que os patologistas desenvolvam um protocolo que facilite averiguar a presença de lesões macroscópicas e a coleta apropriada de amostras (HOLLER, 1994). Lesões macroscópicas não são frequentemente observadas em fetos suínos e quando observadas não são específicas de um determinado agente etiológico. Congestão e

hemorragia na pele (Figura 2A) e tecidos, hiperplasia do epitélio da língua (Figura 2B), combinada com a presença de líquidos nas cavidades pleural, pericárdica e cavidade peritoneal são achados comumente observados, mas que não colaboram no diagnóstico (HOLLER, 1994). A placenta também deve ser examinada minuciosamente, pois áreas esbranquiçadas (Figura 2C) (calcificação) comumente presentes em sua superfície, podem ser confundidas com infecção por fungos do gênero *Aspergillus* sp. Adicionalmente, vesículas chamadas de aréolas (Figura 2D) ricas em glicoproteínas, das quais uma está envolvida no transporte de ferro da mãe para o feto, a uteroferrina são frequentemente observadas na superfície corioalantóide não havendo significado patológico algum.

Inflamações específicas também podem manifestar-se na placenta. Casos de placentite necrótica e infiltrado de células mononucleares já foram relatadas em doenças como Aujeszky (pseudorraiva suína) e PRRSV, respectivamente (HSU *et al.*, 1980; LAGER *et al.*, 1996).

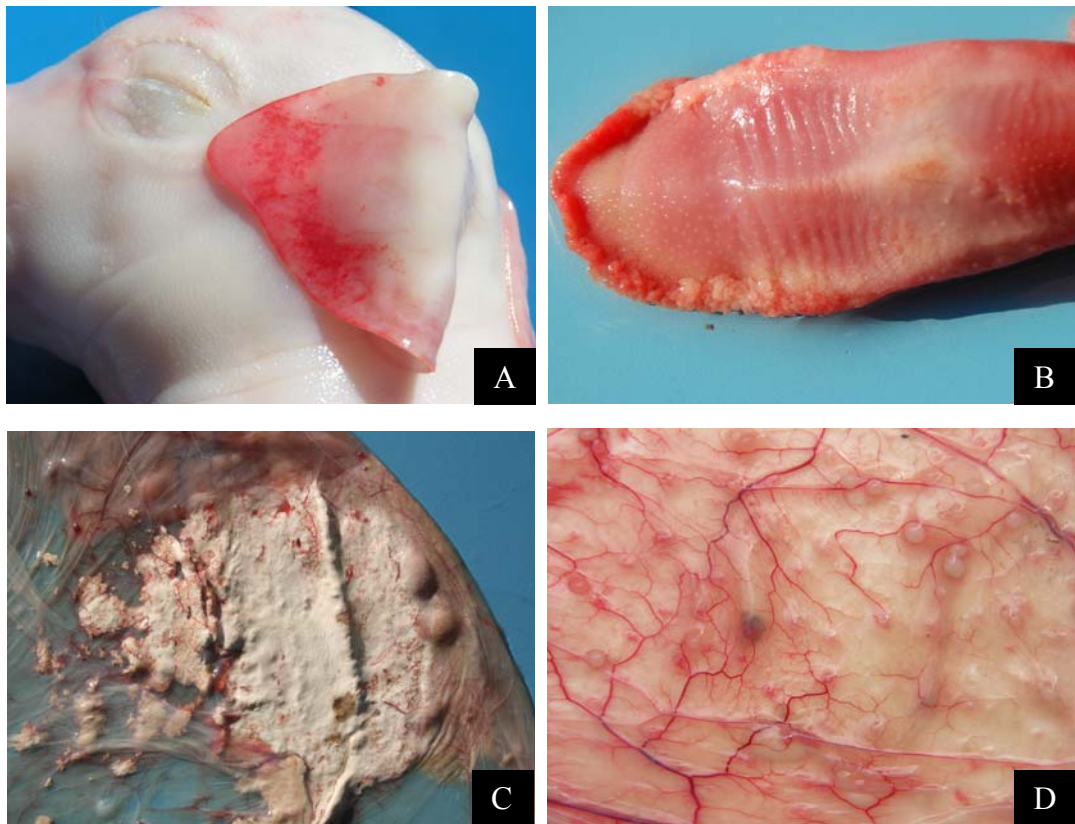


Figura 2. A. Feto suíno. Áreas de hemorragia na pele. B. Língua. Hiperplasia epitelial. C. Placenta. Áreas esbranquiçadas na superfície. D. Vesículas (aréolas) na superfície placentária.

### 2.2.2 Exame de natimortos

Na suinocultura industrial a natimortalidade é a maior causa de perdas de leitões seguida pela mortalidade neonatal, na qual o esmagamento, inanição e leitões fracos são as causas mais freqüentes (DIAL *et al.*, 1992). Leitões natimortos são aqueles que se encontravam vivos no início do parto, mas morreram durante o mesmo. Entretanto, na ausência de alterações autolíticas óbvias, leitões que morrem antes do início do parto, também são denominados pelos suinocultores, como natimortos, o mesmo ocorrendo para leitões que morrem logo após o nascimento (DIAL *et al.*, 1992). Em outras definições os natimortos são classificados em tipo I, quando as mortes ocorrem no pré-parto, e tipo II quando as mortes ocorrem no período intra-parto (ENGLISH *et al.*, 1982).

A mortalidade pré-parto geralmente está associada a causas infecciosas. Por sua vez, a mortalidade intra-parto normalmente resulta de causas não infecciosas (SPRECHER *et al.*, 1974), sendo a anóxia fetal, que ocorre durante o processo de parto, reconhecida como a maior de suas causas (ALONSO-SPILSBURY *et al.*, 2005; MOTA-ROJAS *et al.*, 2005).

Dentre as causas infecciosas a leptospirose e a parvovirose são as doenças mais importantes causadoras de natimortalidade. Epidemias de leptospirose são freqüentemente associadas com o aumento da taxa de natimortos, elevadas taxas de abortos e mortes neonatais (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999). O parvovírus suíno normalmente causa elevada taxa de fetos mumificados. Porém, em leitões infectados, que desenvolvem imunidade durante o terço médio da prenhez podem também demonstrar elevada taxa de natimortos (DIAL *et al.*, 1992). Na Europa e América do Norte a PRRS é uma doença bastante prevalente, causadora de grandes prejuízos, incluindo entre outros, mumificação fetal, natimortalidade e leitões nascidos fracos (DIAL *et al.*, 1992).

Para a implementação de um programa de controle de natimortos em granjas, é necessária a determinação prévia de percentual de leitões mortos antes, durante e logo após o parto (DIAL *et al.*, 1992). Desta forma, a observação de determinadas características externas e internas do leitão natimorto durante o procedimento de necropsia auxilia de forma significativa nesta classificação.



### Morte pré-parto

Freqüentemente estes fetos são expulsos envolvidos em membranas fetais, as quais sofrem descoloração. Pele descolorida, olhos profundos e córneas azuladas (autólise), indicando que o feto morreu a mais de 24 horas podem também ser observadas (CARR *et al.*, 1990). Nesta categoria estão incluídos também fetos mumificados (Figura 3A), os quais são facilmente reconhecidos pela aparência. Macroscopicamente, os órgãos parenquimatosos apresentam-se friáveis e descoloridos; há excessivo volume de líquidos serosanguinolentos nas cavidades corporais e pulmões não flutuam quando colocados em água.

### Morte intra-parto

O natimorto intra-parto apresenta aparência normal ao ser expulso (DIAL *et al.*, 1992). Pode apresentar-se úmido e com cianose, particularmente ao redor da face. Nas extremidades dos membros, os leitões apresentam extensões de tecido cartilaginoso (Figura 3B) nos cascos (“slippers” ou chinelas) que no leitão vivo são perdidos dentro de 15 minutos (Figura 3C) após nascimento (CARR *et al.*, 1990). Edema de tecido subcutâneo, excesso de líquido e congestão das vísceras; pulmões de coloração vermelho púrpura (Figura 3D), firmes e sem evidências de aeração; presença de mecônio sobre a pele (Figura 3E), na laringe, na traquéia e nos brônquios são observados. O estômago pode estar repleto de mecônio e os pulmões não flutuam na água (CARR *et al.*, 1990).

### Morte pós-parto

O leitão apresenta aparência normal ao ser expulso, podendo apresentar batimentos cardíacos e ou movimentos respiratórios (DIAL *et al.*, 1992). Estes leitões podem apresentar as extensões cartilaginosas nos cascos (“slippers” ou chinelas) se morreram antes de 15 minutos do nascimento (CARR *et al.*, 1990). Congestão subcutânea e visceral, pulmões com evidências de aeração (Figura 3F), flutuando na água (WILSON, 1986) são alterações observadas à necropsia. Se o leitão morreu após ter mamado, o estômago pode conter leite (CARR *et al.*, 1990).

Na tabela 2 estão sumarizadas as principais características dos leitões mortos no pré-parto, no intra-parto e no pós-parto.

Tabela 2. Características externas do leitão ao nascer e principais alterações macroscópicas à necropsia, relacionadas ao momento da morte (pré-parto, intra-parto e pós-parto).

| Aspecto examinado       | Morte pré-parto                                | Morte intra-parto (distocia)         | Morte pós-parto                  |
|-------------------------|--|--------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Pele</b>             | Edema, descolorida, presença ou não de mecônio | Pálida, seca, cianótica, com mecônio | Manchada, avermelhada (hematoma) |
| <b>Olhos</b>            | Profundos e córneas azuladas                   | Edematosos, protuberantes            | Normal                           |
| <b>Mecônio</b>          | Tingindo a pele                                | Na boca, narina, traquéia e estômago | -                                |
| <b>Pulmão</b>           | Atelectásico                                   | Atelectásico                         | Aerado                           |
| <b>Patas</b>            | Chinelas                                       | Chinelas                             | Ausência de chinelas             |
| <b>Cordão umbilical</b> | Longo, com variável grau de autólise           | Longo, úmido                         | Curto e seco                     |
| <b>Outros órgãos</b>    | Autólise variável                              | Edema tecidual                       | Autólise variável                |

Fonte: Christensen, 1994. Dead piglets – aging dead piglets as an aid in problem solving. Pig Health and Productivity 161, 21-22.

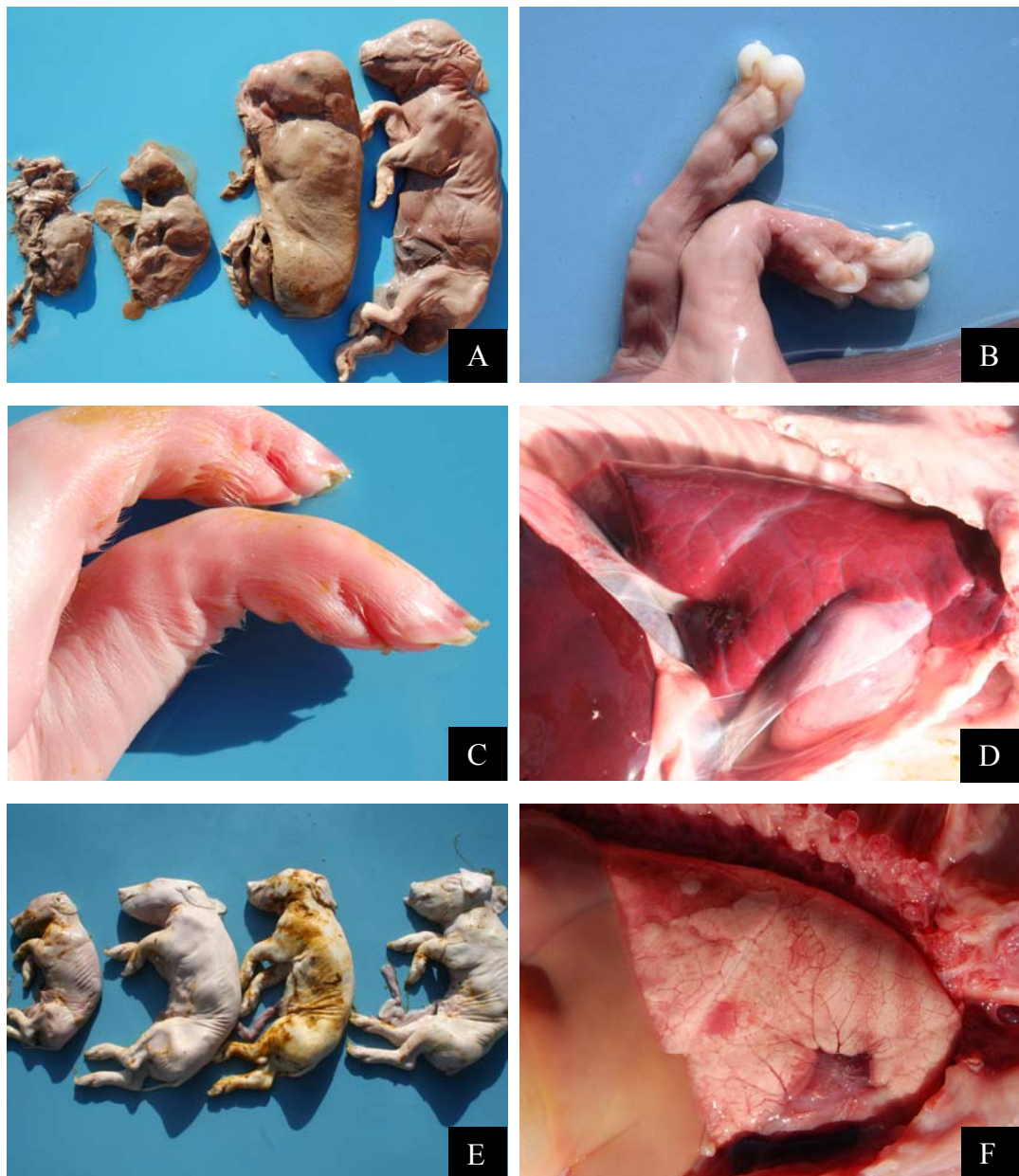


Figura 3. Natimortalidade pré, intra e pós-parto em suínos. A. Morte de fetos suínos pré-parto. Fetos mumificados. B. Morte de fetos intra-parto. Extensões de tecido cartilaginoso nos cascos. C. Ausência de tecido cartilaginoso (chinelas). D. Morte de fetos intra-parto. Pulmão de coloração vermelha púrpura sem evidência de aeração. E. Morte de fetos intra-parto. Presença de mecônio (material de coloração amarelada) sobre a pele. F. Morte pós-parto. Pulmão aerado.

### 2.3 Exame laboratorial

Considerando que o aborto muitas vezes possa ser um problema multifatorial, sugere-se um procedimento sistemático de coleta de material, independente da suspeita inicial ou do diagnóstico presuntivo. Quando a necropsia é realizada no laboratório, o

patologista pode coletar e enviar amostras apropriadas para a histopatologia, virologia e bacteriologia. Quando a necropsia é realizada a campo a coleta e o seu envio tornam-se mais críticos (HOLLER, 1994). O envio do histórico completo da granja incluindo a idade correta dos animais afetados, quantos animais abortaram, o status de vacinação do rebanho, se houve introdução de animais novos na granja, mudança de alimentação, ambiente ou alguma doença prévia diagnosticada no rebanho pode contribuir de forma significativa no diagnóstico. Na tabela 3 são listados os órgãos a serem coletados durante a necropsia e os respectivos exames que podem ser realizados.

Tabela 3 Amostras necessárias para o diagnóstico de aborto em suínos.

| Amostra  | Exames que podem ser realizados                                      |
|--|--|
| <b>Tecido refrigerado</b>  |  |
| Pulmão, fígado, conteúdo do estômago e placenta  | Bacteriologia  |
| Amostra de rim ou pulmão   | IFD para <i>Leptospira</i> sp  |
| Amostra de pulmão, baço, linfonodo inguinal, timo  | PCR para Parvovírus suíno  |
| Soro fetal (líquido do tórax)  | Sorologia para <i>Leptospira</i> sp. e PCR PRRSV e Parvovirus suíno. |
| <b>Tecido fixado em formol 10%</b>   |  |
| Cérebro, fígado, rim, pulmão, coração, músculo esquelético, baço, cólon, timo, linfonodo inguinal e placenta | Histopatologia   |
| Coração, linfonodo, pulmão e timo  | Imunoistoquímica PCV2 e PRRSV  |

PCR: reação de polimerase em cadeia. IFD: imunofluorescência direta.

O conteúdo do estômago e pulmão fetal são os tecidos geralmente escolhidos na rotina de isolamento bacteriano. O fígado também pode ser enviado para cultivo quando o conteúdo do estômago não está disponível (BARLOW, 1998). O diagnóstico de aborto bacteriano geralmente é estabelecido quando há isolamento moderado a puro do agente a partir das amostras enviadas associado à evidência de lesão inflamatória. A maioria dos abortos bacterianos é esporádica. Bactérias como *Streptococcus suis* e *Erysipelothrix* spp apontadas como causa de doença sistêmica podem estar associadas a epidemias de aborto (HOLLER, 1994).

Fetos suínos tornam-se imunocompetentes a partir dos 70 dias de idade gestacional. Uma vez em que não há transferência de anticorpos maternos para os fetos suínos, devido ao tipo de placentação (epiteliocorial), a presença de títulos no fluido fetal geralmente tende a ser mais significativa que a presença de títulos observados no

soro sangüíneo da fêmea suína. Testes sorológicos como inibição da hemaglutinação (HI) para a detecção do parvovírus suíno ou o teste de microaglutinação (MAT) para detecção de *Leptospira* sp. podem ser realizados caso seja indicado (BARLOW, 1998).

Os exames histopatológicos de tecidos fetais usualmente não apresentam lesões microscópicas significativas. Entretanto, ocasionalmente lesões inflamatórias focais ou pneumonia podem ser observadas sugerindo um processo infeccioso. A ausência de lesões histológicas não elimina a possibilidade de estabelecer o diagnóstico etiológico. Lesões macroscópicas e microscópicas significativas podem ser prejudicadas pela autólise tecidual (HOLLER, 1994).

#### **2.4 Principais rotas de acesso ao sistema reprodutivo da fêmea suína**

Numerosos vírus e bactérias podem causar falhas reprodutivas na fêmea suína (VANNIER, 1999), tendo duas rotas de infecção principais. A primeira, via trato genital através de uma forma ascendente de infecção, na qual os agentes infecciosos são introduzidos no útero através da vagina durante o estro ou parto. A segunda forma ocorre pela corrente sangüínea, sendo que os agentes infecciosos atingem o concepto após episódios de viremia e ou bacteremia (VANNIER, 1999).

Septicemia ocorre quando uma grande quantidade de microrganismos invade a corrente sangüínea e geralmente é acompanhada por toxemia e febre. A forma pela qual a gestação é afetada depende do estágio de desenvolvimento fetal bem como da quantidade e fatores de virulência do agente infeccioso presente (WRATHALL, 1975). Os efeitos da toxemia são proporcionais ao número de toxinas envolvidas no processo. A febre é o terceiro e maior efeito sistêmico usualmente associado com viremia, septicemia e toxemia o qual pode contribuir também para o aborto da fêmea gestante (MUIRHEAD *et al.*, 1997).

O aborto freqüentemente ocorre devido à toxemias, as quais podem interferir no controle endócrino e ou causar danos ao tecido endometrial uterino. Do mesmo modo, o efeito sistêmico e a febre, presentes nos casos de infecções agudas, podem também originar falha maternal com o subsequente abortamento dos fetos. Se ocorrer o desenvolvimento de placentite, em resposta a um processo infeccioso o processo inflamatório irá causar a liberação de prostaglandinas F2 $\alpha$ , que por sua vez irão atuar sobre os ovários e causar a regressão dos corpos lúteos. Estes são essenciais para a

manutenção da gestação em suínos, pois são as estruturas ovarianas responsáveis pela secreção de altos níveis de progesterona (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

A progesterona é o hormônio esteróide indispensável para a nutrição dos embriões, durante os estágios iniciais de desenvolvimento e para o controle endócrino da gestação, isto é, manutenção da inatividade do miométrio uterino e retroalimentação negativa na secreção hormonal oriunda do hipotálamo e hipófise. Enquanto persistirem altos níveis de progesterona os eventos fisiológicos da parição não serão iniciados (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

## **2.5 Causas infecciosas associadas à falhas reprodutivas em suínos**

O sucesso da produção de suínos depende em parte da prevenção de doenças infecciosas que afetam a performance reprodutiva (MENGELING *et al.*, 2000). Um grande número de vírus e bactérias tem sido apontado como causa de falhas reprodutivas sendo capaz de causar doença clínica na fêmea suína adulta ou atravessar a barreira placentária e infectar o concepto suíno.

### 2.5.1 Agentes virais

#### Circovírus suíno tipo 2 (PCV2)

A circovirose suína, enfermidade reconhecida apenas recentemente, foi descrita na Alemanha, Reino Unido, Canadá, Nova Zelândia, Estados Unidos (KIUPEL *et al.*, 1998), Dinamarca, Irlanda do Norte (ALLAN *et al.*, 1999), Grécia (SAOULIDIS *et al.*, 2002), Tailândia (KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA *et al.*, 2002), Espanha (SEGALÉS *et al.*, 1997), França (MADEC *et al.*, 2000), Hungria (MOLNÁR *et al.*, 2002), Coréia (CHOI *et al.*, 2000), Japão (ONUKI *et al.*, 1999), México (TRUJANO *et al.*, 2001), Argentina (SARRADEL *et al.*, 2002) e no Brasil (ZANELLA *et al.*, 2003, FRANÇA, 2004, CORRÊA *et al.* 2006).

A primeira doença associada a infecção pelo PCV2 foi a síndrome do definhamento multissistêmico suíno (SDMSD) (HAEDING *et al.*, 1997). Devido ao fato de que a terminologia SDSM descrevia somente uma porção de doenças associadas

ao PCV2 em 2002 foi proposto a retirada do termo SDSMD sendo inserido outra terminologia denominada doença da circovirose suína (PCVD) (ALLAN *et al.*, 2002). No Norte da America foi determinado que qualquer termo novo atribuído em conexão com PCV2 deveria incluir a palavra associado, o que levou a introdução do termo doenças associadas a circovirose suína (PCVAD). O PCVAD inclui no presente momento infecções sistêmicas, PCV2 associado à pneumonia, PCV2 associado a enterite, PCV2 associado a problemas reprodutivos e PCV2 associado a síndrome de dermatite e nefropatia (OPRIESSING *et al.*, 2007). Recentemente um novo vírus denominado torque teno virus (TTV) tem sido correlacionado ao PCV2 (KRAKOWKA *et al.*, 2008; MARTIN-VALLS *et al.*, 2008).

O envolvimento do PCV2 na gênese das falhas reprodutivas em suínos tem causado interesse considerável, embora esse tipo de ocorrência não seja freqüente em surtos de SDMSD. No Canadá (WEST *et al.*, 1999, O'CONNOR *et al.*, 2001), nos Estados Unidos (EUA) e Oeste da Europa (JANKE 2000, OHLINGER *et al.*, 2000), há trabalhos que associam a falha reprodutiva em porcos ao PCV2, reportando aborto, mumificação fetal e de neonatos com quantidade variável de antígeno de PCV2 em tecidos e em lesões cardíacas (JOLIE *et al.*, 2000). Recentemente, foram realizados estudos retrospectivos em tecidos do sistema reprodutor de suínos, coletados entre 1995 e 1998, e nenhum antígeno ou ácido nucléico de PCV1 e PCV2 foi detectado pelo PCR ou por imunistoquímica (BOGDAN *et al.*, 2001); concluiu-se que as alterações reprodutivas associadas com PCV2 podem constituir uma recente manifestação clínica da doença e que a transmissão vertical não é o mecanismo primário para a disseminação do vírus.

O tropismo celular do PCV2 parece mudar com a idade dos suínos. Sánchez *et al.* (2003) reportaram que fetos de suínos infectados no útero aos 57, 75 e 92 dias de gestação têm diferentes distribuições do vírus no tecido. Fetos inoculados aos 57 dias tinham elevada quantidade de vírus em cardiomiócitos e, em menor escala, em macrófagos e hepatócitos. Na fase final da gestação ou após o nascimento, o vírus foi encontrado principalmente em macrófagos e era escasso em outros tecidos. Em adição observou-se apenas 5% ou menos de células com PCV2 no núcleo. Em um segundo estudo, linfócitos T foram infectados quando leitões eram inoculados após o nascimento com PCV2 (SÁNCHEZ *et al.*, 2003). Quando fetos suínos foram infetados com PCV2, a distribuição do vírus foi relacionada com tecidos ou células com alta taxa mitótica, semelhante ao que ocorre com cardiomiócitos de fetos (SANCHEZ *et al.*, 2003). Nos

leitões, em geral, o antígeno do PCV2 foi encontrado no citoplasma de monócitos; macrófagos e de outras células apresentadoras de antígeno, como células Kupffer e células dendríticas, porém raramente no núcleo destas células (ROSELL *et al.*, 1999, GILPIN *et al.*, 2001, CHIANINI *et al.*, 2003, GILPIN *et al.*, 2003, VINCENT *et al.*, 2003). Diante disso, alguns autores sugeriram que a propriedade fagocitária dos macrófagos é responsável pela presença do vírus em seu citoplasma e que as células monocíticas-macrofágicas não são as que suportam a replicação de PCV2 (GILPIN *et al.*, 2003).

A patogênese da ocorrência natural de SDMSD em animais adultos é altamente especulativa no presente momento. Alguns experimentos têm sugerido que a infecção intra-uterina, no momento do cruzamento, deve ter um papel importante no desenvolvimento de desordens reprodutivas no terço final da gestação (CARIOLET *et al.*, 2001b). Em contraste, os mesmos pesquisadores, observaram que o PCV2 não foi capaz de atravessar a barreira placentária quando foi inoculado pelas vias intra-traqueal e intramuscular, em porcas gestantes (CARIOLET *et al.*, 2001a). Abortos têm sido esporadicamente associados com a infecção pelo PCV2, em especial, em granjas recentemente formadas (WEST *et al.*, 1999, SANFORD, 2002). Embora poucos casos naturais de aborto tenham sido analisados, o coração é o órgão onde ocorre a replicação e as lesões degenerativas no feto (WEST *et al.*, 1999). O PCV2 já foi isolado de leitões abortados no Canadá; um dos animais tinha severa miocardite com grande quantidade de antígeno de PCV2 detectado por imunistoquímica no coração, fígado, pulmão, rim e outros órgãos; não foi estabelecida se havia associação com PPV, PRRSV e enterovírus nesse surto (WEST *et al.*, 1999).

Estudos experimentais com PCV2 em fetos também suportam que o coração tem um papel importante na patogênese da infecção viral (PENSAERT *et al.*, 2001). Este fato contrasta com a ocorrência natural de SDMSD, na qual lesões cardíacas, raramente, são observadas e sinais clínicos de insuficiência cardíaca são pouco importantes (SEGALÉS *et al.*, 2004). Infecção subclínica em cachaços tem sido reportada em experimentos e casos naturais (LAROCHELLE *et al.*, 2000, LE TALLEC *et al.*, 2001), mas a sua relevância e implicações clínicas para uma futura minhada também são desconhecidas (SEGALÉS *et al.*, 2004).



## Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS)

A Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRSV) é uma doença causada por um vírus RNA pequeno pertencente à família Arteriviridae (CAVANAGH, 1997). É uma doença que causa um grande impacto econômico na suinocultura mundial, sendo que nos Estados Unidos ela sozinha é responsável pela perda de U\$\$ 560 milhões de dólares anualmente (NEUMAN *et al.*, 2005).

Apesar de a doença estar disseminada em rebanhos suínos em todo o mundo, inclusive na América do Sul (RAMÍREZ *et al.*, 2007), ainda não existe relato da PRRS no Brasil (ZANELLA *et al.*, 2004).

O vírus é altamente infeccioso, sendo baixa a dose do agente necessária para induzir a infecção. A transmissão da doença se dá por contato direto ou indireto com secreções e excreções de animais (MENGELING *et al.*, 2000). Tanto na Europa, como na América do Norte a doença é amplamente difundida, e são raras as granjas não infetadas (SOBESTIANKY *et al.*, 2007).

A patogenicidade do PRRSV está diretamente relacionada à cepa do vírus que podem ser classificadas em dois grupos, de alta e baixa patogenicidade (HALBUR *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1996). O PRRS tem tropismo pelos macrófagos alveolares, os quais desempenham várias funções imunológicas importantes. A destruição de macrófagos alveolares pode induzir a uma pneumonia intersticial e predispor os animais a vários tipos de infecções respiratórias secundárias (GALINA *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1996; VAN REETH *et al.*, 1996).

A capacidade de o vírus cruzar a placenta foi demonstrada após a infecção intranasal de porcas em gestação (TERPSTRA *et al.*, 1991; CHRISTIANSON *et al.*, 1992a). A infecção ocorre com maior frequência quando porcas são infectadas após os 90 dias de gestação (MENGELING *et al.*, 1994), porém fetos mais novos infectados no útero suportam a replicação do vírus (CHRISTIANSON *et al.*, 1992b). A placenta parece apresentar susceptibilidade diferenciada ao PRRSV, de acordo com os estágios da gestação. É provável também que o PRRSV atravesse a placenta carregada por macrófagos infectados, o que é favorecido pela diminuição da barreira sangüínea materno-fetal, durante o final da gestação. A morte dos fetos ocorre provavelmente devido as lesões no cordão umbilical (LAGER *et al.*, 1996).

Os sinais clínicos sistêmicos da PRRS incluem febre, letargia, cianose petequial dérmica temporária, anorexia, agalactia e eventualmente morte, principalmente nos

casos agudos (DONE *et al.*, 1996). Os sinais clínicos reprodutivos na fêmea são partos precoces ou aborto no final da gestação; na mesma leitegada pode-se encontrar tanto leitões normais, como leitões fracos, natimortos, em decomposição ou mumificados (DONE *et al.*, 1996).

Um estudo detalhado de lesões da infecção por PRRSV foi relatado por Halbur *et al.* (1996). De acordo com este estudo, as lesões macroscópicas presentes se restringem aos pulmões e linfonodos; a área afetada dos pulmões varia de 10 a 70%, dependendo da cepa do vírus.

Além de fetos mortos e mumificados, a infecção uterina por PRRSV pode causar o rompimento da placenta fetal da maternal; a placenta fetal pode ser encontrada marrom-esverdeada e com uma consistência adiposa (STOCKHOFE-ZURWIEDEN *et al.*, 1993).

As lesões microscópicas são mais proeminentes nos pulmões e linfonodos. Nos pulmões se observa pneumonia intersticial multifocal caracterizada pelo espessamento dos septos alveolares devido à infiltração de células mononucleares, hipertrofia e hiperplasia de pneumócitos tipo 2, e a presença de exsudato no espaço alveolar, o qual geralmente contém macrófagos, células multinucleadas e dentritos celulares (POL *et al.*, 1991; HALBUR *et al.*, 1996). Fetos abortados têm lesões pulmonares semelhantes às descritas acima (LAGER *et al.*, 1994). O cordão umbilical pode conter hemorragia extensiva no tecido conectivo ao redor das veias ou artérias (LAGER *et al.*, 1996).

As lesões uterinas consistem em endometrite, placentite e separação multifocal da área de contato da placenta materno-fetal; pode ocorrer infiltração multifocal de linfócitos e macrófagos na lâmina própria do endométrio, no tecido conectivo perivascular e na parede vascular (STOCKHOFE-ZUEWIEDEN *et al.*, 1993; LAGER *et al.*, 1996).

O diagnóstico de PRRS é baseado no isolamento do vírus ou através da utilização da técnica de PCR (MENGELING *et al.*, 2000). O vírus pode ser isolado de vários órgãos tais como medula óssea, timo, baço, coração, cérebro, fígado, rim, tonsila e linfonodos de animais adultos, ou fetos abortados. Porém, o vírus é preferencialmente isolado de amostras de soro (VAN ALSTINE *et al.*, 1993). O vírus também pode ser detectado através da transcrição reversa acoplada à reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) (MARDASSI *et al.*, 1994; SUAREZ *et al.*, 1994; VAN WOENSEL *et al.*, 1994), a qual pode ser tão sensível quanto o isolamento viral em cultivo celular.

Antígeno viral pode ser detectado em órgãos fixados em formalina através de métodos imunistoquímicos. (MAGAR *et al.*, 1993; HALBUR *et al.*, 1994; LAROCHELLE *et al.*, 1994; SUR *et al.*, 1996). Métodos sorológicos para a detecção de anticorpos contra o PRRSV incluem imunofluorescência direta (YOON *et al.*, 1992) e soroneutralização viral (YOON *et al.*, 1994).

A vacinação de animais parece proteger contra o desafio com a mesma cepa do vírus, mas não contra o isolado (LAGER *et al.*, 1995). A vacina também oferece proteção parcial contra problemas reprodutivos (abortos, mumificação fetal e disseminação do vírus pelo sêmen), mas não contra problemas respiratórios (PLANA DURAN *et al.*, 1995; KRITAS *et al.*, 1995). Foi demonstrado que o vírus proveniente da vacina pode atravessar a placenta e infectar os fetos (MENGELING *et al.*, 1996).

#### Parvovírus suíno (PPV)

A parvovirose é uma síndrome de distribuição mundial de alta prevalência, caracterizada por morte embrionária, mumificação, natimortos e leitegadas de tamanho reduzido quando atinge fêmeas não imunes em gestação (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007). Usualmente, a infecção em fetos antes dos 70 dias de gestação leva à morte, enquanto que fetos infectados após este período sobrevivem, eliminando a infecção e desenvolvendo anticorpos contra o vírus (MENGELING *et al.*, 2000; ZEEUW *et al.*, 2007).

Presente em todos os continentes, a parvovirose suína é considerada uma das principais causas infecciosas de problemas reprodutivos na espécie suína (THACKER *et al.*, 1988; DEE, 1995; MENGELING *et al.*, 2000). Um levantamento realizado em 250 casos de aborto suíno em Iowa revelou que 20% eram de origem viral e o parvovírus porcino estava presente em 12% destes casos (HOLTER *et al.*, 1976). No Brasil, inquéritos sorológicos em propriedades cujos animais não eram vacinados apontaram elevada ocorrência de anticorpos anti-PPV indicando que o PPV já está estabelecido no país há pelo menos duas décadas (MARTINS *et al.*, 1984; GOUVÊIA *et al.*, 1984; BERSANO *et al.*, 1993). Recentemente, PPV foi detectado em amostras de tecidos fetais de fêmeas suínas com distúrbios reprodutivos provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás através da PCR (SOARES *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2003). Lesões macroscópicas geralmente não são observadas durante a necropsia

dos fetos infectados por parvovírus suíno. A alteração macroscópica mais tipicamente associada à parvovirose é a mumificação fetal. Os fetos mumificados se apresentam usualmente em diferentes tamanhos, provavelmente devido à difusão lenta da infecção feto a feto (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007). Lesões microscópicas quando presentes são caracterizadas pela presença de células inflamatórias mononucleares associadas a focos de necrose em diversos órgãos fetais (PROZESKY *et al.*, 1980; BROLL *et al.*, 1993).

O PPV pode potencializar infecções pelo Circovírus tipo 2 (PCV2). Infecções experimentais com PPV e PCV2 permitiram uma multiplicação viral mais acentuada em animais infectados com ambos os vírus do que em controles contaminados com cada um deles isoladamente (ELLIS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2003). Adicionalmente, co-infecção entre PCV2 e PPV tem sido observada de forma significativa em casos de SMDS em suínos da Coréia e Cândia (CHOI *et al.*, 2000; ELLIS *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002).

O diagnóstico de infecção pelo parvovírus suínos pode ser realizado mediante a identificação de antígenos virais através da imunofluorescência direta (MENGELING, 1976), teste de hemaglutinação (JOO *et al.*, 1976), hibridização *in situ*, imunistoquímica e PCR (KIM *et al.*, 2004).

#### Outros agentes virais

Agentes virais como o vírus da encefalomiocardite suína (EMC) e pseudorraiva suína também têm sido apontados como causa de falha reprodutiva em suínos (KIRKBRIDE *et al.*, 1978). O vírus da encefalomiocardite (EMC) foi inicialmente relatado como causa de mortalidade em suínos no Panamá em 1958 (MURNAME *et al.*, 1960), sendo após esta data mencionado em vários países (GAINER, 1967; ACLAND & LITTLEJOHNS, 1975; ROEHE *et al.*, 1985; KOENEN *et al.*, 1991). Este vírus causa alta mortalidade em suínos jovens atribuída à miocardite e encefalite podendo ocasionar problemas reprodutivos (JOO *et al.*, 1992). Evidências de transmissão transplacentária do vírus (EMC) em fêmeas suínas prenhas têm sido demonstradas através de infecção natural e experimental (LINKS *et al.*, 1986; LOVE *et al.*, 1986). Um estudo realizado com soro fetal ou líquido torácico de 478 fetos suínos mumificados ou natimortos revelou a presença do vírus da encefalomiocardite em 36,6 % das amostras testadas (KIM *et al.*, 1989). Outro estudo realizado em Minnesota com soro de fetos

suínos abortados revelou uma titulação de 1:128 a 1:4096 para o EMC, sugerindo que o líquido torácico de fetos abortados podem ser utilizados para o diagnóstico deste agente (JOO *et al.*, 1988).

A pseudorraiva suína (Doença de Aujeszky) é uma virose que afeta primariamente a espécie suína caracterizada por sinais clínicos nervosos, respiratórios, alto índice de mortalidade entre leitões não imunes e por graves transtornos reprodutivos em porcas prenhes (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007). Um levantamento de 824 fetos suínos abortados realizados nos EUA durante um período de 6 anos revelou a pseudorraiva suína em 1% dos fetos analisados (KIRKBRIDE *et al.*, 1978). Outro levantamento realizado com 293 amostras de tecidos fetais provenientes da Espanha não foi constatado a doença de Aujeszky nas amostras analisadas (MALDONADO *et al.*, 2005). Adicionalmente um outro estudo sorológico realizado em rebanhos suínos na Espanha apontou uma soropositividade de 73% para Aujeszky (GUTIÉRREZ-MARTÍN *et al.*, 2000). No Brasil a enfermidade foi diagnosticada pela primeira vez em 1912, e já foi identificada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. Nos últimos anos, a infecção foi mais frequentemente relatada em Santa Catarina, o que levou a implementação de um programa de erradicação (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

### 2.5.2 Agentes bacterianos

#### *Leptospira* sp.

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, geralmente tem carácter ocupacional, representando risco para a saúde pública (FARR, 1995; FAINE *et al.*, 1999). *Leptospira interrogans* sorovar *pomona* é o patógeno mais importante do grupo de leptospirosas para o suíno. Entretanto, outros sorovares como *icterohaemorrhagiae*, *grippityphosa*, *canicola* e *bratislava* também têm sido isoladas (BOLIN *et al.*, 1991; WILLIAM *et al.*, 1992).

Em suínos, a leptospirose caracteriza-se pela ocorrência de abortamento no terço final da gestação, repetição de cio, mumificação fetal, natimortalidade, nascimento de leitões fracos, baixo número de leitões nascidos, descarga vulvar e morte embrionária

(ELLIS, 1989). Um estudo realizado em fetos suínos abortados revelou uma prevalência de leptospirose em 9,8% dos casos (KIRKBRIDE *et al.*, 1978). Adicionalmente uma outra investigação de causas de aborto e mumificação fetal revelou o isolamento de *Leptospira interrogans* sorovar *australis* em 91% dos isolados (ELLIS *et al.*, 1986).

O diagnóstico de leptospirose em produtos fetais geralmente é difícil, sendo realizado na maioria das vezes através da técnica de imunofluorescência a partir de amostras de impressões de rim e ou fluído fetal (BOLIN *et al.*, 1991). Outros métodos de diagnósticos utilizados são PCR (KEE *et al.*, 1994; VITALE *et al.*, 2005) e imunistoquímica (SCANZIANI *et al.*, 1991).

#### Outros agentes bacterianos

Agentes bacterianos como *Actinobacillus suis*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix* sp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycobacterium avium*, *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., dentre outras bactérias também tendo sido reladas em casos esporádicos e surtos de aborto em suínos (ELLSWORTH *et al.*, 1979; YANGER *et al.*, 1996; HOFFMANN *et al.*, 2002; MAUCH *et al.*, 2004).

A infecção por *Actinobacillus suis* tem sido associada a casos esporádicos de septicemia e morte de suínos jovens (TAYLOR, 1999; WILSON *et al.*, 2000). Surtos de doença clínica ocorrem com maior frequência em rebanhos com alto status sanitário (MINIATS *et al.*, 1989; SANFORD *et al.*, 1990), possivelmente devido à baixa imunidade deixando que amostras virulentas de *A. suis* expressem seu potencial patogênico. Macroscopicamente os fetos suínos abortados apresentam hemorragias petequiais nos pulmões, rim, coração, fígado, baço, pele e intestino (MAUCH *et al.*, 2004). Microscopicamente, lesões pulmonares caracterizadas por extensas áreas de hemorragia e pneumonia fibrinonecrótica acompanhada com proeminente quantidade de colônias bacterianas são as lesões mais significativas (YANGER *et al.*, 1996).

A erisipela ou ruiva é uma doença de distribuição mundial (PENRITH *et al.*, 2004), de caráter hemorrágico e que usualmente cursa com lesões cutâneas, articulares, cardíacas, septicemias, aborto e mumificação fetal além de outros transtornos reprodutivos. Adicionalmente, baixa fertilidade, caracterizada por aumento na taxa de abortos e natimortos e nascimento de leitegadas pequenas tem sido atribuída à infecção crônica por Erisipela suína (HOFFMANN *et al.*, 2002)

Casos de abortos por *Mycobacterium avium* têm sido relatados em Dakota do Sul (ELLSWORTH *et al.*, 1979) e na Europa (MCERLEAN, 1959).

Na tabela 4 estão sumarizados alguns levantamentos de causas infecciosas de abortos em suínos

Tabela 4. Freqüência percentual de agentes infecciosos diagnosticados em levantamentos de causas de perdas reprodutivas em suínos.

| Referências                    | Bactéria | Vírus |       |      | Fungos | Infecção não determinada |
|--------------------------------|----------|-------|-------|------|--------|--------------------------|
|                                |          | PPV   | PRRSV | PCV2 |        |                          |
| Maldonado <i>et al.</i> , 2005 | -        | -     | 9     | -    | -      | -                        |
| Ritzmann <i>et al.</i> , 2005  | -        | -     | -     | 27,1 | -      | -                        |
| On <i>et al.</i> , 2002        | 41,8%    | -     | -     | -    | -      | -                        |
| Kim <i>et al.</i> , 2004       | -        | -     | -     | 13,1 | -      | -                        |
| Lyoo <i>et al.</i> , 2001      | -        | 8,1   | 31,4  | 46,5 | -      | -                        |
| Thoma <i>et al.</i> , 1997     | 3,6      | -     | -     | -    | -      | -                        |
| Broll <i>et al.</i> , 1993     | 8,2      | 29,2  | -     | -    | -      | 52                       |
| William <i>et al.</i> , 1991   | -        | 33    | -     | -    | -      | -                        |
| Kirkbride <i>et al.</i> , 1978 | 16,8     | 4,9   | -     | -    | 7,0    | 60                       |

## 2.6 Causas não infecciosas de aborto em suínos

Mais de 60% dos abortos em suínos são devidos a causas não infecciosas, onde uma parte importante deve-se aos abortos estacionais que acometem, sobretudo, fêmeas nulíparas e primíparas (SOBESTIANSKY *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm relatado um padrão estacional de infertilidade englobando o intervalo desmame-cio, os retornos pós-cobertura, a taxa de parição e os abortamentos, na fêmea suína. Estes estudos, conduzidos na sua grande maioria no hemisfério norte relatam a tendência da fêmea suína em não manter a gestação no período verão-outono, sendo denominada de “complexo de infertilidade de verão” ou “infertilidade estacional” ou “síndrome de abortamento de outono” (SAO).

A condição de síndrome do abortamento de outono (SAO) pode atingir uma freqüência de até 10% em certos rebanhos. O estágio de gestação em que os abortos ocorrem varia desde 30 até 110 dias de gestação, embora seja um fato bastante comum os fetos abortados estarem com 5-7 semanas de idade. Os fetos não apresentam lesões

histopatológicas específicas e são de tamanho normal (WRATHALL *et al.*, 1986) A combinação de fatores ambientais, nutricionais e de manejo contribuem para a ocorrência da SAO (ALMOND *et al.*, 1985; PELTONIEMI *et al.*, 2000). Ingestão energética deficiente e/ou falha em manter temperaturas ambientais no período de gestação, quando as temperaturas externas baixam rápida e drasticamente após um dia com temperatura média parecem estar envolvidos (PRUNIER *et al.*, 1997). Por outro lado, a ocorrência de SAO parece envolver, também, distúrbios na secreção hormonal das fêmeas suínas (LOVE, 1981; WRATHALL *et al.*, 1986). Alguns trabalhos têm demonstrado que a redução gradativa na quantidade de horas-luz diárias que ocorre normalmente no outono está relacionada com níveis mais baixos de progesterona durante a gestação (PRUNIER *et al.*, 1996).

Outras causas de aborto podem ser doenças do aparelho locomotor e deficiências nutricionais. Problemas reprodutivos por deficiências nutricionais agudas estão se tornando muito raros na suinocultura moderna, por outro lado, as contaminações com micotoxinas são cada vez mais freqüentes. A fumonisina, micotoxina produzida pelo fungo *Fusarium* sp., pode produzir aborto subsequente ao consumo de altos níveis dessa toxina (OSWEILER *et al.*, 1990). O mecanismo está relacionado à anóxia fetal devido ao edema pulmonar.

Outros fatores capazes de predispor ou provocar abortamentos incluem: estresse, claudicações, baixo nível de higiene, falta de contato com o cachaço no início da gestação, reação vacinal, substâncias tóxicas, temperaturas extremas, queimaduras solares, velocidade excessiva de ventiladores, baixa iluminações e incompatibilidade genética (SOBESTYANSKY *et al.*, 2007).



### 3. ARTIGOS

3.1 Artigo 1: “Diagnostic survey of swine abortion, mummified fetuses and stillborn piglets in Southern Brazil.”

3.2 Artigo 2: “Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil.”

3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae* em um feto suíno abortado.”

3.4. Artigo 4: “*Escherichia coli* O157: H7 – as a cause of abortion in swine.”

**3.1 Artigo 1: “Diagnostic survey of swine abortion, mummified fetuses and stillborn piglets in Southern Brazil.”**

Caroline Argenta Pescador, Luís Gustavo Corbellini, David Steffen, Bruce Brodersen,  
David Driemeier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Este artigo está em andamento e será submetido à Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

## Abstract

Various infectious agents have been implicated in reproductive failure in sows, resulting in serious economic losses. The objective of this survey was to determine the distribution pattern of infectious abortion in Southern Brazil. A total of 117 cases of swine abortion, mummified and stillborn piglets were submitted from June 2005 to March 2007 to the Laboratory of Veterinary Pathology, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Diagnostic procedures performed on fetuses included necropsy, histology, immunohistochemistry (IHC) for porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), bacteriology, *Nested*-PCR for PPV and direct immunofluorescence test using multivalent *Leptospira* sp. The cause of abortion was identified in 25.5% of cases. Overall, 0.86% (1/117) of the fetuses was considered to be infected with parvovirus (PPV) infection by immunohistochemistry and 14.5% (17/117) by *Nested*-PCR. PCV2 infection was seen in 5.98% (7/117). In samples from 3 (2.56%) of these seven fetuses, co-infection with porcine parvovirus by *Nested*-PCR was also confirmed. Bacterial infection accounted for 5.1% (6/117) of cases. Viral antigens for PRRSV were not detected by immunohistochemistry technique. The results suggest that PPV, PCV2 and bacterial agents could be important infectious pathogens linked to fetal infection leading to mummification and fetal losses in Brazil.

**Key Words:** swine abortion, diagnosis, immunohistochemistry, infectious agents.

---

From the Department of Veterinary Pathology (Pescador, Driemeier) and Department of Preventive Veterinary Medicine (Corbellini), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Av. Bento Gonçalves 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup> Corresponding Author: David Driemeier, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, nº 9090, 91540-000 Porto Alegre RS, Brazil.

<sup>2</sup>From the Department of Veterinary and Biomedical Science (Steffen, Brodersen). Veterinary Diagnostic Center, University of Nebraska – Lincoln, P.O. Box 82646 Fair Street and East Campus Loop, Lincoln, NE 68501-2646, USA.

## Introduction

Reproductive failure in swine is often a difficult diagnostic problem. Work has been done with infections causes of swine abortion in many parts of the world (Broll et al.1993, Kim et al 2004, Ritzmann et al 2005, Maldonado et al 2005) and a variety of infectious agents have been implicated in pregnancy losses in sows, resulting in severe economic impact (Eustis et al 1981, Broll et al 1993, Scruggs & Sorden 2001, Lyoo et al 2001, Brunborg et al 2007). Historic studies suggest that less than half of the incidents of swine abortion, fetal mummification and stillborn are correctly diagnosed (Holter et al 1979). New and improved techniques are gradually improving the diagnosis success and creates a need to periodically review disease prevalence.

Necropsy procedures vary, but as in all necropsies, it is important for practitioners or diagnosticians to develop a consistent protocol that they feel comfortable with and that facilitates their ability to detect gross lesions and collect appropriate samples. Gross lesions are infrequently observed in porcine fetuses and when observed are often not specific (Holler 1994). Histologic examination of fetal tissue is often unrewarded in swine abortion diagnostics, because evidence of inflammation is rare in fetal tissues. Also, absence of histology lesions does not preclude finding etiologic diagnosis (Holler 1994).

Viral or bacterial infections such as porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV), porcine parvovirus (PPV), porcine circovirus type 2 (PCV2), *Leptospira* sp, *Actinobacillus suis*, *Erysipelothrix* sp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp and other abortifacient pathogens are associated with severe reproductive disease in many parts of the world (Holder 1976, Kirkbride et al 1978, Hathaway et al 1982, Waldvogel et al 1995, Mauch et al 2004, Ritzmann et al 2005). Limited information concerning infectious causes of swine abortion exists for Brazil and only few reports of viral and bacterial infection in swine aborted fetuses are available (de Oliveira et al. 1997, Castro et al. 2004).

The purpose of this communication is to report the distribution pattern of swine infectious abortion in Southern Brazil, using modern diagnostic techniques.

## Materials and Methods

A total of 117 aborted fetuses or stillborn piglets from ten pig farms were received to Laboratory of Veterinary Pathology, University Federal of Rio Grande do Sul between July 2005 and March 2007 for diagnostic evaluation. Abortion was defined as the fetal death and expulsion between 35 and 112 days of gestation (William et al 1992), and the unit was the aborted female. Gestational age was estimated by the crown-rump length (William et al., 1992) or determined by insemination records. At necropsy, samples of brain, heart, lung, liver, kidney, skeletal muscle, lymph nodes, thymus, spiral colon and spleen were collected from all cases. Subsequently, these samples were fixed in 10% buffered formalin, processed by routine methods, sectioned at 4 $\mu$ m, mounted and stained with hematoxylin and eosin (HE), and microscopically evaluated. Samples of the lungs, liver and stomach contents of each case were cultured for aerobic bacteria on 5% ovine blood agar and MacConkeys's agar.

Samples from all cases were also screened for the presence of porcine circovirus type 2 (PCV2)<sup>a</sup>, porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)<sup>b</sup> and porcine parvovirus (PPV)<sup>b</sup> by immunohistochemistry and *Nested* polymerase chain reaction (PCR) for PPV. Detection of spirochetes in kidney smears through the use of multivalent antibody conjugated with fluorescein<sup>c</sup> at 1:20 dilution was employed for the diagnosis of *Leptospira* spp. infection (Miller et al. 1989). Immunohistochemistry was performed as previously described by Sorden et al 1999 and with the following modifications. Heart and lung sections were deparaffined, rehydrated, and digested with 0.05% protease XIV<sup>d</sup> in Tris buffered saline (TBS)<sup>e</sup> for 10 minutes at room temperature followed by endogenous peroxidase blocking in power block<sup>f</sup> solution for 10 minutes. A polyclonal rabbit anti-PCV2 antibody and monoclonal mouse anti-PRRSV were used at a dilution of 1:1500 and 1:50 in TBS (001 M, pH 7.4) at room temperature for 30 minutes respectively. After washing in TBS, an Alkaline Phosphatase kit<sup>g</sup> was employed for 15 min as the IHC detection system. The sections were washed in TBS and then BioRed<sup>h</sup> substrate was applied for 15 minutes. Finally, the sections were lightly counterstained with Mayer's haematoxylin for light microscopic examination. Positive controls were included in each immunohistochemical (IHC) procedure. Furthermore, IHC staining was also applied on formalin fixed, paraffin embedded porcine fetuses lung tissue to detect antigens of porcine parvovirus (PPV) using a monoclonal antibody anti-porcine parvovirus<sup>b</sup> at 1:500 dilution. Monoclonal antibody

was coated on the slides and incubated for 30 minutes at room temperature. The final reaction was produced by immersing the sections in a solution of red substrate<sup>h</sup> for 15 minutes (Kim et al 2004). Lung tissue from a mummified porcine fetus infected with PPV previously detected by immunofluorescence technique (FA) served as the positive control.

Total DNA extracted using the Ultraclean Tissue DNA Isolation Kit<sup>i</sup> from 30mg of aborted fetus lung was used as template in nested-PCR analysis. The PCR primers for PPV were the same of those used by Soares et al. (1999). The amplifications were performed in a 50 $\mu$ l reaction mixture containing 3mM MgCl<sub>2</sub> for PPV, 1x PCR buffer, 0.2mM of each dNTP, 20pmol of each primer, and 2.5U of Taq DNA polymerase (Cenbiot enzimas), at temperature of 55°C for PPV (Soares et al. 1999). The PCR reactions were performed in triplicate in automated DNA thermal cycler<sup>s</sup>. Control DNA from the reference strain for PPV, was included in each reaction. PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining. The diagnosis of swine abortion was made, based on the combination of observed histopathological changes, microbiological findings and results from PCR and IHC staining. An abortion was considered as bacterial etiology when a bacterial species was isolated in pure culture from the fetal tissues in association with histopathological lesions characterized primarily by neutrophilic infiltration and necrosis. The criteria used to diagnose viral abortion was polymerase chain reaction assay (PCR) and/or detection of viral antigen by immunohistochemistry. The diagnosis of PCV-2 was based on the presence of multifocal myocarditis associated with a positive result in the immunohistochemistry test. Diagnosis of PPV was made through PCR technique associated or not associated with the presence of mononuclear infiltration in heart and kidney. Abortions were considered to be idiopathic when no lesions or agents were identified. Fetuses that had significant histology lesions, but infectious agents were not isolated or identified were classified as abortion of unknown etiology.

A chi-square test for trend was done to verify if there was an association between conclusive diagnostic and the number of fetuses submitted in each case. For this, diagnostic results (response variables) were categorized in conclusive and indeterminate and the number of fetuses (explanatory variable) was categorized in 1 to  $\geq 4$ .

## Results

From July 2005 to March 2007, samples from 117 aborted swine fetuses were submitted from ten pig farms to the Laboratory of Veterinary Pathology at the Federal University of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Most of porcine fetuses were from State of Santa Catarina. The mean gestational age ( $\pm$ SD) was 103 days ( $\pm$ 20).

Evidence for a specific cause of death was found in 30 out of 117 porcine fetuses (25.5%). One out of 87 cases with no confirmed diagnosis had inflammatory lesions of unknown origin. Overall, 14.5% (17/117) of the fetuses were infected solely with porcine parvovirus (PPV) detected by nested PCR, of which one was confirmed by IHC. Porcine circovirus type 2 accounted for 5.9% (7/117). Additionally, three of those fetuses with PCV2 infection had also co-infection with PPV; overall, 17% (20/117) of the fetuses were infected by a viral agent. Bacterial infection accounted for 5.1% (6/117) of cases. The results of the survey are summarized in Table 2.

Significant gross lesions were found in six aborted swine fetuses which were characterized by uni- or bilaterally ventricular dilatation and myocardial pale areas (Figure 1) in the heart (n = 4); excessive thoracic fluid with fibrin exudation adhered in the lung, liver and colon surfaces (n = 1) and well circumscribed whitish areas in the skin of the periocular region, face, neck, scapula, and hindquarter (n = 1). Microscopic lesions linked to infectious agent were observed in 12,8% (15/117) of the fetuses analyzed, and were characterized by multifocal fibronecrosis and mononuclear cells infiltrations (n = 7) in the heart (Figure 2); suppurative pleuritis and severe, multifocal purulent interstitial bronchopneumonia (n = 4); mild, focal mononuclear dermatitis (n = 1); moderate, multifocal non-suppurative encephalitis (n=1); severe, multifocal mononuclear nephritis (Figure 3) (n = 1), and diffuse pulmonary hemorrhage with colonies of gram-negative coccobacilli bacteria associated with meconium and cellular debris (Figure 4) within the bronchiole (n = 1). PCV2 was detected by IHC in seven out of 117 cases of swine abortion. In samples from three of these fetuses, co infection with PPV was confirmed by Nested-PCR. Both viruses were detected in fetuses at different stages of gestation. Viral antigens of PCV2 were detected by IHC mainly in macrophages and myocytes (Figure 5). Of the 20 fetuses in which PPV DNA was detected, only one was positive on IHC procedures (Figure 5). The antigen was seen in the pulmonary tissue which was characterized by a marked staining in the epithelial cell of the bronchiole (figure 6). There was no evidence of PRRSV in any of the fetuses examined by immunohistochemistry.

There was a linear association between number of submitted fetuses and diagnostic success ( $p = 0.03$ ), in which an increasing odds for conclusive diagnosis was observed when the number of fetuses submitted in each case increased. There was 3.5 more chances for conclusive diagnosis when  $\geq 4$  fetuses were submitted comparing to 1 fetus.

### **Discussion:**

The precise cause of swine abortion was found in 25.5% of cases, which is similar with other swine abortion surveys (Holter et al 1976; Kirkbride et al 1978; Maldonado et al 2005).

The present results indicate that PPV may be an important endemic agent associated a reproductive failure in Southern Brazil. The detection of PPV in mummified and stillborn fetuses was expected, since this infection is routinely identified historically, in our country (Sobestiansky et al 2007). It is well known that the most common consequences of PPV infection are fetal resorption in early gestation and fetal mummification in the midgestation (William et al 1992). Numerous studies have reported no significant histopathological changes in fetuses or piglets infected with PPV (Mengeling 1975; Cultip et al 1975). However, in the present study, inflammatory reaction characterized by non-suppurative myocarditis and mononuclear nephritis were seen in two cases suggesting that the presence of lesion is dependent upon the age of the fetus at the time of infection (Prozesky et al 1980). The present findings indicate that PCR was more sensitive for the detection of PPV than immunohistochemistry in fetal tissue making it useful in the routine diagnostic process. In addition, the easiness of preparation of DNA probes for PCR compared with the generation of monoclonal antibodies, combined with the increasing availability of probes and sequence databases, ensures the expansion of this technique in diagnosis and research (Kim et al 2004).

Recently, PCV2 has been added to the list of virus which may cause transplacental infection in sows (Pensaert et al 2004) and although PCV2 infection of fetuses during pregnancy has been demonstrated experimentally, little is known about PCV2 titer in fetuses under field conditions (Brunborg et al 2007). In our study, high amounts of PCV2 antigen were found in seven out of 117 fetuses with myocardial lesions characterized by multifocal fibronecrosis and infiltrations by mononuclear cells suggesting that myocardium is a target tissue for PCV2 in porcine fetuses (Sanchez et al 2003) and should be collected for routine PCV2 testing. Additionally, porcine



parvovirus was demonstrated in the lungs of stillborn fetuses by PCR in three cases in combination with PCV2. This synergistic action of PCV2 and PPV in aborted swine fetuses had also been demonstrated in Germany (Altherr et al 2003) and has also associated with naturally (Ellis et al 2000) and experimentally (Kennedy et al 2000) SDMSD affected pigs. This co-infection could be expected, since both viruses are endemic in swine population worldwide (Mengeling 1992, Allan et al 2000).

Prevalence studies from other countries have reported that the infection of PCV2 in stillbirths and abortion is less significant than infectious with PPV or PRRS virus (Altherr et al 2003, Kim et al 2004, Lyoo et al 2001, Maldonado et al 2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome was not detected in the fetuses examined in the present study and is consistent with previous reports that evidence of PRRS infection is absent in Brazilian swine herds (Ciacci-Zanella et al 2004). Future studies might utilize PCR for viral detection as PCR was more sensitive than IHC for detection of PPV and may be for PRRS (Maldonado et al 2005).

In the present survey, porcine abortion associated with bacteria was observed in six cases. Many species of bacteria have been associated with reproductive failure in swine herds in the world (Mauch et al 2004, Yaeger 1996, On et al 2002, Hoffmann et al 2002). Most bacterial infections are sporadic and may involve only one sow in a herd (Kirkbride et al 1978). It was not possible to establish the route which the bacteria usually invade the uteri but, it had been suggested that many of the organisms come from the environment and enter the uteri by ascending genital or hematogenous routes (Vannier 1999) leading to severe endometritis, placentitis, and abortion.

A strong association between conclusive diagnostic and the number of fetuses submitted in each case suggest that it is important to send at least three or four porcine fetuses for necropsy investigation as previously described (Long, 1986) in order to increase diagnosis success.

In summary, the data presented indicated that PPV and PCV2 is an important viral infectious agent associated with reproductive disorders leading to mummification and fetal losses in Brazil.

**Acknowledgement:** The senior author wish to thank Steve Braswell, and Judith Galeota for dedicated and expert technical contributions. This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Sources and manufacturers:**

- a. Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Iowa State University, Ames, IA.
- b. VMRD, Inc., Pullman, WA.
- c. Animal and Plant Health Inspection Service. National Veterinary Services Laboratories (NVLS). P.O. Box 844. Ames, Iowa 50010.
- d. Sigma Chemical Co., ST Luis, MO.
- e. Dako Tris Buffer Saline (TBS) solution, Dako Corp., Carpinteria, CA.
- f. Biogenex Corporation
- g. Alkaline phosphatase Kit (Dako Cytomation K0674)
- h. BioPath Laboratories Inc: BP-600-FR
- i. Mobbio Laboratories, Inc.
- j. Eppendorf Mastercycler®, personal, Westbury, NY.

## References

1. Allan GM, Ellis JA. 2000, Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12:3-14.
2. Altherr B, Zimmermann P, Etschmann B et al.: 2003, Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) in aborted fetuses. 4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and re-emerging Pig Diseases. 2003:218-219.
3. Broll S, Waldvogel AS, Roskopf M et al.: 1993, The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. *Zentralbl Veterinarmed B* 40(9-10):641-653.
4. Brunborg IM, Jonassen CM, Moldal T et al.: 2007, Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets. A case study. *J Vet Diagn Invest* 19:368-375.
5. Castro AMMG, Cortez A, Ruiz VLA et al.: 2004, Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. *Vet Rec* 154:728-729.
6. Ciacci-Zanella JR, Trombetta C, Vargas H et al.: 2004, Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. *Ciência Rural*, 34(2):449-455.
7. Cutlip RC, Mengeling WL. 1975, Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of eight-and-ten week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 36:1751-1754.
8. Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, et al.: 2000, Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12:21-27.

9. Eustis SL, Kirbride CA, Gates C et al.: 1981, Porcine abortions associated with Fungi, Actinomycetes, and *Rhodococcus* sp. Vet Pathol 18:608-613.
10. Hathaway SC, Little TWA, Stevens AE. 1982, isolation of *Leptospira interrogans* serovar *muenchen* from sow with a history of abortion. Vet Rec 111:100-102.
11. Hoffmann CW, Bilkei G. 2002, Case study: Chronic Erysipelas of the sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. Reprod Dom Anim 37: 119-120.
12. Holter JA, Andrews JJ. 1979, Evaluation of current diagnostic methods for cases of abortion. Proc Annu Meet Am Assoc Vet Lab Diagn. 22: 85-94.
13. Holler LD. 1994, Diagnosis of swine abortion. Swine Health and Production 2(6)29-31.
14. Holter JA. 1976, Survey of laboratory findings in porcine abortion. Proc 19<sup>th</sup> Ann Meet Am Assoc Vet Lab Diagn. pp. 47-50.
15. Kennedy S, Moffett D, Mcneilly F, et al.: 2000, Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. J Comp Pathol 122:9-24.
16. Kim J, Chae C. 2004, 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 coinfecting pigs. J Vet Diagn Invest 16:45-50.
17. Kirkbride CA, McAdaragh JP. 1978, Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortion in swine. J Am Vet Med Assoc 172(4):480-483.

18. Long GG 1986, Examination of the porcine fetus. Food Animal Practice 2(1): 147-158.
19. Lyoo K, Park Y, Park B. 2001, Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. J Vet Sci 2(3): 201-207.
20. Maldonado J, Segales J, Martinez-Puig D *et al.*: 2005, Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. Vet J 169(3):454-456.
21. Mauch C, Bilkei G. 2004, *Actinobacillus suis*, a potential cause of abortion in gilts and low party sows. Vet J 168:186-187.
22. Mengeling WL, Cutlip RC. 1975, Pathogenesis of in utero infection: Experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. Am J Vet Res 36(8): 1173-1177.
23. Mengeling WL. 1992, Porcine parvovirus. In: Disease of swine, ed. Leman AD, 7<sup>th</sup> ed., pp.299-311. Iowa State University Press, Ames, IA.
24. Miller DA, Wilson MA, Kirkbride CA. 1989, Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates of general diagnostic use. J Vet Diagn Invest. 1:146-149.
25. Oliveira SJ, Baetz AL, Wesley IV *et al.*: 1997, Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. Vet. Microbiol 57:347-354.
26. On SLW, Bille-Hansen V, Jorsal SE *et al.*: 2002, Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. Isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortion in Denmark. Vet Microbiol 85:159-167.

27. Pensaert MB, Sanchez RE, Ladekjaer-Mikkelsen AS, Allan GM. 2004, Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet Microbiol* 98:175-183.
28. Prozesky L, Thomson GR, Gainaru MD et al.: 1980, Lesions resulting from inoculation of porcine fetuses with porcine parvovirus. *J Vet Res* 47:269-274.
29. Ritzmann M, Wilhelm S, Zimmermann P et al.: 2005, [Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112(9):348-351.
30. Sanchez RE, Jr., Meerts P, Nauwynck HJ et al.: 2003, Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. *Vet Microbiol* 95: 15-25.
31. Scruggs DW, Sorden SD. 2001, Proliferative vasculopathy and cutaneous hemorrhages in porcine neonates infected with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Vet Pathol* 38: 339-342.
32. Soares RM, Durigon EL, Bersano JG *et al.*: 1999, Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J Virol Meth* 78:191-198.
33. Sobestiansky J, Barcellos D. *Doenças de Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, 770p, 2007.
34. Sorden SD, Harms PA, Nawagitgul P, et al.: 1999, Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Vet Diagn Invest* 11:528–530.

35. Vannier P. 1999, Infectious causes of abortion in swine. *Reprod Dom Anim* 34: 367-376.
36. Waldvogel AS, Broll S, Rsskopf et al.: 1995, Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization. *Vet Microbiol* 47:377-385.
37. William TC. 1992, Stillbirths, mummies, abortion, and early embryonic death. *Food animal practice* 8(3): 623-639.
38. Yaeger, MJ. 1996, An outbreak of *Actinobacillus suis* septicemia in grow □ finish pigs. *J Vet Diagn Invest* 8:381-383.

Table 2

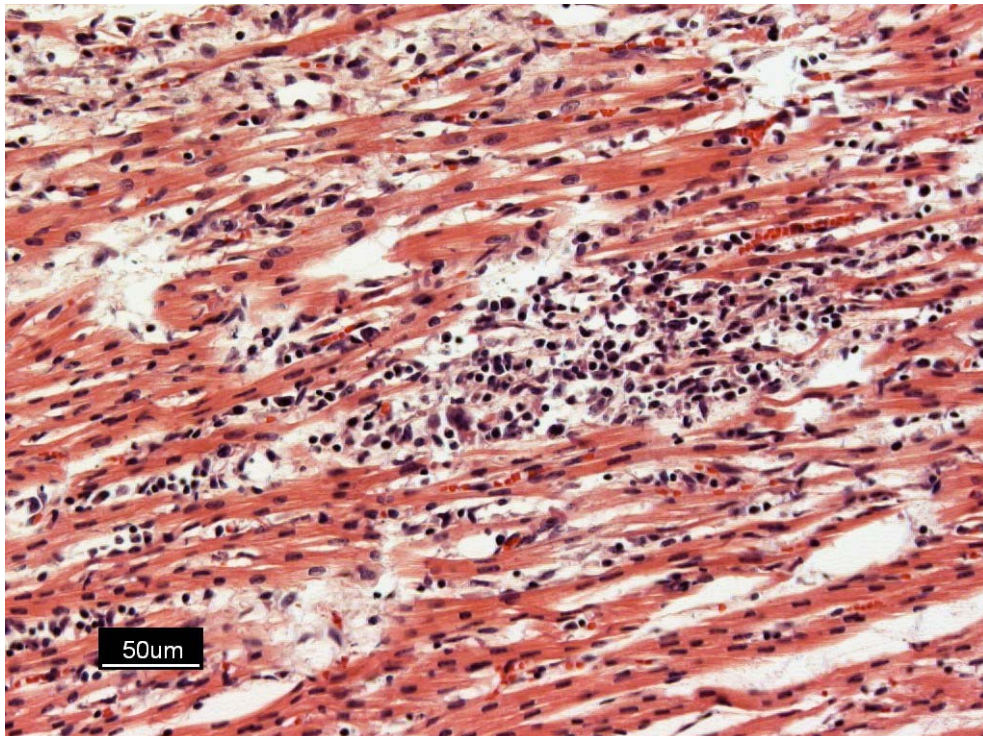
Diagnostic outcomes following the examination of 117 aborted porcine fetuses in Southern Brazil

| Classification             | N <sup>o</sup> of cases | % of total |
|----------------------------|-------------------------|------------|
| 1. Causes determined       |                         |            |
| 1.1 Infectious             |                         |            |
| Viral                      | 21                      |            |
| Porcine parvovirus         | 17                      | 14.52      |
| Porcine circovirus type 2  | 04                      | 3.42       |
| Bacterial                  | 06                      |            |
| <i>Escherichia coli</i>    | 03                      | 2.56       |
| <i>Arcanobacterium</i> sp  | 01                      | 0.86       |
| <i>Actinobacillus suis</i> | 01                      | 0.86       |
| <i>Erysipelothrix</i> sp   | 01                      | 0.86       |
| Association                | 03                      |            |
| PCV2 + PPV                 | 03                      | 2.56       |
| 2. Not determined          |                         |            |
| Unknown                    | 86                      | 73.5       |
| Infectious lesions         | 01                      | 0.86       |
| Total                      | 117                     | 100        |



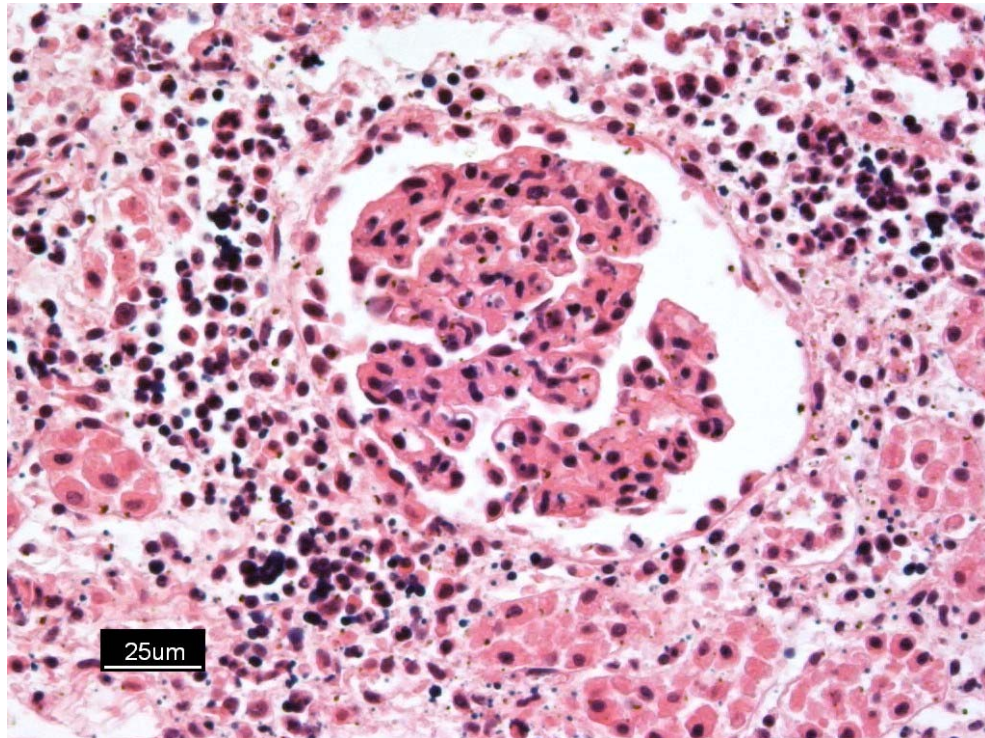
**Figuras**

**Figura 1.** Infecção por PCV2. Feto suíno abortado. Coração. Áreas pálidas no miocárdio.

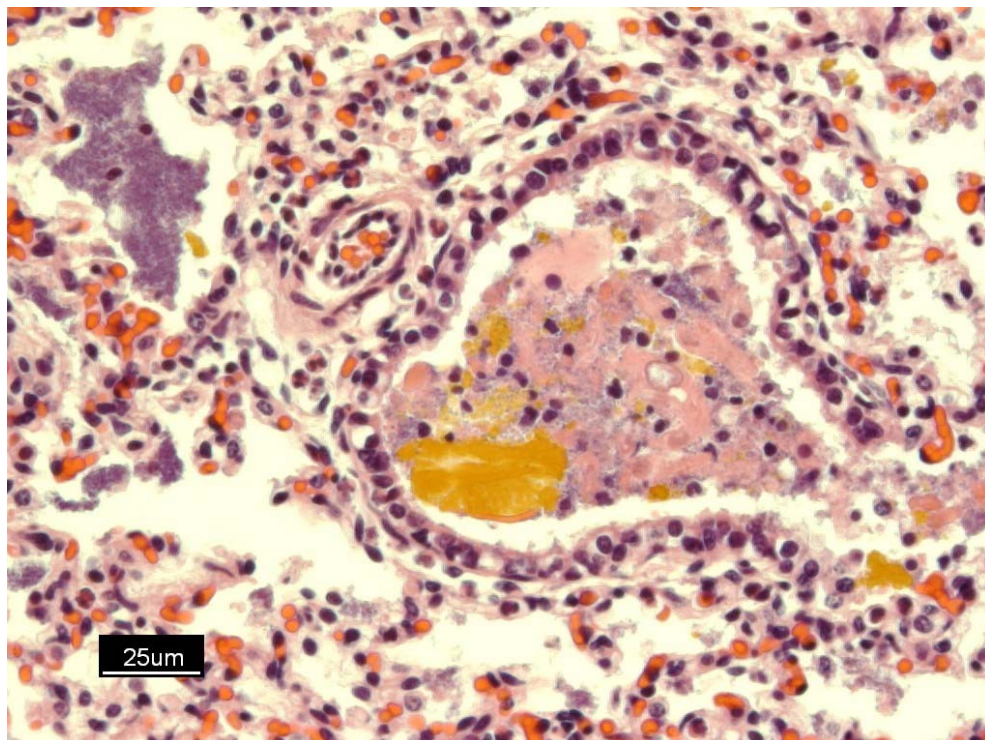


**Figura 2.** Infecção por PCV2. Feto suíno abortado. Coração. Miocardite não supurativa focal moderada. HE, obj. 20x.



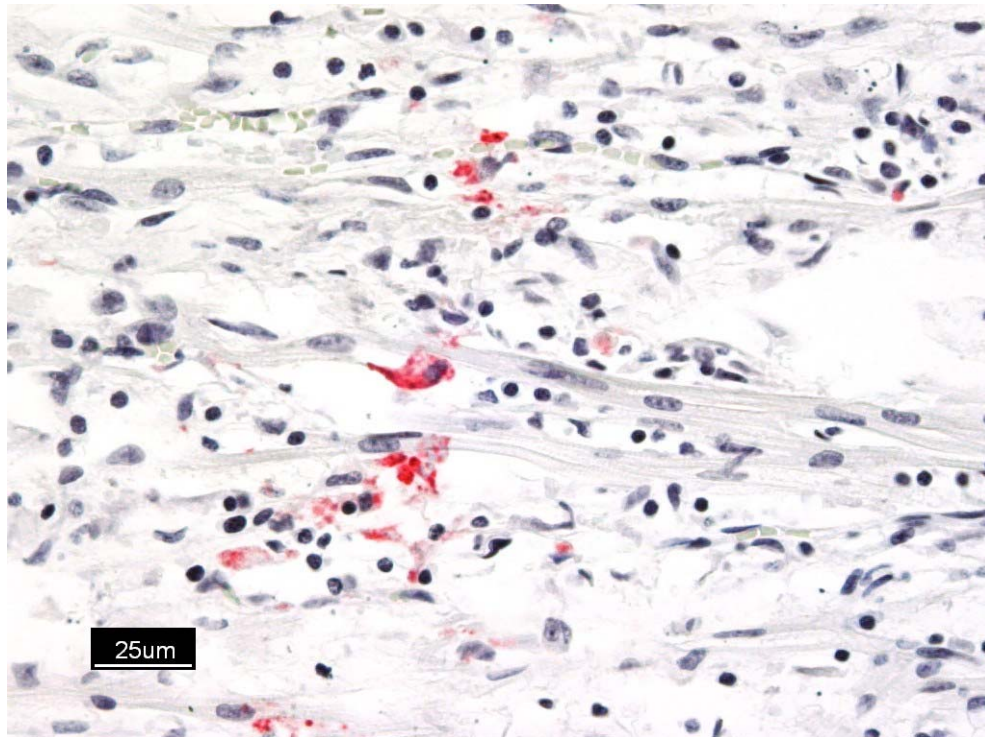


**Figura 3.** Infecção por Parvovírus suíno. Natimorto. Rim, nefrite intersticial mononuclear multifocal moderada.

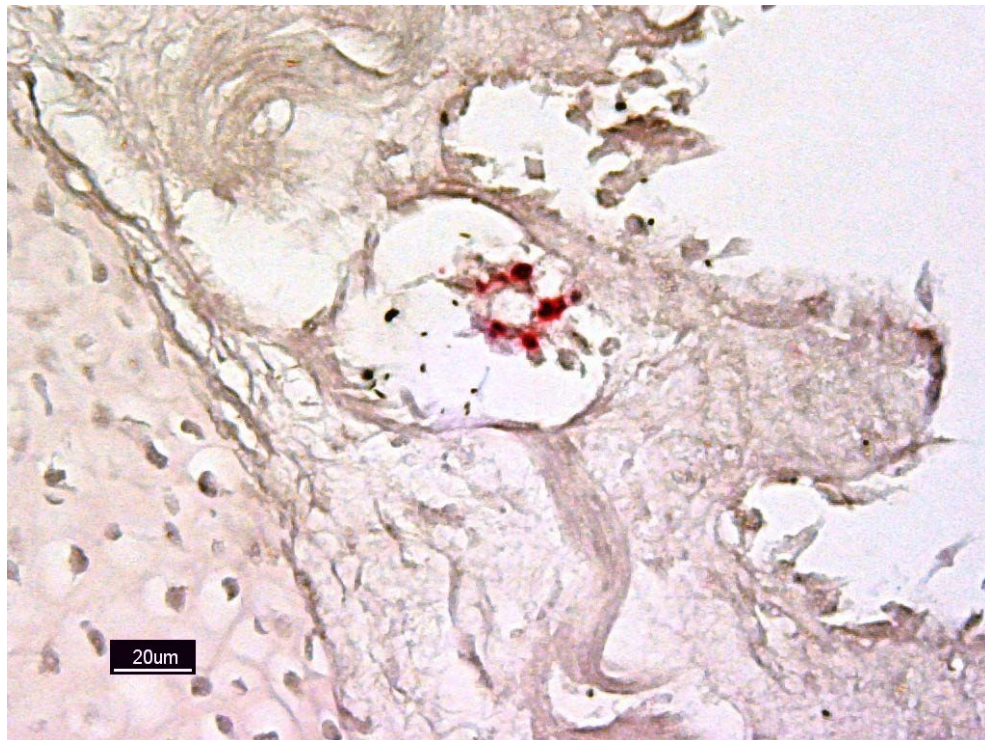


**Figura 4.** Infecção por *Actinobacillus suis*. Feto suíno abortado. Pulmão. Descamação celular e mecônio no interior de brônquio. Há grumos bacterianos no interior de alvéolos. HE, Obj 40x.





**Figura 5.** Infecção pelo PCV2. Feto suíno abortado. Coração. Antígenos virais de PCV2 fortemente marcados em vermelho. Imunoistoquímica, fosfatase alcalina, obj. 20x.



**Figura 6.** Infecção pelo parvovírus suíno. Feto suíno mumificado. Pulmão. Antígenos virais de parvovírus suíno no interior de células epiteliais de brônquios. Imunoistoquímica, fosfatase alcalina, obj. 40x.

**3.2 Artigo 2: “Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil.”**

## Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil<sup>1</sup>

Caroline A. Pescador<sup>2</sup>, Paulo M. Bandarra<sup>2</sup>, Lulza A. Castro<sup>3</sup>, Nadia A.B. Antonias<sup>4</sup>, Ana Paula Ravazzolo<sup>2</sup>, Luciana Sonne<sup>2</sup>, Cláudio E.F. Cruz<sup>2</sup> e David Drtemeyer<sup>2\*</sup>

**ABSTRACT.** Pescador C.A., Bandarra P.M., Castro L.A., Antonias N.A.B., Ravazzolo, A.P., Sonne L. Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2007. **Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(10):425-429. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

Porcine circovirus types 1 and 2 (PCV1, PCV2) and porcine parvovirus (PPV) are widespread in pig populations around the world. Nevertheless, only PCV2 has been associated with different clinical syndromes, thus representing a major problem to the pig industry. The association of cases of swine abortions and stillborns with PCV1 and PCV2 and PPV was studied retrospectively (2005-2007). Additional pathogens were also investigated in lesioned fetuses. The studied litters included stillborn piglets and several mummified fetuses of varied sizes. Ventricular dilatation, myocardial pale areas, and mesocolic edema were the gross lesions. *Escherichia coli* was detected as co-infecting with PCV2 the cases in which mesocolic edema was seen. Microscopic lesions included non-suppurative myocarditis, myocardial necrosis and fibrosis, mineralization foci and intranuclear inclusion bodies in cardiomyocytes, and interstitial mononuclear pneumonia. Samples from 7 (5.78 per cent) of 121 aborted fetuses and stillborn piglets had lesions consistent with a viral cause and showed both positive anti-PCV2 immunostaining as well as PCV2-PCR. In samples from 3 (2.47 per cent) of these 7 fetuses, co-infection with PPV was confirmed by Nested-PCR. Both viruses were detected in fetuses at different stages of gestation. Viral antigens of PCV2 were detected by immunohistochemistry mainly in macrophages and myocytes. PCV1 individually was not detected in any of these affected fetuses, but it was associated with PCV2 and/or PPV in some of them. These findings indicate that PCV2 alone or in association with PPV should be kept in mind when investigating causes of infectious abortion in pigs in Brazil.

INDEX TERMS: Abortion, PCV2, PCV1, PPV, stillborn, swine, Brazil.

**RESUMO.** [Co-infecção por circovírus suíno tipo 2 e parvovírus suíno em fetos abortados e natimortos suínos no Sul do Brasil.] Estudou-se retrospectivamente (2005-2007) a associação de casos de abortos e natimortos suínos com infec-

ções por circovírus suíno (PCV) tipos 1 e 2 e parvovírus suíno (PPV). Outros agentes patogênicos foram pesquisados em amostras de fetos com lesões. O estudo incluiu natimortos e fetos mumificados de tamanhos variados. Dilatação ventricular, áreas pálidas miocárdicas e edema de mesocólon foram as lesões macroscópicas observadas. *Escherichia coli* co-infectou com PCV2 as amostras dos casos com edema de mesocólon. Lesões microscópicas incluíram miocardite não supurativa, necrose e fibrose miocárdicas, focos de mineralização e corpúsculos de inclusão em cardiomiócitos e pneumonia intersticial mononuclear. Entre os 121 fetos suínos abortados ou natimortos analisados, sete (5,78%) tinham lesões compatíveis com origem viral e foram positivos pelas técnicas de imunistoquímica e PCR para PCV2. Além disso,

<sup>1</sup> Received on June 29, 2007.

Accepted for publication on September 6, 2007.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. \*Corresponding author: [davetpat@ufrgs.br](mailto:davetpat@ufrgs.br)

<sup>3</sup> Centro de Biotecnologia, UFRGS, Pós-Doutorado Júnior (PDJ) do CNPq (Proc.155528/2006-8).

<sup>4</sup> Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Coxipó, 78060-900 Cuiabá, MT, Brazil.



três (2,47%) desses sete casos também foram confirmados como co-infectados com PPV através da PCR. Antígenos de PCV2 foram observados principalmente em macrófagos e no interior de miócitos dos fetos suínos abortados e natimortos. PCV2 e PPV foram detectados em diferentes estágios de gestação. PCV1 não foi associado isoladamente com feto ou natimorto afetado, mas estava presente em associação com PCV2 e/ou PPV em alguns desses produtos. Esses achados indicam que a infecção por PCV2, isoladamente ou em associação com PPV, deve ser considerada no diagnóstico de aborto infeccioso suíno no Brasil.

TERMS DE INDEXAÇÃO: Aborto, natimorto, PCV1, PCV2, PPV, suíno, Brasil.

### INTRODUCTION

Porcine circovirus 2 (PCV2) is widespread in pig populations in many parts of the world (Allan & Ellis 2000). Since its association with porcine postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) (Ellis et al. 1998), PCV2 has been linked with many other clinical syndromes in pigs (West et al. 1999, Ellis et al. 2000, Rosell et al. 2000).

Pigs with PMWS are often infected with a variety of other pathogens, including bacteria, viruses, and protozoa, in addition to PCV2. The co-infection by PCV2 and porcine parvovirus (PPV) has been associated with naturally (Ellis et al. 2000) and experimentally PMWS affected pigs (Kennedy et al. 2000, Krakowka et al. 2000), but only sporadically with swine abortion (Altherr et al. 2003). Although PPV is thought to be endemic in pig populations throughout the world (Mengeling 1992), it has only rarely been associated with any disease in pigs other than fetal death (Kresse et al. 1985, Bolt et al. 1997). Most available data indicate that the apparently universal exposure to PPV in pigs was almost exclusively associated with sub-clinical infection and development of immunity (Mengeling 1992). In Brazil, the experimental co-infection PCV2 and PPV was described in SPF (Specific Pathogen Free) pigs (Fernandes et al. 2006). However, in this country, there is limited information concerning infectious causes of swine abortion (Oliveira et al. 1997, Castro et al. 2004).

In addition, although PCV1 was initially considered as a nonpathogenic virus (Allan et al. 1995), it has been detected in pigs affected by wasting disease (LeCann et al. 1997, Ellis et al. 2000). The objectives of this study were to determine the prevalence of PCV1, PCV2, and PPV infections in aborted fetuses and stillborn piglets in Southern Brazil, and to determine the distribution of the PCV2 in their tissues by immunohistochemistry.

### MATERIALS AND METHODS

This study comprised 121 aborted fetuses or stillborn piglets, which were submitted from nine pig farms between July 2005 and March 2007 for diagnostic purposes. At necropsy, samples of brain, heart, lung, liver, kidney, skeletal muscle, lymph nodes, thymus, spiral colon and spleen were collected from all cases. Subsequently, these samples were fixed in 10% buffered formalin, processed by routine methods, sectioned at 4µm, mounted and stained with hematoxylin and eosin

(HE), and microscopically evaluated. Samples of the lungs, liver and stomach contents of each case with microscopic lesions were cultured for aerobic bacteria.

Samples from all cases were also screened for the presence of PCV2 and porcine parvovirus (PPV) by immunohistochemistry and nested polymerase chain reaction (PCR), respectively. Detection of spirochetes in kidney smears through the use of multivalent antibody conjugated with fluorescein (NVL5) at 1:20 dilution was employed for the diagnosis of *Leptospira* spp. infection (Miller et al. 1989) in samples from cases with microscopic lesions. Finally, PCR for detection of PCV1 and PCV2 and immunostaining (IS) procedure against PRRSV were conducted in samples from cases in which microscopic lesions were present.

In the anti-PCV2 IS, the sections were dewaxed in xylene and rehydrated through graded alcohols. Endogenous peroxidase activity was quenched by treating sections with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 minutes. After rinsing in distilled water, the sections were digested with Protease XIV (Sigma Chemical Company, Poole, UK) at a concentration of 0.5mg/ml in TBS for 15 minutes at 37°C. After rinsing in distilled water, they were incubated in 5% milk solution (Molico®) for 20 minutes at room temperature to prevent background labelling. The sections were then incubated in a solution of rabbit anti-PCV2 antiserum, diluted in 1:1000 in TBS, for 1 hour at 37°C. After washing in TBS, an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) kit (Dako, Carpinteria, CA) was employed for 15 min as the IHC detection system. The sections were then washed in TBS for 5 minutes and the reaction "visualized" by applying 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Dako, Carpinteria, CA) for 10 to 15 minutes. Finally, the sections were lightly counterstained with Mayer's haematoxylin for light microscopic examination. Positive controls were included in each immunohistochemical procedure.

Total DNA extracted using the Ultraclean Tissue DNA Isolation Kit (Molbio Laboratories, Inc) from 30mg of aborted fetus lung was used as template in nested-PCR analysis. The PCR primers for PCV1 and PCV2 were described by Kim et al. (2003), and the PPV primers were the same of those used by Soares et al. (1999). The amplifications were performed in a 50µl reaction mixture containing 3mM MgCl<sub>2</sub> for PPV and 1mM for PCV, 1x PCR buffer, 0.2mM of each dNTP, 20pmol of each primer, and 2.5U of Taq DNA polymerase (Cenbrot enzimas), at 55°C (PCV1 and PPV) and 60°C PCV2 (Soares et al. 1999, Kim et al. 2003). The PCR reactions were performed in triplicate in an automated DNA thermal cycler (Eppendorf Mastercycler® personal, Westbury, NY). Control DNA from the reference strain for PPV, PCV1 and PCV2 were included in each reaction. PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel in TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining.

### RESULTS

Of the 121 swine fetuses or stillborn, 7 (5.78%) had lesions characterized by mononuclear inflammation consistent with a viral infection. Of these, 2 cases were positive for PCV2 alone, 2 cases were positive for PCV1 and PCV2 together, and the other 3 cases were positive for both PCV2 and PPV. The litters that were received for postmortem examination included stillborn piglets and several mummified fetuses with sizes varying from 6-26 cm crown-rump length (Fig.1) There was excessive fluid in the thoracic cavities from all the 7 cases, of which, 4 also had lesions characteristic of heart failure, i.e. marked ventricular dilatation and pale areas in the myocardium (Fig.2) Mesocolic edema (Fig.3) was seen in two cases, from which pure cultures of *Escherichia coli* grew (aerobic culture) in samples of lung, liver and stomach contents. Gross

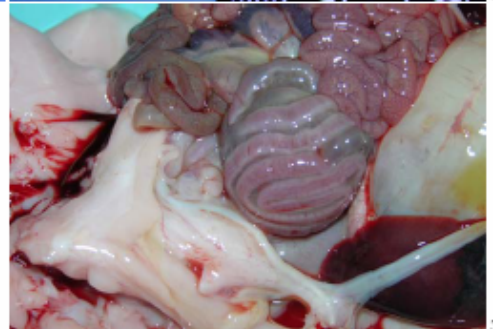


Fig.1. Litter with dead and mummified fetuses with sizes varying from 6 to 26cm crown-rump length.



Fig.2. Transverse section of the ventricular myocardium from a stillborn piglet infected with PCV2. Note marked ventricular dilatation and pale areas.

Fig.3. Serosal surface of spiral colon tissue from a stillborn piglet naturally infected with PCV2. Note moderate generalized edema in the spiral colon.



findings and results of bacteriologic tests are shown in Table 1. The direct immunofluorescence test for *Leptospira* sp. was negative in all 7 cases.

Histologically, there was severe, non-suppurative myocarditis (Fig.4) and, often, myocardial necrosis with moderate fibrosis. There also were foci of mineralization and intranuclear inclusion bodies in cardiomyocytes and pulmonary multifocal mononuclear cell infiltrate. No significant histopathological changes were observed in the other organs. Immunohistochemical staining (Table 2) revealed large amounts of PCV2 antigens in the cytoplasm and nuclei of a wide range of lymphoid and non-lymphoid tissues, but mostly in myocardial lesions (Fig.5) from the 7 cases. The antigen was mainly observed throughout the inflammatory cells and into the myocytes.

PCV2 antigen was located in mononuclear cells and syncytia in lymphoid follicles in spleen. In thymus, PCV2 was widely distributed in histiocytic cells. Intense cytoplasmic and

nuclear labelling was seen in thymic syncytia and in cells suggestive of lymphocytes. In lymph nodes, prominent accumulations of viral antigen were detected chiefly in macrophages and follicular cells. Large solid deposits of antigen were frequently apparent in nuclei. Antigen was mainly confined to follicular region of the cortex and paracortex, but in macrophages and syncytia in the medullary and subcapsular sinusoids. In the lungs, PCV2 was demonstrated

**Table 1. Summary of gross lesions in swine fetuses infected naturally with porcine circovirus 1 and 2 (PCV1 and 2) in conjunction or not with porcine parvovirus (PPV)**

| Cases | Age (days) | Infection         | Gross lesions                | Bacterial growth        |
|-------|------------|-------------------|------------------------------|-------------------------|
| 1     | 117        | PCV2              | Pale areas in the myocardium | None                    |
| 2     | 119        | PCV1 + PCV2       | Mesocolic edema              | <i>Escherichia coli</i> |
| 3     | ND*        | PCV1 + PCV2       | Mesocolic edema              | <i>Escherichia coli</i> |
| 4     | 118        | PCV2              | Ventricular dilatation       | None                    |
| 5     | 118        | PCV1 + PCV2 + PPV | Ventricular dilatation       | None                    |
| 6     | ND         | PCV1 + PCV2 + PPV | Ventricular dilatation       | None                    |
| 7     | 115        | PCV1 + PCV2 + PPV | Absent                       | None                    |

\* ND = not determined.

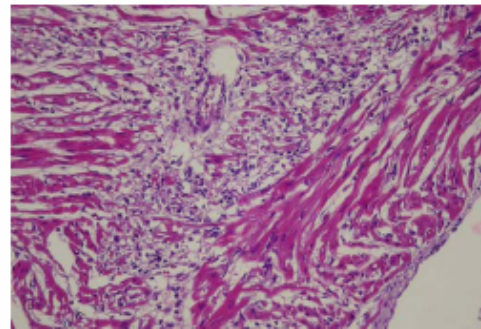


Fig.4. Heart from a fetus with marked diffuse non-suppurative myocarditis. HE, obj.20x.

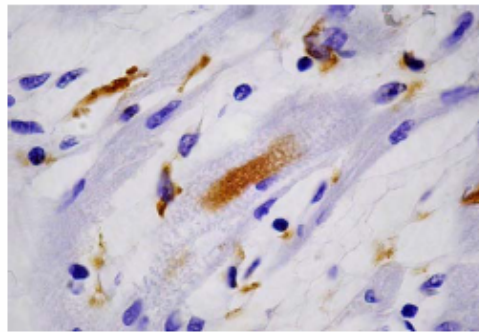


Fig.5. Myocardial tissue from an aborted fetus. Myocytes containing PCV2 antigen. Streptavidin-biotin-immunoperoxidase technique counterstained with haematoxylin. Ob).100x.

**Table 2. Immunohistochemical (IHC) results for porcine circovirus type 2 in tissues of aborted fetuses and stillborn piglets naturally infected with PCV2**

| Cases | Tissues* |       |        |             |        |        |       |       |
|-------|----------|-------|--------|-------------|--------|--------|-------|-------|
|       | Lung     | Liver | Kidney | Lymph nodes | Spleen | Thymus | Colon | Heart |
| 1     | +        | +     | +      | +++         | +      | +++    | ++    | +++   |
| 2     | ++       | ++    | ++     | -           | ++     | ++     | +     | +++   |
| 3     | ++       | +     | +      | +++         | ++     | -      | +++   | +++   |
| 4     | -        | +     | -      | ++          | +      | +      | -     | +++   |
| 5     | -        | -     | -      | ++          | ++     | -      | +     | +++   |
| 6     | -        | -     | -      | +           | -      | -      | ++    | +++   |
| 7     | -        | -     | -      | ++          | ++     | -      | -     | +++   |

\* Distribution pattern of PCV2 antigen throughout tissues: negative (-), mild (+), moderate (++), and intense (+++) labelling.

in alveolar septal and alveolar epithelial cells. In three fetuses there was a mild staining in the liver, predominantly in sinusoidal endothelium and hepatocytes. Positively stained cells were scattered multifocally in the kidney. Additionally, viral antigen was seen in follicular centers in the spiral colon.

Porcine parvovirus (PPV) was demonstrated in the lungs of stillborn fetuses from two cases in combination with PCV2 (Table 2). Immunohistochemical test for PRRSV was negative in all 7 cases.

## DISCUSSION

Many reports have reported a world-wide distribution of PCV2 in swine population, causing important economic losses to the swine industry (Macdonald et al. 2003, Kim et al. 2004, Chae 2004). Moreover, PCV2 has been linked to swine abortion, stillborn, fetal mummification and birth of weak piglets (West et al. 1999, Bogdan et al. 2001, O'Conner et al. 2001, Pensaert et al. 2004). However, as has already been suggested (Alterr et al. 2003) the low number of PCV2 infected fetuses probably reflects a minor role for the vertical transmission in the PCV2 pathogenesis.

Myocarditis, pale myocardial areas, ventricular dilatation, hydrothorax, ascites, liver enlargement, and abortion have all been associated with PCV2 intrauterine infection of sows

(West et al. 1999, Brunborg et al. in publication). In the present study, these cardiac lesions were also associated with PCV2 infection, but they were most prominent in aborted piglets in which PCV2 and PPV co-infection was detected, indicating again that the disease caused by the PCV2/PPV co-infection may be more severe than that caused by PCV2 alone. This synergistic action of PCV2 and PPV in aborted swine fetuses had also been demonstrated in Germany (Alterr et al. 2003).

Co-infection by PCV2 and PPV have been associated with naturally (Ellis et al. 2000) and experimentally (Kennedy et al. 2000, Krakowka et al. 2000) PMWS affected pigs and aborted swine fetuses (Altherr et al. 2003). Porcine parvovirus replicates in cells of the monocyte-macrophage series and may produce immune cell dysfunction, activation or immunosuppression causing an enhanced replication of PCV2 in affected pigs. Alternatively, PCV2 may initiate lymphoid depletion, resulting in an increased susceptibility to other viral or bacterial infections (Harding & Molitor 1988, Kennedy et al. 2000). This co-infection could be expected, since both viruses are worldwide distributed (Mengeling 1992, Allan & Ellis 2000).

Mesocolic edema is a characteristic lesion caused by *Escherichia coli* infection in pigs. This lesion was found in two aborted fetuses co-infected naturally with PCV2 and *Escherichia coli*, which was isolated in pure culture from samples of liver, lung and stomach fluid. However, a direct PCV2-induced vascular damage (Kennedy et al. 2000) may also have contributed to or caused those lesions. Mesocolic edema in swine aborted fetuses may also result from PRRSV infection (Rossow 1998), but it was not detected here by immunohistochemistry. Furthermore, a recent report indicated that PRRSV infection was not found in Brazil yet (Zanella et al. 2004).

Histological lesions associated with PCV2 were mainly observed in the heart and were characterized by non-suppurative inflammation and varying degrees of fibrosis and necrosis, indicating possible variation in the duration of lesion development. PCV2 antigens have been detected in several swine tissues by monoclonal and polyclonal antibody-based immunohistochemical procedures (Ellis et al. 1998, Choi & Chae 2000). As previously seen (Kim et al. 2004, Sanchez et al. 2004), the hearts and lymph nodes were consistently positive in all stillborn piglets and thus they may serve as target organs for diagnosing fetal infection.

Since PCV1 alone was not detected in any affected swine fetus, this report also strengthened the hypothesis of its lack of pathogenicity (Allan et al. 1995). The results of this study warrant the inclusion of PCV2 and PPV in the list of differential diagnoses for cases of swine reproductive losses in Brazil.

**Acknowledgements.**— The research was supported by CAPES, Brazil. The senior author thanks Ms. Francesca McQuire Smith for her assistance with English.

## REFERENCES

- Allan G.M., McNeilly F., Cassidy J.P., Reilly G.A., Adair B., Ellis W.A. & McNulty M.S. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Vet. Microbiol.* 44:49-64.



- Allan G.M. & Ellis J.A. 2000. Porcine circovirus: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:3-14.
- Altherr B., Zimmermann P., Etschmann B., Ritzmann M., Heinritzi M., Selbitz H.J. & Truyen U. 2003. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) in aborted fetuses. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease, Rome, p.218-219.
- Bogdan J., West K., Clark E., Konoby C., Haines D., Allen G., McNeilly F., Meehan B., Krakowka S. & Ellis J.A. 2001. Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study, 1995-1998. *Can. Vet. J.* 4:548-550.
- Bolt D.M., Hari H., Muller E. & Wakhvogel A.S. 1997. Nonsuppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. *J. Comp. Pathol.* 117:107-118.
- Brunborg I.M., Jonassen C.M., Moldal T., Bratberg B., Lium B., Koenen F., Schönheit J. Association of myocarditis with high viral load of porcine circovirus type 2 in several tissues in cases of fetal death and high mortality in piglets: a case study. *J. Vet. Diagn. Invest.* (In publication)
- Gastro A.M.M.G., Cortez A., Ruiz V.L.A., Leomil H., Moreno A.M., Doto D.S. & Richtzenhain L.J. 2004. Detection and differentiation of porcine circoviruses in Brazilian pigs. *Vet. Rec.* 154:728-729.
- Chae C. 2004. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology. *Vet. J.* 168:41-49.
- Choi C. & Chae C. 2000. Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as show by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 38:436-441.
- Ellis J., Hassard L., Clark E., Harding J., Allan G., Willson P., Strokappe J., Martin K., McNeilly F., Meehan B., Todd D. & Haines D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39:44-51.
- Ellis J.A., Bratanich A., Clark E.G., Allan G., Meehan B., Haines D.M., Harding J., West K.H., Krakowka S., Konoby C., Hassard L., Martin K. & McNeilly F. 2000. Co-infection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:21-27.
- Fernandes L.T., Giacci-Zanella J.R., Sebastiansky J., Schiochet M.F. & Trombetta C. 2006. Experimental coinfection of SPF pigs with porcine circovirus type 2 isolated in Brazil and porcine parvovirus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:1-8.
- Harding M.J. & Molitor T.W. 1988. Porcine parvovirus replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood leukocytes. *Arch. Virol.* 101:105-117.
- Kennedy S., Moffett D., McNeilly F., Meehan B., Ellis J., Krakowka S. & Allan G.M. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122:9-24.
- Kim J. & Chae C. 2003. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67:133-137.
- Kim J., Jung K. & Chae C. 2004. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets. *Vet. Rec.* 16:489-492.
- Krakowka S., Ellis J.A., Meehan B., Kennedy S., McNeilly F. & Allan G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus e and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 37:254-263.
- Kresse J.F., Taylor W.D., Stewart W.W. & Ernisse K.A. 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesion. *Vet. Microbiol.* 10:525-531.
- LeCann P., Albina E., Madec F., Cariolet R. & Jestin A. 1997. Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141:660.
- MacDonald W.E., Choi Y.K., Goyal S.M. & Joo H.S. 2003. Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from sera of stillborn fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 67:108-113.
- Mengeling W.L. 1992. Porcine parvovirus infection, p.299-311. In: Leman A.D., Straw B., Mengeling W.L., D'Allaire S. & Taylor D.D. (ed.), *Disease of Swine*, 7th ed. Iowa State University, Ames.
- Miller D.A., Wilson M.A. & Kirkbride C.A. 1989. Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates of general diagnostic use. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1:146-149.
- O'Conner B., Gauvreau H., West K., Bogdan J., Ayroud M., Clark E.G., Konoby C., Allen G. & Ellis J.A. 2001. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multiside swine production unit. *Can. Vet. J.* 42:551-553.
- Oliveira S.J., Baetz A.L., Wesley L.V. & Harmon K.M. 1997. Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. *Vet. Microbiol.* 57:347-354.
- Pensaert M.B., Sanchez R.E., Ladekjaer-Mikkelsen A.S., Allan G.M. & Nauwynck H.J. 2004. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus 2 infection. *Vet. Microbiol.* 98:175-183.
- Rosell C., Segales J., Ramos-Vara J.A., Folch J.M., Rodriguez-Arriola G.M., Duran C.O., Balasch M., Plana-Durán J. & Domingo M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissue of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet. Rec.* 146:40-43.
- Rosow K.D. 1998. Review article: porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Pathol.* 35:1-20.
- Sanchez Jr. R.E., Nauwynck H.J., McNeilly F., Allan G.M. & Pensaert M.B. 2001. Porcine Circovirus 2 infection in wine fetuses inoculated at different stages of gestation. *Vet. Microbiol.* 83:169-176.
- Soares R.M., Durignon E.L., Bersano J.G. & Richtzenhain L.J. 1999. Detection of porcine parvovirus DNA by polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Methods* 78:191-198.
- West H., Bystrom J.M., Wojnarowicz C., Shantz N., Jacobson M., Allan G.M., Haines D.B., Clark E.G., Krakowka S., McNeilly F.M., Konoby C., Martin K. & Ellis J.A. 1999. Myocarditis and abortion associated with intra-uterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:530-532.
- Zanella J.R.C., Trombetta C., Vargas I. & Costa D.E.M. 2004. Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Gênica Rural, Santa Maria*, 34:449-455.

**3.3 Artigo 3: “Lesões de pele causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae* em um feto suíno abortado.”**

## Lesões de pele causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae* em um feto suíno abortado

Skin lesions caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae* in an aborted swine-fetus

Caroline Argenta Pescador<sup>I</sup> Eduardo Conceição de Oliveira<sup>I</sup> Marcos José Pereira Gomes<sup>II</sup>  
Paulo Mota Bandarra<sup>I</sup> Juliano de Souza Leal<sup>I</sup> Pedro Miguel Ocampos Pedrosa<sup>I</sup>  
Luís Gustavo Corbellini<sup>III</sup> David Driemeier<sup>IV</sup>

-NOTA-

### RESUMO

A infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* tem distribuição mundial e se caracteriza por lesões de pele, endocardite vegetativa, artrite e problemas reprodutivos tais como aborto, nascimento de animais mortos e diminuição do tamanho da leitegada. Áreas circulares bem delimitadas e esbranquiçadas localizadas na pele ao redor dos olhos, face, escápula e trem posterior foram as principais alterações macroscópicas observadas em um feto suíno da raça Large White. Microscopicamente, essas lesões apresentavam perivasculite mononuclear multifocal moderada associada com bastonetes Gram-positivos. Os cultivos aeróbios de amostras de fígado, pulmão, conteúdo estomacal e pele revelaram crescimento de *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

**Palavras-chave:** aborto, suíno, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

### ABSTRACT

*Erysipelothrix rhusiopathiae* infection has a worldwide distribution and may be characterized by skin lesions, vegetative endocarditis, arthritis and reproductive problems such as abortion, increased stillbirths and smaller litter size. This report associates an aborted swine fetus with *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. The main gross lesions observed in an aborted swine fetus (Large White) were well circumscribed whitish areas in the skin of the periorcular region, face, neck, scapula, and hindquarter. Microscopically, these lesions were characterized by mild mononuclear perivasculitis associated with gram-positive rods. Aerobic cultivation from samples of

lungs, liver, stomach content and skin revealed pure cultures of *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

**Key words:** abortion, swine, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

A erisipela ou ruiva é uma doença de distribuição mundial (PENRITH & SPENCER, 2004), de caráter hemorrágico e que usualmente cursa com lesões cutâneas, articulares, cardíacas ou septicemias em suínos (HOFFMANN & BILKEI, 2002). É causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não-móvel, não-esporulado e que pode ser filamentosos (WOOD, 1999). Estima-se que 30-50% dos suínos são portadores da bactéria que infecta as tonsilas e outros órgãos linfóides sem causar sinais clínicos sistêmicos (HAESEBROUCK et al., 2004). Fatores tais como estresse de transporte, mudança de alimentação ou de temperatura podem predispor o aparecimento dos sinais (HAESEBROUCK et al., 2004). Existem pelo menos 22 sorotipos de *Erysipelothrix* sp. (EAMENS et al., 1988), os quais apresentam virulência variável. Entretanto, poucos estão associados com doença clínica (WOOD & HARRINGTON, 1978; EAMENS et al., 1988).

<sup>I</sup>Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: davetpat@ufrgs.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Laboratório de Bacteriologia Clínica Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>III</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

A patogenia da doença é complexa e não está claro se há envolvimento de toxinas. Entretanto, há indicações de que uma enzima denominada neuroaminidase seja responsável pelas lesões vasculares, pela formação de trombos e pela hemólise (WOOD, 1999). O reservatório natural mais importante de *E. rhusiopathiae* é o suíno doméstico (WOOD, 1999), que durante a infecção aguda pode eliminá-la nas fezes, urina, saliva e secreções nasais (WOOD, 1999; RADOSTITIS et al., 2003). Suínos de todas as idades podem se infectar, mas animais entre 2 e 12 meses e porcas prenhes são as categorias mais susceptíveis (WOOD, 1999). Em um rebanho, tanto casos esporádicos quanto diversos casos de doença septicêmica aguda podem ocorrer. A bactéria permanece viável no solo, na água, na cama e nos alimentos (RADOSTITIS et al., 2003).

O diagnóstico clínico de erisipela é considerado fácil, quando há lesões de pele consideradas patognomônicas (WABACHA et al., 1998). Entretanto, septicemia aguda ou subaguda sem lesões características na pele podem ser confundidas com peste suína africana e infecções sistêmicas por *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp. e *Pasteurella* spp. (WABACHA et al., 1998). Além de problemas septicêmicos, a infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* também pode ocasionar transtornos reprodutivos caracterizados por endometrite, aborto (PENRITH & SPENCER, 2004), mumificação fetal, aumento da natimortalidade e nascimento de leitegadas reduzidas (HOFFMANN & BILKEI, 2002). Este relato descreve um caso de aborto suíno por *E. rhusiopathiae*.

Um feto suíno abortado, fêmea, com 112 dias de idade gestacional, foi encaminhado ao Setor de Patologia Veterinária da UFRGS. Esse caso de abortamento incluiu outros 11 fetos da mesma leitegada. Durante a necropsia, fragmentos de diversos órgãos foram coletados, fixados em formalina tamponada a 10% e processados conforme métodos histológicos convencionais. As colorações utilizadas foram hematoxilina-eosina e Gram de Brown-Hopps (ARRINGTON, 1992). Amostras de pele, fígado, pulmões e conteúdo estomacal foram coletados para bacteriologia. Procederam-se a cultivos aeróbios em Agar-sangue (AS) ovino 7% com base Columbia, AS azida e Mac Conkey, bem como a provas enzimáticas, bioquímicas e de sensibilidade aos antibióticos. Impressões de secções de rim foram tomadas para o teste de imunofluorescência direta para *Leptospira* spp. com anticorpo comercial multivalente na diluição de 1:20 (MILLER et al., 1989). Amostras de pele e conteúdo estomacal também foram encaminhadas para micologia, cujo cultivo foi realizado com Agar-Saboraud acrescido

de antibióticos. O histórico da propriedade e os dados reprodutivos da fêmea suína que abortou foram obtidos com o médico veterinário requisitante.

Não havia histórico de doença clínica típica de erisipela na propriedade. Apenas abortos foram relatados. De doze fetos abortados, apenas um foi enviado para diagnóstico. À necropsia, as alterações mais significativas foram observadas na pele (Figura 1), que apresentava lesões circulares bem delimitadas de coloração esbranquiçada nas regiões periocular e escapular, bem como na face e trem posterior. Estas lesões mediram aproximadamente 5,0 x 2,5cm (membro posterior) e 3,0 x 1,0cm (região periocular). Havia áreas avermelhadas intercaladas com pequenas áreas de coloração esbranquiçada nos pulmões. Histologicamente, havia perivasculite mononuclear multifocal moderada (Figura 2) associada com bastonetes Gram-positivos na pele. Expansões alveolares multifocais associadas com bastonetes Gram-positivos, mecônio e queratina intra-alveolares também foram observadas. Demais órgãos não apresentaram alterações significativas. A imunofluorescência para *Leptospira* spp. foi negativa. Após 24h de incubação em AS ovino 7%, havia crescimento de colônias alfa-hemolíticas pequenas com bordos inteiros (características de *Erysipelothrix rhusiopathiae*) nas amostras de conteúdo estomacal e pulmão e, após 48h, tais colônias foram evidentes em todas as amostras. Os testes enzimáticos e bioquímicos (catalase, oxidase, esculina, lactose, manitol, salicina, rafinose, sorbitol e trealose) foram todos negativos e suportam o diagnóstico bacteriológico de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Amostras isoladas de *E. rhusiopathiae* demonstraram sensibilidade a cefalexina, ampicilina e amoxicilina e resistência a norfloxacin, estreptomycin e tetraciclina. Não houve crescimento em Mac Conkey nem em Agar-Saboraud (micologia).

Esse diagnóstico baseado-se nos achados patológicos e bacteriológicos. Diversos casos de aborto em suínos por *Erysipelothrix rhusiopathiae* têm sido descritos (HENRY & KELLY, 1979; HOFFMANN & BILKEI, 2002) e associados com ausência de lesões macroscópicas e microscópicas. Em suínos, lesões microscópicas de pele caracterizadas por perivasculite mononuclear são indicativas de infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* (WOOD, 1999; YANGER & SCOTT, 1993). Essas alterações foram consistentemente observadas, reforçando o diagnóstico. Áreas de expansões de alvéolos pulmonares associadas com bastonetes gram-positivos intra-alveolares sugerem que a inalação de líquido amniótico contaminado, durante hipóxia fetal, possa provavelmente ter causado a infecção do feto



Figura 1 - Feto suíno abortado. Pele com áreas esbranquiçadas multifocais.

(RANDALL & PENNY, 1967; CUTIS, 1974; STANTON & CARROL, 1974). A presença de microorganismos no líquido amniótico pode predispor às lesões de pele, o que tem sido constantemente relatado em infecções micóticas (HILLMAN, 1969; MILLER, 1977). Entretanto, neste caso, não foram observadas estruturas de imagem negativa, semelhantes a hifas de fungos, na microscopia óptica e de contraste de fase. Além disso, o cultivo micológico foi negativo. Nesse caso, a via de acesso ao trato genital da fêmea suína não foi determinada. Entretanto, pelo fato de o agente ter sido isolado em amostras de tecidos fetais, sugere-se que o microorganismo tenha invadido o útero gravídico durante uma infecção sistêmica. Infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* tem sido demonstrada como causa de aborto em fêmeas suínas em final de gestação (KEMENES & SZEKY, 1971). Na grande maioria dos casos, sinais clínicos como apatia, febre, anorexia, vômitos (LOVEDAY, 1962; WOOD, 1999) e descargas vulvares (HOFFMANN & BILKEI, 2002) são frequentes. No presente relato, o único sinal clínico relatado foi o aborto. Fatores como tamanho da

dose infectante, virulência e a susceptibilidade do suíno afetado (GYLES, 1993) podem estar associados com a ausência de outros sinais clínicos. Sabe-se que a bactéria pode permanecer nas tonsilas e em outros órgãos linfóides, mas somente alguns animais desenvolvem bacteremia e doença severa (PENRITH & SPENCER, 2004).

Agentes bacterianos como *Salmonella spp*, *Streptococcus spp* e *Pasteurella spp*, entre outros, devem ser incluídos no diagnóstico diferencial de erisipela, pois qualquer um deles pode ocasionar abortos em suínos (GRESHAM, 2003). Todavia, nenhuma dessas bactérias tem sido associada com lesões de pele e com infiltrado inflamatório composto predominantemente de linfócitos e macrófagos (WOOD, 1999), como os observados nesse caso. Os resultados comprovam a infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* no feto suíno abortado. Portanto, a possibilidade da ocorrência dessa infecção como causa de aborto em suínos no Sul do Brasil deve ser considerada.



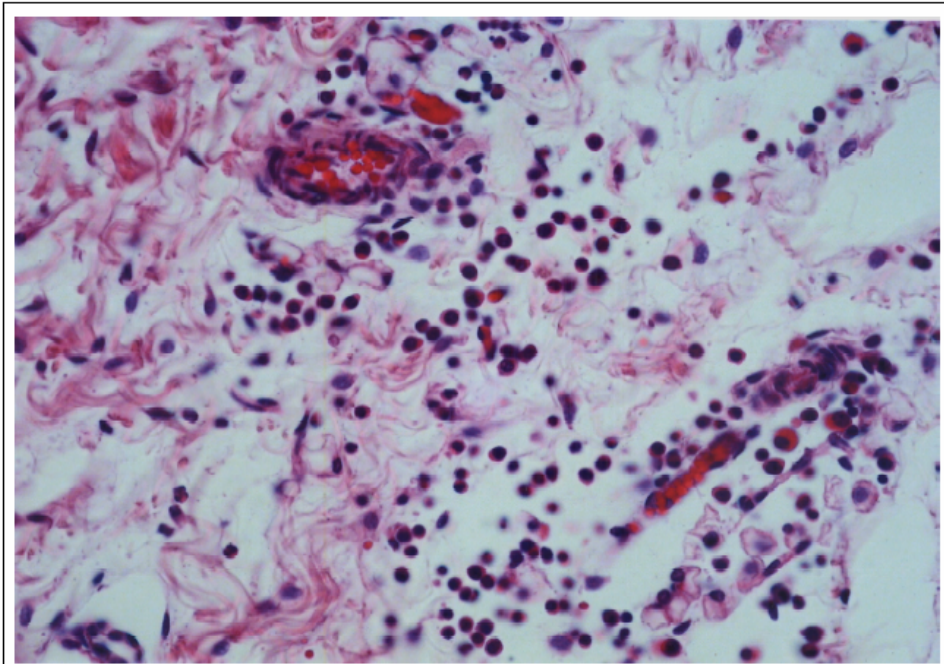


Figura 2 - Pele de feto suíno: vasculite e perivasculite multifocais predominantemente mononucleares.

## REFERÊNCIAS

- ARRINGTON, J.B. Bacteria, fungi, and other microorganisms. In: PROPHET, E.B. et al. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1992. p.203-246.
- CUTIS, S. Responses of the piglet to perinatal stressors. **Journal of Animal Science**, v.38, p.1031-1036, 1974.
- EAMENS, G.J. et al. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Australian pigs, small ruminants, poultry and captive wild birds and animals. **Australian Veterinary Journal**, v.65, p.249-252, 1988.
- GRESHAM, A. Infectious reproductive disease in pigs. **Farm Animal Practice**. In **Practice**, v.25, p.466-473, 2003.
- GYLES, C.L. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In: GYLES, C.L.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infection in animals**. 2.ed. Ames: Iowa State University, 1993. p.80-85.
- HAESEBROUCK, F. et al. Efficacy of vaccines against bacterial disease in swine: what can we expect? **Veterinary Microbiology**, v.100, p.255-268, 2004.
- HENRY, S.; KELLY, B. Swine abortion associated with use of Erysipelas vaccine. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.175, p.453-454, 1979.
- HILLMAN, R.B. Bovine mycotic placentitis in New York State. **Cornell Veterinarian**, v.59, p.1230-1237, 1969.
- HOFFMANN, C.W.; BILKEI, G. Case study: chronic erysipelas of the sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. **Reproduction of Domestic Animals**, v.37, p.119-120, 2002.
- KEMENES, F.; SZEKY, A. Contribution to the diagnosis of infectious swine abortion. **Zentralblatt Veterinärmedizin B**, v.18, p.170-176, 1971.
- LOVEDAY, R.K. Acute swine erysipelas in suckling pigs. **Journal of the South African Veterinary Medical Association**, v.33, p.3-5, 1962.
- MILLER, R.B. A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. **Canadian Veterinary Journal**, v.18, n.4, p.87-95, 1977.
- MILLER, D.A. et al. Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates of general diagnostic use. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.146-149, 1989.
- PENRITH, M.L.; SPENCER, B.T. *Erysipelothrix rhusiopathiae* infections. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infections disease of livestock**. 2.ed. Oxford: Oxford University, 2004. V.3, p.1908-1912.
- RADOSTITIS, O.M. et al. **Veterinary medicine**. 8.ed. London: Baillière Tindall, 2003. p.1763.
- RANDALL, G.C.B.; PENNY, R.H.C. Stillbirths in pigs: the possible role of anoxia. **Veterinary Record**, v.81, p.359-361, 1967.

**3.4. Artigo 4: “*Escherichia coli* O157:H7 – as a cause of abortion in swine.”**

Caroline Argenta Pescador, Paulo Mota Bandarra, Luis Gustavo Corbellini, David Steffen, David Driemeier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Este artigo está em andamento e irá ser submetido à Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

**Abstract:** *Escherichia coli* infections in swine occur worldwide and can be a major economic significance. Enteritis and septicemia have been the most common syndromes, while agalactiae and abortion occur less often. Here we report evidence of *Escherichia coli* serotype O157:H7 infection in two swine fetuses. Gross lesions were red-yellowish fluid with fibrin exudation in the abdominal and thoracic cavities, fibrin deposits on the serosa of liver, colon, and lungs, and petechial hemorrhages in the pericardium. Microscopically, lesions were characterized by focally-extensive suppurative pleuritis and fibrin-purulent interstitial bronchopneumonia in which abundant gram-negative rods with morphology consistent with *Escherichia coli* were present. Suppurative multifocal colitis, myocarditis and hepatitis were also observed. Aerobic cultivation from samples of lung, liver, stomach contents, and thoracic fluid revealed pure cultures of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* serotype O157:H7 antigen was detected by immunohistochemistry intravascular and in vessels of kidney, lungs and lymph nodes and within leukocytes of the lung.

**Key words:** swine abortion, *Escherichia coli*, O157:H7, immunohistochemistry.

---

From the Department of Veterinary Pathology (Pescador, Bandarra, Driemeier) and Department of Preventive Veterinary Medicine (Corbellini), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) Av. Bento Goncalves 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>1</sup> Corresponding Author: David Driemeier, Departamento de Patologia Clinica Veterinaria, Faculdade de Veterinaria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Goncalves, n<sup>o</sup> 9090, 91540-000 Porto Alegre RS, Brazil.

<sup>2</sup> From the Department of Veterinary and Biomedical Science (Steffen). Veterinary Diagnostic Center. University of Nebraska-Lincoln, P.O Box 82646, Fair Street and East Campus Loop, Lincoln, NE 68501-2646, USA.



**Introduction:**

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) comprise a group of emerging zoonotic pathogens of worldwide importance (Nataro et al 1998, Phillipis et al 2000). The most prominent serotype within the EHEC group is O157:H7 which has been responsible for several human outbreaks and numerous sporadic cases of hemorrhagic colitis (HC) with potential complications such as hemolytic uremic syndrome (HUS), which may lead to death (Levine 1987, Francis et al 1989, Blanco et al 2003). Young children (0-4 years of age) and the elderly are particular risk groups (Karmali et al 1995).

*E.coli* O157:H7 is prevalent in the gastrointestinal tracts of cattle and other ruminants (Chapman et al 1996, Kudva et al 1996, Elder et al 2000). Infections, particularly with serogroup O157:H7, are associated with consumption of a variety of food and water vehicles such as undercooked meat, including pork meat, unpasteurized dairy products, vegetables, or water contaminated by ruminant feces (Doyle et al 1997, Johnson et al 1999) Although ruminants to be a major reservoir for *E. coli* O157:H7, these bacteria are carried by a variety of non-ruminant animals. Flies, wild birds, turkeys, horses, dogs and pigs have all been found to carry *E.coli* O157:H7 (Booher et al 2002). *Escherichia coli* serotype O157:H7 has been isolated from healthy swine in Japan, The Netherlands, Sweden, Canada, Norway and the United States (Eriksson et al 2003, Feder et al 2003, Heuvelink et al 1999, Nakazawa et al 1999). Although the prevalence of the organism in these studies is generally low (0.1 to 6%), a family outbreak associated with consumption of dry fermented salami made with pork meat only was reported (Conedera et al 2007). In Chile, the prevalence of *E.coli* O157:H7 reported from pigs (10.8%) was greater than that reported from cattle (2.9%), suggesting that swine may be an important source of this organism in some countries (Borie et al 1997).

Several virulence factors are produced by EHEC, including toxins known as Shiga-like or Vero toxins I and II (Pai et al 1986). Studies have indicated that Stx2 and Stx2c, encoded by different genotypic subtypes of *stx2*, have been associated with more severe human diseases, while the *stx2d* genotype is apparently of lesser clinical significance (Friederich et al 2002). Several other virulence factors involved in the pathogenicity of STEC have been described. The intimin encoded by the *eae* gene, located in the chromosomal locus of enterocyte effacement, is responsible for the

intimate adherence of bacteria to enterocytes, which causes attaching and effacing lesions (Nataro et al 1998).

In Brazil, non-O157:H7 STEC strains have also been more frequently isolated from human infections; and serotypes O26:H11, O103: H2, and O111: H8 accounted for most of the cases (Guth et al 2002, Guth et al 2005, Vaz et al 2004). A limited information about human outbreaks associated with *E. coli* serotype O157:H7 has been reported in this country (Vaz et al 2006). This report describes the association of *Escherichia coli* serotype O157:H7 with swine abortion in Southern Brazil.

### **Materials and Methods:**

In August 2005, two Large White cross Landrace aborted near-term porcine fetuses from a litter of twelve were submitted to the Laboratory of Veterinary Pathology - UFRGS for necropsy investigation. At necropsy, samples of brain, heart, lung, liver, kidney, skeletal muscle, lymph nodes, thymus, spiral colon and spleen were collected, fixed in 10% buffered formalin, and processed by standard methods for histologic examination. Selected sections were stained with Gram Brown-Hopps (Arrington, 1992). Samples of lungs, liver, thoracic fluid and stomach contents were cultured for aerobic bacteria on 5% sheep blood and MacConkey agar. Attempts at detection of spirochetes in kidney smears through the use of multivalent antibody conjugated with fluorescein<sup>a</sup> at 1:20 dilution was employed for diagnosis of *Leptospira* sp (Miller et al 1989). Tissue sections of lung, kidney and lymph nodes were examined by immunohistochemistry (IHC). For IHC, 4µm paraffin sections were deparaffinized and rehydrated. Sections were incubated with citrate buffer, pH6.0 in a microwave oven at 750 W, for 20 minutes for antigen retrieval and then blocked for 10 min at room temperature with powerblock<sup>b</sup> at 1:10 dilution. Sections were then incubated with rabbit anti-*Escherichia coli* serotype O157:H7 polyclonal antibody<sup>c</sup> at 1:1000 dilution for 30 minutes at room temperature. A streptavidin-biotin alkaline phosphatase kit<sup>d</sup> was employed for 10 min each as the IHC detection system. Sections were then washed in TBS and the reaction was “visualized” by applying fast red<sup>e</sup> for 15 minutes. Finally, the sections were lightly counterstained with Mayer’s haematoxylin for light microscopic examination. Intestine from a swine inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 served as positive control. Additionally, sections of the lung and heart were also stained by IHC for porcine parvovirus virus<sup>f</sup> (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome

virus<sup>f</sup> (PRRSV) and porcine circovirus type 2<sup>g</sup> (PCV-2) antigens as previously described (Sorden et al 1999, Boenisch 2001, Kim et al 2004).

### **Results:**

Abortion occurred in the sow's third pregnancy, at approximately 103 days of gestation. The sow had been vaccinated against *Leptospira* spp., porcine parvovirus virus (PPV), *Erysipelothrix* sp., *Mycoplasma* sp., and *Haemophilus parasuis* before breeding. Besides the abortion, no clinical illness was seen in the sow. Fetuses submitted had 29 and 31cm crown-rump length. Abdomen of fetuses was moderately distended. Upon opening, the abdominal and pleural cavities showed an excessive amount of red-yellowish fluid with numerous chunks of matted fibrin. Fibrin deposits adhered to the liver, colon, and lung surfaces (Figure 1A), and petechial hemorrhages in the pericardium were also observed. Microscopically, there was interstitial bronchopneumonia composed by a severe infiltration of neutrophils throughout the alveolar lumens (Figure 1B) and in many bronchus and bronchioles (Figure 1C). In some areas, abundant fibrin exudation was mixed with suppurative infiltrate. Aggregates of neutrophils were also commonly scattered throughout the pleural surface (Figure 1D). Occasional small aggregates of meconium in airways were present. Additionally, mild suppurative multifocal colitis, myocarditis and hepatitis were seen. Lung sections showed numerous Gram negative rods within the inflammatory infiltrate and in the blood vessels. *Escherichia coli* was recovered in pure culture from samples of lung, liver, thoracic fluid, and stomach content on MacConkey agar. Morphologically, *E. coli* colonies measured about 1-2mm in diameter, were smooth, shiny low-convex, and pink colored. Direct immunofluorescence test for *Leptospira* sp. was negative. Large amounts of *Escherichia coli* O157:H7 antigens were observed in the cytoplasm from intralésional neutrophils located in the bronchus, bronchioles (Figure 1E) and pleural surface. The most intense anti-*E.coli* immunostaining was observed in the lung, lymph nodes (Figure 1F), and kidney vessels. Immunohistochemistry for PPV, PCV2 and PRRSV were negative.

**Discussion:**

This report indicates that *Escherichia coli* O157:H7 may be a potential cause of swine abortion. Previous studies suggest that pigs are biologically competent host of *E. coli* O157:H7 and the majority of swine herds do not come in contact with an infectious dose of *E. coli* O157:H7. Although, pigs are not considered to be a major source of VTEC O157 (Wasteson, 2001) previous studies indicate that pork products should not be neglected in *E. coli* O157 outbreaks investigations (Conedera et al 2007). In the Netherlands, surveillance of laboratory confirmed VTEC infections yielded an annual incidence of 0.25 cases per 100,000 inhabitants, with 40% of patients being hospitalized (Van Duynhoven et al 2002). In the United State, *Escherichia coli* O157:H7 causes 73,000 illnesses annually (Rangel et al 2005). Additionally *E. coli* O157:H7 was responsible for an outbreak involved 158 people (mostly children) in Spain due to pork and contained other meat sources (Blanco et al 2003).

Bacterial infections can enter into the sow by many routes including artificial insemination, urogenital infection or from insufficient vulvar hygiene through vagina and cervix (Carabin et al 1996). Except during estrus and parturition, some factors keep the bacterial count ratio from 1:10 to 1:100 between the caudal and cranial vagina (Vlcek et al 1980, Berner 1984). An increase in cranial vaginal bacterial count has been show at estrus and parturition and a higher caudal vaginal bacterial charge at the time of artificial insemination has been considered as a risk factor for uterine contamination (Carabin et al 1996). The infection may reach the placenta by the hematogenous route or from the vagina-uterus, reaching the fetus through the umbilical vein or amniotic fluid (Ho et al 2006). Although the placenta has not been submitted for investigation, an ascending infection of the genital tract cannot be excluded because the bacterium was found in various fetal tissues, suggesting septicemia. Previous studies indicate that *Escherichia coli* O157:H7 infections in pigs most commonly manifested as syndromes associated with enteritis and hemorrhagic colitis with areas of superficial necrosis (Henton et al 1997; Francis et al 1986; Mead et al 1998). In the present study, the most important microscopic finding was bronchopneumonia followed by pleuritis, which could be caused by inhalation of amniotic fluid containing bacteria, probably in association with fetal hypoxia (Alonso-Spilsbury et al 2005). In many countries, verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 has been frequently isolated from cattle, sheep and feedstuffs. Although most *E.coli* O157 strains from Europe (Thomas et al

1996), North America (Cimolai et al 1994, Slutsker et al 1997), and Japan (National institute, 1996) have been reported to produce Shiga toxin 2, it was not possible to clearly establish the specific role for toxins in the pathogenesis of abortion. The identification of organism within the lesion by immunohistochemistry clearly relates *Escherichia coli* O157:H7 with abortion in these piglets.

**Acknowledgement:** The authors sincerely thanks Dr. Rodney A. Moxley, Department of the Veterinary and Biomedical Science, University of Nebraska for supplying the primary antibody anti-*Escherichia coli* serotype 0157:H7, the pathologist Dr. Bruce Brodersen of Veterinary Diagnostic Center, University of Nebraska for your invaluable help and Steve Braswell of the Veterinary Diagnostic Center, University of Nebraska for excellent technical assistance in immunohistochemical staining. This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nivel Superior (CAPES).

**Sources and manufacturers:**

- a. Animal and Plant Health Inspection Service. National Veterinary Services Laboratories (NVLS). P.O. Box 844. Ames, Iowa 50010.
- b. Biogenex Corporation
- c. Department of Veterinary and Biomedical Science. University of Nebraska, Lincoln, NE.
- d. Dako LSAB+AP 2 kit, Dako Corp., Carpinteria, CA.
- e. BioPath Laboratories, Inc.
- f. VMRD, Inc., Pullman, WA.
- g. Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Iowa State University, Ames, IA.

**References:**

1. Alonso-Spilsbury M, Mota-Rojas, Villanueva-Garcia et al.: 2005, Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: A review. *Anim Reprod Sci* 90:1-30.
2. Arrington J.B. 1992. Bacteria, fungi, and other microorganisms, p. 203-246. In: Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. (ed.) *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington.
3. Berner H. 1984, The significance of urinary tract infections in the development of puerperal endometritis in the sow. *Tierärztl Umsch* 34:450-458.
4. Blanco J, Blanco M, Blanco J.E, et al.: 2003, Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, Serotypes, and Virulence Genes of O157:H7 and Non-O157 VTEC in Ruminants, Raw Beef Products, and Humans. *Exp Biol Med* 228:345-351.
5. Boenisch MS: 2001, *Handbook Immunochemical Staining Methods*, 3<sup>rd</sup> edition, Dako Corporation.
6. Booher SL, Cornick NA, Moo HW. 2002, Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally infected swine. *Vet Microbiol* 89(1):69-81.
7. Borie C, Monreal Z, Guerrero P, Sanchez ML, Martinez J, Arellano C, Prado, V.1997, Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch Med Vet*. 29:205-212.
8. Carabin H, Martineau GP, Vaillancourt D et al.: 1996, Detection of cervical bacterial contamination in swine by two methods of swabbing in relation to artificial insemination. *Can J Vet Res* 60:40-44.
9. Chapman, PA, Siddons CA, Harkin MA. 1996, Sheep as a potential source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *Vet Rec*, 138:23-24.
10. Cimolai N, Basalyga S, Mah DG et al.: 1994. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nefrol* 42:85-89.
11. Conedera G, Mattiazzi E, Russo F, Chiesa E, Scorzato I, Grandesso S, Bessegato A, Fioravanti A, Caprioli A. 2007, A family outbreak of *Escherichia*

- coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami Epidemiol Infect 135: 311-314.
12. Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. *Escherichia coli* O157: H7. In: Doyle MD, Beuchat LR, Montville TJ, Eds, Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. Washington, DC: ASM Press, pp171-191, 1997.
  13. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. 2000, Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci 97: 2999-3003.
  14. Eriksson E, Nerbrink E, Borch E, Aspan A, Gunnarsson A. 2003, Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the Swedish pig population. Vet Rec 152:712-717.
  15. Feder IE, Wallace M, Gray JT, Fratamico P, Fedorka-Cray PJ, Pearce R, Call JE, Perrine R, Luchansky JB. 2003, Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. Emerg Infect Dis 9:380-383.
  16. Francis DH, Moxley RA, Andraos CY: 1986, Edema Disease-Like Brain Lesions in Gnotobiotic Piglets Infected with *Escherichia coli* Serotype O157:H7. Infect. Immun 57(4):1339-1342.
  17. Francis DH, Moxley RA, Andraos CY. 1989, Edema Disease-Like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* Serotype O157:H7. Infect Immun 57(4): 1339-1342.
  18. Friederich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. 2002 *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants—frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis 185:74-84.
  19. Guth BEC, Ramos SRTS, Cerqueira AMF, Andrade JRC, Gomes TAT. 2002, Phenotypic and genotypic characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97 (8):1085-1089.
  20. Guth BEC, Vaz TMI, Gomes TAT, Chinarelli SH, Rocha MMM, Castro AFP, Irino K. 2005, re-emergence of O103:H2 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. J Med Microbiol 54:805-806.
  21. Johnson RP, Wilson JB, Michel P, Rahn K, Renwick SA, Gyles CL, Spika JS. Human infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* associated with

- exposure to farms and rural environments. In: Stewart CS, Flint HJ, Eds. *Escherichia coli* O157 in Farm Animals. Walling-ford, UK: CABI Publishing, pp 147-168, 1999.
22. Henton MM, Engelbrecht MM: 1997, *Escherichia coli* serotypes in pigs in South Africa. *Oderstepoort J Vet Res* 64:175-187.
  23. Heuvelink AE, ZwartkruisNahuis JTM, Van der Biggelaar FLAM, Van Leeuwen WJ, de Boer E. 1999, Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int. J. Food Microbiol.* 52:67-75.
  24. Ho TKH, Lipman LJA, Bloois LVG et al.: 2006, Potencial routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. *Vet Microbiol* 114:123-133.
  25. Kim J, Chae C: 2004, 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 coinfecting pigs. *J Vet Diagn Invest* 16:45-50.
  26. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ: 1996, *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* 34: 431–433.
  27. Levine MM, Xu JG, Kaper JB, et al.: 1987, A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 156:175–82.
  28. Mead PS, Griffin PM. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet* 352:1207-1212.
  29. Miller DA, Wilson MA, Kirkbride CA: 1989, Evaluation of multivalent *Leptospira* fluorescent antibody conjugates for general diagnostic use. *J Vet Diagn Invest* 1(2):146-149.
  30. Nakazawa M, Akiba M, Sameshima T. 1999, swine as a potential reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 5: Nov-Dec [online] <http://www.scc.org>.
  31. Nataro JP, Kaper JB: 1998, Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:141–201.
  32. National institute of Health and infectious Disease. 1996, Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* January 1991-November 1995, Japan. *Infectious Agents Surrveillance Report* 17:1-2.



33. Pai, CH, Kelley JK, Meyers GL: 1986, Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun* 51:16-23.
34. Phillips AD, Navabpour S, Hicks S, *et al.*: 2000, Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* 47: 377–381.
35. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. 2005, Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Disease*, v.11, n.4, p.603-609.
36. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, *et al.*: 1997. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 126:505-513.
37. Sorden SD, Harms PA, Nawagitgul P. 1999. Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Vet Diag* 11: 528–530.
38. Thomas A, Cheasty T, Frost JA, Chart H, Smith HR, Rowe B. 1996, Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales. *Epidemiol Infect* 117:1-10.
39. Vaz TMI, Irino K, Kato MAMF, Dias ÂMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM, Guth BEC. 2004. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol* 42:903-905.
40. Vaz TMI, Irino K, Nishimura LS, Cergole-Novella MC, Guth BEC. 2006. Genetic heterogeneity of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 44:798-804.
41. Van Duijnhoven YT, De Jager CM, Heuvelink AE, Van Der Zwaluw WK, Maas HM, Van Pelt W, Wannet WJ. 2002. Enhanced laboratory-based surveillance of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* o157 in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol* 21:513-522.
42. Vlcek Z, Svoobodova R. 1980. The dynamics of bacterial contamination of the genital organs in sows during the puwerperium. *Acta Vet Brno* 49:231-236.
43. Wasteson Y, Epidemiology of verocytotoxin-producing *E. coli* non-ruminant animals. In: Duffy G, Garvey P, McDowell D, eds. *Verocytotoxigenic*

*Escherichia coli*. Trumbull (USA); Food & Nutrition Press Inc., 2001, pp.149-160.

### Figuras

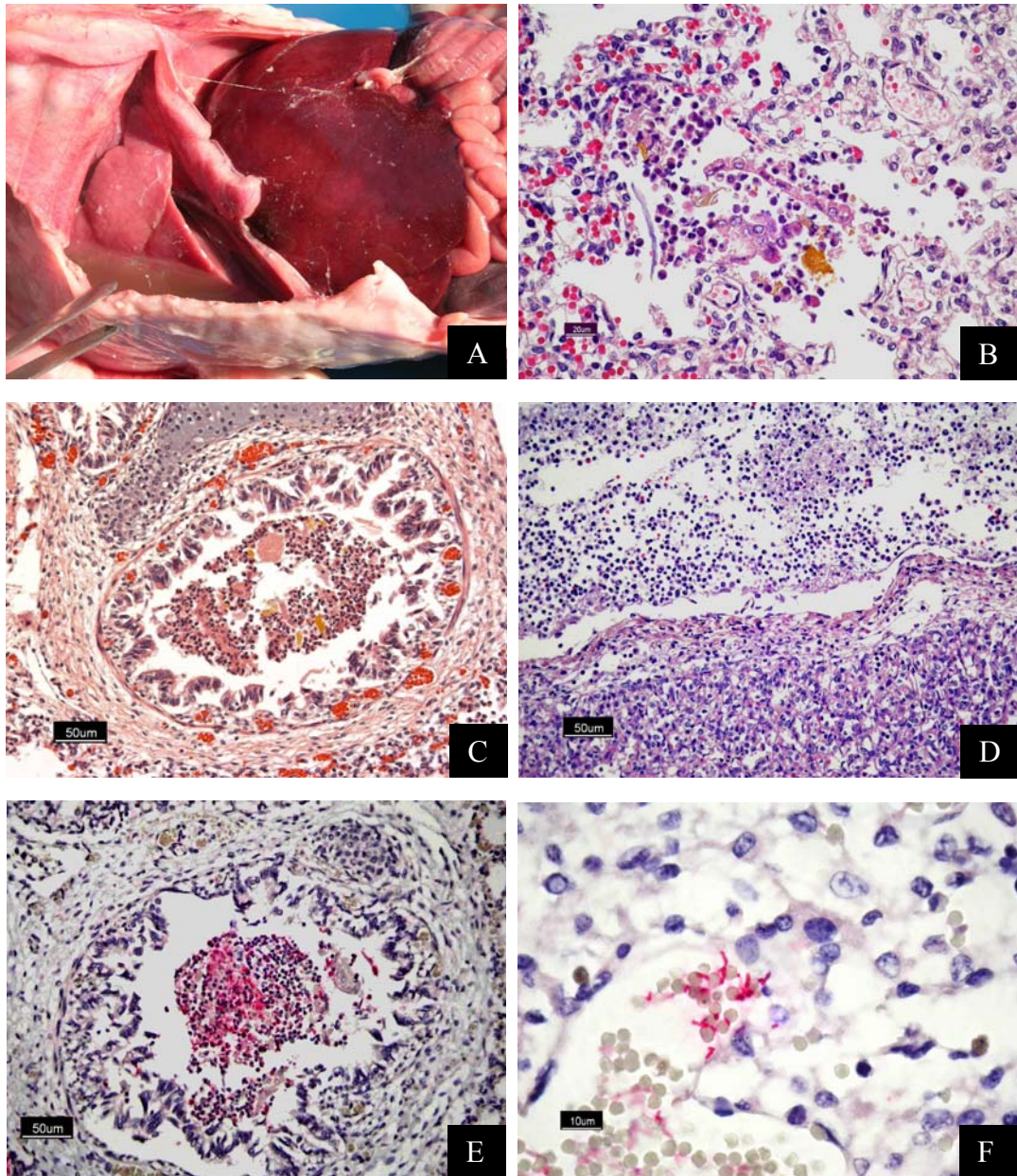


Figura 1. Aborto suíno por *Escherichia coli* O157: H7. **A.** Feto suíno. Cavidade torácica e abdominal. Líquido de coloração vermelho-amarelada e deposição de fibrina no parênquima do pulmão, fígado e cólon. **B.** Pulmão. Pneumonia supurativa focal moderada com presença de mecônio. HE, obj. 40x. **C.** Pulmão. Bronquite supurativa focal acentuada. HE, obj. 40x. **D.** Pulmão. Pleurite supurativa difusa acentuada. HE, obj. 20x. **E.** Pulmão. Antígenos viras de *E. coli* O157: H7 no interior de neutrófilos. Imunoistoquímica, fosfatase alcalina, obj. 40x. **F.** Linfonodo. *E. coli* O157: H7 fortemente marcadas em vermelho. Imunoistoquímica, fosfatase alcalina, obj.100x.

## 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 4.1 Levantamento das causas de aborto suíno

Causas de aborto foram determinadas em 25,5% dos casos, similar ao encontrado em outros estudos (HOLTER *et al.*, 1976; KIRKBRIDE *et al.*, 1978; MALDONADO *et al.*, 2005). Os resultados desse levantamento sugerem que o parvovirus suíno (PPV) seja uma importante causa de mumificação fetal e natimortalidade em fêmeas suínas no sul do Brasil, sendo encontrado em tecidos fetais em 14,5% dos casos. Estudos de causa de aborto têm demonstrado uma freqüência de infecção por PPV entre 4,9 a 29,2% (KIRKBRIDE *et al.*, 1978; BROLL *et al.*, 1993). Neste levantamento, provavelmente a freqüência de infecção observada esteja sendo subestimada tendo em vista que o número de fetos analisados por granja foram baixos. Estudos têm demonstrado que lesões histopatológicas significativas são dificilmente observadas em fetos infectados experimentalmente por parvovirus suíno (CULTIP *et al.*, 1975). Em contraste, Lenghaus *et al.* (1978) observou necrose celular e corpúsculos de inclusão no fígado, pulmão, rim e cerebelo de fetos inoculados em 35, 50 e 60 dias de gestação. Estes achados não foram observados no presente estudo. Entretanto, infiltrados inflamatórios mononucleares em fragmentos de coração e rim foram visualizados em dois casos, sugerindo que a presença de lesões inflamatórias está diretamente relacionada com a idade e o tempo em que o feto é infectado pelo agente (PROZESKY *et al.*, 1980). Lesões microscópicas são mais pronunciadas em fetos suínos inoculados aos 71 dias de gestação, sendo muito mais severas quando inoculadas em 79 a 80 dias, e ausente em fetos inoculados aos 96 dias de idade gestacional (PROZESKY *et al.*, 1980). Fetos de idade gestacional mais avançada são menos susceptíveis a infecção por PPV sendo isso explicado pela ausência de lesões vasculares encontradas em estudos anteriormente realizados (PROZESKY *et al.*, 1980). Sendo assim, sugere-se que as lesões histológicas observadas nos dois produtos fetais do presente estudo tenham sido estabelecidas em um contato prévio com o vírus antes do período de imunocompetência fetal (65-75 dias) resultado assim, no aparecimento das lesões microscópicas acima mencionadas.

Diversas técnicas de diagnóstico têm sido realizadas com o objetivo de detectar o PPV em tecidos fetais (MENGELING *et al.*, 1976; CAO *et al.*, 2005; RITZMANN *et*

*al.*, 2005). No presente estudo, a técnica de PCR demonstrou resultados mais satisfatórios que a técnica de imunistoquímica na detecção de PPV. Este resultado já era esperado, tendo em vista que trabalhos prévios apontam a PCR como método de diagnóstico mais sensível na detecção de PPV que o isolamento viral e a imunohistoquímica (MENGELING *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2004). Outro fator que contribui para este aumento na sensibilidade é o fato de que na PCR a quantidade de tecido utilizada é maior, enquanto que na imunistoquímica o tecido utilizado fica limitado a um corte histológico de 5µm diminuindo assim as chances de se obter um resultado satisfatório (KIM *et al.*, 2004).

O Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2), recentemente descoberto como causa de falhas reprodutivas em fêmeas suínas, foi observado em 5,9% dos fetos analisados. Este resultado difere ao encontrado por Kim *et al.* (2004), Ritzmann *et al.* (2005) e Lyoo *et al.* (2001) que em um estudo com fetos abortados observaram uma prevalência de PCV2 em 13,1%, 27,1% e 46,5% respectivamente. Estudos recentes demonstram que a infecção por PCV2 cursa com aborto, mumificação fetal e natimortalidade em fêmeas suínas (KIM *et al.*, 2004; HARDING 2004). No presente estudo, a detecção de antígenos de PCV2 em suínos natimortos sugere que este agente possa estar presente em grande quantidade dentro de fetos infectados no útero e que a transmissão vertical pode ser uma importante forma de infecção. Adicionalmente, a transmissão transplacentária por PCV2 em porcas tem sido relatada (LADEKJAER-MIKKELSEN *et al.*, 2001). A patogênese de infecção por PCV2 em fêmeas suínas prenhas parece ser diferente da infecção pelo vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), na qual o vírus atravessa a placenta somente na fase final da gestação (CHRISTIANSON *et al.*, 1993). Fetos infectados por PRRS podem apresentar áreas de edema e hemorragia que variam de 1-2cm no cordão umbilical e que microscopicamente correspondem a áreas de arterite hemorrágica necrosante (LAGER *et al.*, 1996). No presente estudo, lesões similares às acima mencionadas não foram observadas em nenhum dos fetos analisados e o teste de imunistoquímica foi negativo em todos os fragmentos de pulmões fetais analisados. Este resultado reforça o que foi previamente mencionado por Ciacci-Zanella *et al.* (2004) em que evidências da presença de PRRSV no Brasil não foram ainda observadas.

Inúmeros agentes bacterianos como *Leptospira* sp.; *Escherichia coli*, *Erysipela rhusiopathiae*, *Mycobacterium avium*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Arcobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Actinobacillus suis* dentre outros têm sido



apontados como causa de falhas reprodutivas em fêmeas suínas (ELLSWORTH *et al.*, 1979; YAEGER *et al.*, 1996; ON *et al.*, 2002; HOFFMANN *et al.*, 2002; MAUCH *et al.*, 2004). Levantamentos de causa de aborto em suínos relatam uma prevalência de 8,2% a 16,5% por agentes bacterianos (BROLL *et al.*, 1993; KIRKBRIDE *et al.*, 1978). No presente estudo, o critério utilizado para definir aborto de origem bacteriana baseou-se no diagnóstico histopatológico através da visualização de lesões inflamatórias supurativas em amostras de tecidos fetais e crescimento puro e ou abundante da bactéria envolvida como já foi previamente descrito por Holler *et al.*, 1994. Dentre os agentes bacterianos isolados (Tabela 2), *Escherichia coli* O157: H7 apresenta uma importância bastante significativa dentro do isolado em fetos suínos, devido ao freqüente relato de infecção em humanos (MEAD *et al.*, 1998). Em cada ano nos Estados Unidos, é estimado que *E. coli* O157: H7 cause aproximadamente 2.168 hospitalizações e 61 mortes de seres humanos (MEAD *et al.*, 1999), sendo apontada, também, como uma importante causa de falha renal aguda em crianças (NEILL *et al.*, 1987; SIEGLER *et al.*, 1994). Ruminantes e em particular bovinos têm sido considerados os principais reservatórios de verotoxina *Escherichia coli* O157 (VTEC), sendo o alimento de origem bovina como, por exemplo, carne e produtos lácteos os mais freqüentemente associados a epidemias (GRIFFIN *et al.*, 1991). Embora suínos não sejam considerados a maior fonte de infecção pela VTEC O157 (WASTESON, 2001), estudos anteriores indicam que produtos suínos não devem ser negligenciados na investigação de epidemias (CONEDERA *et al.*, 2007). No presente caso, não foi possível estabelecer a porta de entrada ao trato genital pela *E.coli* O157: H7 causando o quadro de abortamento. Entretanto, rotas de infecção como inseminação artificial, infecção urogenital ou higiene vulvar insuficiente podem estar relacionadas (CARBIN *et al.*, 1996). A visualização de lesões fetais caracterizadas por pleurite e broncopneumonia supurativa no feto suíno abortado, sugere um quadro de hipóxia fetal levando a inalação de líquido amniótico contendo a bactéria (ALONSO-SPILSBURY *et al.*, 2005).

*Erysipelothrix sp* também foi isolada de um feto suíno abortado que apresentava lesões macroscópicas e microscópicas de pele. Infecções por *Erysipelothrix sp* têm sido demonstradas como causa de aborto em fêmeas suínas em final de gestação (KEMENES *et al.*, 1971), cujos sinais clínicos caracterizados por apatia, anorexia, febre e descargas vulvares (HOFFMANN *et al.*, 2002) são freqüentes. No presente caso, lesões microscópicas caracterizadas por perivasculite mononuclear foram os achados mais significativos, sendo indicativos de infecção por *Erysipelothrix rhusiopathiae* (WOOD

*et al.*, 1999). A presença de lesões de pele em produtos fetais tem sido fortemente associada a infecções micóticas, como resultado do contato da pele ao líquido amniótico contaminado por fungos (MILLER *et al.*, 1977). Entretanto no presente caso, estruturas de imagem negativa, semelhantes a hifas e o cultivo micológico foram negativos. O diagnóstico baseou-se nos achados macroscópicos e microscópicos associado ao crescimento puro de *E. rhusiopathiae* em amostras de pele, pulmão, fígado e conteúdo do estômago.

Do total de 117 fetos analisados, 86 (73,5%) tiveram diagnóstico indeterminado. Este resultado reforça a idéia de que somente 30% a 40% dos casos apresentam um diagnóstico etiológico definitivo (BARLOW, 1998). A análise estatística revelou uma forte associação entre o número de fetos enviados com o diagnóstico definitivo. Ficou visualizado que as chances de se obter um diagnóstico definitivo aumentam em 3,47 vezes quando enviados quatro ou mais fetos suínos abortados para a análise, reforçando a importância de envio de mais de um produto de abortamento para aumentar as chances de sucesso no diagnóstico.

#### **4.2 Co-infecção entre Circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e Parvovírus suíno (PPV) em fetos suínos abortados**

Co-infecção entre PCV2 e PPV foi observada em 2,5% dos fetos suínos analisados, sendo similar ao encontrado por Altherr *et al.* (2003). Estudos recentes têm demonstrado a presença de PPV em suínos infectados naturalmente por PCV2 (ALLAN *et al.*, 1999) em casos de SDMS.

Embora a SDMS tenha sido recentemente observada em rebanhos suínos de todo mundo, problemas reprodutivos caracterizados por aborto, mumificação fetal associado a presença de lesões cardíacas tem sido relatada com certa frequência (WEST *et al.*, 1999; JANKE 2000; OHLINGER *et al.*, 2000; O'CONNOR *et al.*, 2001). Lesões cardíacas de fetos suínos abortados infectados por PCV2 são caracterizadas por dilatação ventricular uni ou bilateral e áreas pálidas no miocárdio que microscopicamente correspondem a extensas áreas de necrose e degeneração de cardiomiócitos associados a intenso infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (WEST *et al.*, 1999). No presente estudo, lesões similares as acima mencionadas foram observadas em sete produtos fetais analisados, nos quais grande quantidade de antígenos virais foi observada no coração pela técnica de

imunoistoquímica, sugerindo que a distribuição do vírus está relacionada com células de alta taxa mitótica, semelhante ao que ocorre em miócitos cardíacos de fetos (SANCHÉZ *et al.*, 2003). Em contraste, em um recente estudo não conseguiram detectar antígenos de PCV2 através da técnica de imunoistoquímica e hibridização *in situ* no coração de fetos suínos abortados, sendo esta marcação observada em órgãos linfóides (Park *et al.* 2005). Segundo os autores, a variedade nas amostras de PCV2, diferenças entre o período de imunocompetência fetal e tempo de infecção, dentre outros fatores, são as principais razões observadas que podem estar relacionadas à diferença de marcação. Adicionalmente, a presença de lesões no miocárdio parece estar relacionada com o estabelecimento da infecção no começo da gestação (PARK *et al.*, 2005).

Muitos autores relatam que a SDMS seja causada pela co-infecção do PCV2 com outros patógenos, como o PPV (KIM *et al.*, 2003), PRRS (ROVIRA *et al.*, 2002) e torque teno vírus (TTV) (KARAKOWKA *et al.*, 2008; MARTIN-VALLS *et al.*, 2008). Acredita-se que estes vírus, por estimularem a migração e proliferação de células histiocíticas, bem como a síntese de DNA e citocinas, propiciariam as condições ideais para o desenvolvimento de PCV2 (KIM *et al.*, 2003). Reproduziu-se o quadro típico de SDMS em leitões gnotobióticos infectados com PCV2 e co-infetados por PPV (ALLAN *et al.*, 1999; KRAKOWKA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2003). Por outro lado, em um outro estudo experimental, não houve reprodução dos sinais clínicos e das lesões anatómicas e histopatológicas características associadas à SDMS em leitões SPF (“specific pathogen-free”) que receberam colostro, infectados experimentalmente com PCV-2 e co-infectados com PPV (FERNANDES *et al.*, 2003).

No presente estudo três fetos suínos infectados por PCV2 apresentaram co-infecção com PPV, sendo que as lesões observadas microscopicamente foram mais severas que em fetos infetados somente por PCV2. A co-infecção agrava as lesões (FENAUX *et al.*, 2002). Acredita-se que por estimular a produção de histiócitos, o PPV criaria condições ideais para a replicação do PCV2, devido ao aumento da síntese de DNA (KIM *et al.*, 2003).

Em casos de SDMS é comum encontrarmos, além do PCV2, outros agentes. Em um estudo retrospectivo na Coreia, com 133 animais que apresentavam emagrecimento pós-desmame, todos estavam infectados por PCV2, porém só em 20 animais foi detectado apenas PCV2; 43 animais estavam infectados, concomitantemente com o *Haemophilus parasuis*, com PRRS, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e com o vírus da Influenza Suína – SIV (KIM *et al.*, 2002). Adicionalmente co-infecção com

*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. (SORDEN *et al.*, 2000) e, menos frequentemente *Pneumocystis carinii* (SANCHES *et al.*, 2006; CLARK 1997) e *Cryptosporidium parvum* (NUNES *et al.*, 2003) também têm sido relatadas. No presente estudo, PRRSV não foi observado em nenhum produto fetal analisado, fortalecendo a idéia de que este vírus não está presente no Brasil (CIACCIZANELLA *et al.*, 2004). Edema de mesocolon, lesão observada em infecções por *Escherichia coli*, foi visualizada em dois fetos suínos abortados em associação com PCV2, a qual isolou-se em cultura pura a partir de amostras de fígado, pulmão e conteúdo do estômago, sugerindo que PCV2 possa ter contribuído para estas lesões, uma vez que o vírus causa dano vascular (KENNEDY *et al.*, 2000).



### 4.3 CONCLUSÕES

O PPV foi observado em 14,5% dos casos sendo considerado um importante agente etiológico como causa de mumificação fetal e natimortalidade em fetos suínos no Sul do Brasil.

Os resultados deste estudo apontam a consistente associação entre PCV2 e PPV em fetos suínos abortados confirmando o aparente sinergismo destes dois vírus causando severa lesão no miocárdio de fetos abortados.

O coração foi o órgão que obteve melhor marcação de imunoistoquímica para PCV2 em fetos suínos abortados, seguido de órgãos linfóides, sugerindo que o coração é o órgão alvo onde ocorre a replicação viral.

O PRRS não foi identificado em nenhum produto fetal analisado reafirmando a hipótese de que este vírus não esteja presente no Brasil.

Agentes bacterianos com *Escherichia coli* O157:H7 e *Erysipelothrix sp* dentre outros devem ser considerados como causa de aborto em suínos no Sul do Brasil.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACLAND, H. M.; LITTLEJOHNS, I. R. Encephalomyocarditis virus infection of pigs. I. An outbreak in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 409-415, 1975.
- ALLAN, G.; KRAKOWKA S.; ELLIS J. PCV2 ticking time bomb? **Pig Progress**, v.18, p.14-15, 2002.
- ALMOND, G. W.; FRIENDSHIP R. M.; BOSU, W. T. K. Autumn abortions in sows. **Canadian Veterinary Journal**, v. 26, p. 162-163, 1985.
- ALONSO-SPILSBURG, M. *et al.* Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 90, p. 1-30, 2005.
- ALTHERR, B. *et al.* Detection of porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV) in aborted fetuses. **4<sup>th</sup> International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Disease**, Rome, p. 218-219, 2003.
- BARLOW, A. A guide to the investigation of porcine abortion/stillbirth. **In Practice**, v. 20, p. 559-564, 1998.
- BERSANO, J.G. *et al.* Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para parvovírus suíno no Estado de São Paulo. In: Reunião anual do Instituto Biológico, v.6, São Paulo, SP. **Resumos**. São Paulo, p. 17, 1993.
- BOGDAN, J. *et al.* Association of porcine circovirus 2 with reproductive failure in pigs: a retrospective study. **Canadian Veterinary Journal**, v.42, n.7, p.548-550, 2001.
- BOLIN, C. A, *et al.* Reproductive failure associated with *Leptospira interrogans* serovar *Bratislava* infection of swine. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 152-154, 1991.
- BORGES, V. F. *et al.* Risk factors for stillbirth and foetal mummification in four Brazilian swine herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 70, p. 165-176, 2005.
- BROLL, S. *et al.* The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 40 n. 9-10, p. 641-653, 1993.
- CAO, S. *et al.* Detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus and porcine pseudorabies virus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR. **Veterinary Research Communication**, v.29, n.3, p.263-269, 2005.
- CARABIN, H. *et al.* Detection of cervical bacterial contamination in swine by two methods of swabbing in relation to artificial insemination. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 60, p. 40-44, 1996.

CARIOLET, R. *et al.* Experimental infection of pregnant SPF sows with PCV2 through tracheal and muscular routes. **Proceedings... European Society for Veterinary Virology**, PMWS, p.128, 2001a.

CARIOLET, R. *et al.* Consequences of PCV2 experimental infection of non immune SPF sows using the intra uterine route. **Proceedings... European Society for Veterinary Virology**, PMWS, p.129, 2001b.

CARR, J.; WALTON J. R. Examination of stillborn piglets. **In Practice**, v. 12, p. 154-155, 1990.

CAVANAGH, D. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. **Archives of Virology**, v. 142, p. 629-633, 1997.

CHIANINI, F. *et al.* Immunohistochemical characterization of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 94, p. 63-75, 2003.

CHOI, C.; CHAE, C.; CLARK, E. G. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korea pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 151-153, 2000.

CHRISTENSEN, N. H. Dead piglets – aging dead piglets as an aid in problem solving. **Pig Health and Production**, v. 161, p. 21-22, 1994.

CHRISTIANSON, W. T. *et al.* Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, p. 485-488, 1992a.

CHRISTIANSON, W. T. *et al.* Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 262-268, 1992b.

CHRISTIANSON, W. T. *et al.* Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mild-gestation sows and fetuses. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 262-268, 1993.

CIACCI-ZANELLA, J. R. *et al.* Lack of evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in domestic swine in Brazil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 449-455, 2004.

CONEDERA, G. *et al.* A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 311-314, 2007.

CORRÊA, A. M. R. *et al.* Aspectos clínico-patológicos associados à circovirose suína no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 9-13, 2006.

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 Journal Veterinary Research**, v. 36, p. 1751-1754, 1975.

DEE, S. A. Viral cause of porcine reproductive failure – part II. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 17, p. 1159-1170, 1995.

DIAL, G. D. et al. Reproductive failure: Differential diagnosis. In Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, et al (eds), **Disease of Swine**, 7<sup>th</sup> edition. Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1992.

DONE, S.; PATON, D. J.; WHITE, M. E. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. **The British Veterinary Journal**, v. 152, p. 153-174, 1996.

ELLIS, J. A. *et al.* Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 21-27, 2000.

ELLIS, W. A. *Leptospira australis* infection in pigs. **Pig Veterinary Journal**, v. 22, p. 83-92, 1989.

ELLIS, W. A. *et al.* Prevalence of *Leptospira* infection in aborted pigs in Northern Ireland. **Veterinary Record**, v. 18, p. 63-65, 1986.

ELLSWORTH, S. R. *et al.* *Mycobacterium avium* abortion in a sow. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 3, p. 310-317, 1979.

ENGLISH, P. R.; WILKINSON, V. 1982. Management of the sow and litter in late pregnancy and lactation in relation to piglet survival and growth. In: Cole, D.J.A., Foxcroft, GR (Eds), *Control of Pig reproduction*. Butterworths, London, p. 479-506.

FAINE, S. *et al.* **Leptospira and leptospirosis**. 2ed. Melbourne: Australia, MediSci, p. 272, 1999.

FARR, R. W. Leptospirosis. **Clinical Infectious Disease**, v. 21, p. 1-6, 1995.

FENAUX, M. *et al.* Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. **Journal of Virology**, v. 76, n. 2, p. 541-551, 2002.

FERNANDES, L. T. *et al.* Avaliação da patogenicidade do circovirus suíno tipo 2 (PCV2) isolado no Estado de Santa Catarina através de coinfeção experimental com parvovirus suíno. **Anais 11<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos**, Goiânia, p. 89-90, 2003.

- FRANÇA, T. N. Surto de circovirose (síndrome definhante multissistêmica de suínos desmamados) no Estado do Rio de Janeiro. **Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. 110p, 2004.
- FRANTZ, F.J. *et al.* **Micobacteriose Neonatal em suínos**. XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. p.13-28. Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2002.
- GALINA, L. *et al.* Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. **The Veterinary Record**, v.134, p.60-64, 1994.
- GANIER, J. H. Encephalomyocarditis virus infection in Florida, 1960-1966. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 151, p. 421-425, 1967.
- GILPIN, D.F. *et al.* In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 94, p.149-161, 2003.
- GILPIN, D. F. *et al.* Studies on the in vitro in vivo effect of porcine circovirus type 2 infection of porcine monocytic cells. Proc. ssDNA Viruses of Plants, Birds, Pigs and primates. **Zoopole Développement (ISPAIA), Saint-Malo**, France, p. 97, 2001.
- GOUVEIA, A. M. G.; GOMEZ, M. C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemoaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, p. 17-22, 1984.
- GRESHAM, A. Infectious reproductive disease in pigs. **In Practice**, p.466-473, 2003.
- GRIFFIN, P. M.; TAUXE, A. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other entero-haemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiology Reviews**, v.13, p.60-98, 1991.
- GUTIÉRREZ-MARTÍN, C. B. *et al.* Simultaneous serological evidence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRS, Aujeszky's disease and influenza viruses in Spanish finishing pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 9-13, 2000.
- HALBUR, P. G. *et al.* Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old cesarean-derived, colostrums-deprived pig model. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p.11-20, 1996.
- HALBUR, P. G. *et al.* Development of streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.254-257, 1994.
- HARDING J.; CLARK E. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Production**, v.5, p.201-203, 1997.
- HARDING, J. C. S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p.131-135, 2004.

HOFFMANN, C. W.; BILKEI, G. Case Study: chronic Erysipelas of the sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p.119-120, 2002.

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

HOLTER, J. A. Survey of laboratory findings in porcine abortion. **Proceedings 19<sup>th</sup> Annual Meeting. American Association Veterinary Laboratory Diagnostic**, v.7-9, 1976.

HSU, F. S. *et al.* Placental lesions caused by pseudorabies virus in pregnant sows. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 177, n. 7, p. 636-641, 1980.

JANKE B. Case report: porcine circovirus as a cause of reproductive problems. **Proceedings of the Iowa Veterinary Medicine Association**, Ames, p.101, 2000.

JANKE, B. Case report: porcine circovirus as a cause of reproductive problems. **Proceedings, Iowa Veterinary Medicine Association, Ames**, p.101, 2000.

JOLIE, R.; RUNNELS, P.; MCGAVIN, D. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in a group of caesarian derived colostrums deprived pigs. **Proceedings... 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress**, 2000.

JOO, H. S.; DONALDSON-WOOD, C. R.; JOHNSON, R. H. A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, n. 9, p.422-424, 1976.

JOO, H. S.; KIM, H. S.; LEMAN, A. D.; Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. **Archives of Virology**, v.100, n.1-2, p.131-134, 1988.

JOO, H.S. Encephalomyocarditis virus. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ. (Eds), **Disease of Swine**, 7<sup>th</sup> ed. Wolfe Publishing, London, p. 257-262, 1992.

KEE, S. H. *et al.* Detection of Leptospira DNA by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p.1035-1039, 1994.

KEMENES, F.; SZEKY, A. Contribution to the diagnosis of infectious swine abortion. **Zentralblat Veterinärmedizin B**, v. 18, p.170-176, 1971.

KENNEDY, S. *et al.* Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **Journal Comparative Pathology**, v.122, p. 9-24, 2000.

KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA, W. *et al.* Detection of porcine circovirus 2 (PCV2) DNA by nested PCR from formalina-fixed tissues of post-weaning

multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 64, n.5, p. 449-452, 2002.

KIM, J. *et al.* Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 64, p.57-62, 2002.

KIM, H. S., JOO, H. S., BERGELAND, M. E. Serologic, virologic, and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.1, p.101-104, 1989.

KIM, J. *et al.* Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR. **The Veterinary Record**, v. 149, p.304-305, 2001.

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 coinfecting pigs. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 45-50, 2004.

KIM, J.; CHAE, C. Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exsudative epidermitis in pigs. **Veterinary Journal**, v.167, p.104-106, 2004.

KIM, J.; CHAE, C. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.67, p.133-137, 2003.

KIRKBRIDE, C. A.; MCADARAGH, J. P. Infectious Agents Associated with Fetal and Early Neonatal Death and Abortion in Swine. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 172, n. 4, p. 480-483, 1978.

KIUEP, M.; STEVENSON, G.W.; MITTAL, S.L.K. *et al.* Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. **Veterinary Pathology**, v. 35, p.303-307, 1998.

KNUDSON, W. U.; KIRKBRIDE, C.A. Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA). **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 181-185, 1992.

KOBAYASHI, H. *et al.* *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lung of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 58, n. 2, p.109-113, 1996.

KOENEN, F.; DE CLERQ, K.; STROBBE, R. Isolation of encephalomyocarditis virus in the offspring of swine with reproductive failure in Belgium. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, v. 60, p.113-115, 1991.



KRAKOWKA, S. *et al.* Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of PMWS in gnotobiotics swine by co-infection with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine parvovirus (PPV). **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 254-263, 2000.

KRAKOWKA, S. *et al.* Porcine genogroup 1 torque teno virus (G1-TTV) potentiates both PCV2 & PRRSV infections in gnotobiotic swine. **Proceedings of 20<sup>th</sup> IPVS Congress Durban, South Africa**, p.99, 2008.

KRITAS, S.K. *et al.* Field evaluation with the use of new vaccine on natural occurring outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In: International Symposium on PRRSV, II, 1995. **Proceedings...Copenhagen**, p. 35, 1995.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S. *et al.* Transplacental infection with PCV2 associated with reproductive failure in a gilt. **The Veterinary Record**, v. 148, n. 24, p.759-760, 2001.

LAGER, K. M.; ACKERMANN, M. R. Pulmonary lesions in fetuses exposed in utero to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 480-483, 1994.

LAGER, K.M.; HALBUR, P.G. Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 275-282, 1996.

LAGER, K.M.; MENGELING, W.L.; BROCKMEIER, S.L. Limited cross-protection between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant swine. In: International Symposium on PRRSV, II, 1995. **Proceedings...Copenhagen**, p. 10, 1995.

LAROCHELE, R.; SAUVAGEAU, R.; MAGAR, R. Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 513-515, 1994.

LAROCHELLE, R. *et al.* PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boars semen. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p.4629-4632, 2000.

LE TALLEC, B. *et al.* Longitudinal study of boars naturally infected by PCV2. **Proceedings... European Society Veterinary Virology, PMWS**, p.120, 2001.

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.

LINKS, I. J. *et al.* An association between encephalomyocarditis virus infection and reproductive failure in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p.150-152, 1986.  
LOVE, R. J. Seasonal infertility in pigs. **The Veterinary Record**, v. 109, p. 407-409, 1981.



- LOVE, R.J.; GREWAL, A.S. Reproductive failure in pigs caused by encephalomyocarditis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 128-129, 1986.
- LYOO, K.; PARK, Y.; PARK, B. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. **Journal Veterinary Science**, v. 2, n. 3, p.201-207, 2001.
- MADEC, F. *et al.* Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 223-233, 2000.
- MAGAR, R. *et al.* Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 57, p.300-304, 1993.
- MALDONADO J. *et al.* 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.
- MARDASSI, H. *et al.* Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. **Journal Clinical Microbiology**, v. 32, p. 2197-2203, 1994.
- MARTINS, R. M. *et al.* Sorologia de parvovírus suíno em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: **Congresso nacional de veterinários especialistas em suínos**, v. 1, Curitiba, PR. Resumos. Curitiba, p. 39, 1984.
- MARTIN-VALLS, G. *et al.* Torque teno virus tissue distribution in healthy, postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome affected pigs by in situ hybridization. **Proceedings of the 20<sup>th</sup> IPVS Congress, Durban, South Africa**, p.96, 2008.
- MAUCH, C.; BILKEI, G. *Actinobacillus suis*, a potential cause of abortion in gilts and low parity sows. **The Veterinary Journal**, v. 168, p.186-187, 2004.
- McERLEAN, B. A. Abortion in a sow due to the avian tubercle bacillus. **Irish Veterinary Journal**, v. 13, p.198-200, 1959.
- MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. *Escherichia coli* O157:H7. **The Lancet**, v. 352, p. 1207-1212, 1998.
- MENGELING, W. L.; CUTLIP, R. C. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1393-1400, 1976.
- MENGELING, W. L. *et al.* Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 834-839, 1996.

- MENGELING, W. L.; LAGER, K. M.; VORWALD, A. C. Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, p.1391-1398, 1994.
- MENGELING, W. L.; LAGER, K.M.; VORWALD, A. C. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.199-210, 2000.
- MILLER, R. B. A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortion. **Canadian Veterinary Journal**, v.18, n. 4, p. 87-95, 1977.
- MINIATS, O. P.; SPINATO, M. T.; SANFORD, S. E. *Actinobacillus suis* septicemia in mature swine. Two outbreaks resembling erysipelas. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, p. 943-947, 1989.
- MOLNÁR, T. *et al.* Occurrence of porcine dermatitis and nephropaty syndrome in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 1, p. 5-16, 2002.
- MOTA-ROJAS, D. *et al.* Uterine and fetal asphyxia monitoring in parturient sows treated with oxytocin. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p.131-141, 2005.
- MUIRHEAD, M. R.; ALEXANDER, T. J. L. **Managing pig health and the treatment of disease. A reference for the farm.** United Kingdom: M. Enterprises, 608p, 1997.
- MURNAME, T. G.; CRAIGHEAD, J. E.; MONDRAGON, H. Fatal disease of swine due to Encephalomyocarditis virus. **Science**, v. 131, p. 498-499, 1960.
- NEILL, M.A *et al.* *Escherichia coli* O157: H7 as the predominant pathogen associated with hemolytic uremic syndrome: a prospective study in the Pacific Northwest. **Pediatrics**, v. 80, p. 37-40, 1987.
- NEILL, S.D. *et al.* Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophila* sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 342-256, 1985.
- NEUMAN, E.J *et al.* Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 3, p. 385-392, 2005.
- NUNES, A. *et al.* Coinfection by *Cryptosporidium parvum* and porcine circovirus type 2 in weaned pigs. **Journal Veterinary Medicine B, Infectious diseases and veterinary public health** v. 50, n. 5, p. 255-258, 2003.
- O'CONNOR, B. *et al.* Multiple porcine circovirus 2 associated abortion and reproductive failure in a multiple-site swine production unit. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 551-553, 2001.
- OHLINGER, V.F.; SCHMIDT, U.; PESH, S. Studies on pathogenic aspects of the post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Proc. 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress**, 2000.

OLIVEIRA, S.J. *et al.* Classification of *Arcobacter* species isolated from aborted pig fetuses and sows with reproductive problems in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 347-354, 1997.

OLIVEIRA, S. J. *et al.* Isolation of *Arcobacter* (*Campylobacter*) *cryaerophia* from aborted pig fetuses. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 25, p. 171-172, 1995.

ON, S. L. W. *et al.* Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. Isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 159-167, 2002.

ONUKEI, A. *et al.* Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 61, n. 10, p. 1119-1123, 1999.

OPRIESSING T.; MENG X.; HALBUR P.G. Porcine circovirus type 2-associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal Veterinary of Diagnostic Investigation**, v.19, p. 591-6115, 2007.

OSWEILER, G. D.; STAHR, H. M.; BERAN, G. W. Relationship of micotoxins to swine reproductive failure. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 73-75, 1990.

PARK, B. K.; YOON, I. J.; JOO, H. S. Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, p. 320-323, 1996.

PARK, J. S. *et al.* Birth abnormalities in pregnant sows infected intranasally with porcine circovirus 2. **Journal Comparative Pathology**, v. 132, p. 139-144, 2005.

PELTONIEMI, O. A. T.; TAST, A.; LOVE, R. J. Factors effecting reproduction in the pig: seasonal affects and restricted feeding of the pregnant gilt and sow. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 173-184, 2000.

PENRITH, M. L.; SPENCER, B. T. *Erysipelothrix rhusiopathiae* infections. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infections disease of livestock**. 2.ed. Oxford: Oxford University, v.3, p.1908-1912, 2004.

PENSAERT, M. B.; SÁNCHEZ, R. E.; NAUWYNCH, H. J. Transmission of porcine circovirus type 2 from the sow to the litter. **Proceedings of the European Society on Veterinary Virology, PMWS**, p. 84-85, 2001.

PLANA DURAN, J. *et al.* Vaccine against porcine and reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In: International Symposium on PRRSV, II, 1995. **Proceedings...Copenhagen**, p. 37, 1995.

POL, J. M. A. *et al.* Pathological, ultrastructural, and immune-histochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease

(synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). **The Veterinary Quarterly**, v. 13, p. 137-143, 1991.

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

PRUNIER, A.; BRAGANÇA, M. M.; DIVIDICH, J. L. Influence of high ambient temperature on performance of reproductive sows. **Livestock Production Science**, v. 52, p. 123-133, 1997.

PRUNIER, A. *et al.* Environmental and seasonal influences on the return-to-oestrus after weaning in primiparous sows: a review. **Livestock Production Science**, v. 45, p. 103-110, 1996.

RAMÍREZ, E.; *et al.* Evaluation of the pathogenicity and transmissibility of a Chilean isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Transboundary and Emerging Disease**, v. 55, p. 115-124, 2008.

RITZMANN, M. *et al.* Prevalence and association of porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in aborted fetuses, mummified fetuses, stillborn and nonviable neonatal piglets. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 112, n. 9, p. 348-351, 2005.

ROSELL, C. *et al.* Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. **Journal Comparative Pathology**, v. 120, n. 1, p. 59-78, 1999.

ROSSOW, K.D. *et al.* Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 95-99, 1996.

ROVIRA, A. *et al.* Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Porcine Circovirus 2. **Journal of Virology**, v. 76, n. 7, p. 3232-3239, 2002.

SANCHES, E.M.C. *et al.* Co-Infection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *suis* and Porcine Circovirus-2 (PCV2) in pig lungs obtained from slaughterhouses in southern and midwestern regions of Brazil. **The Journal of Eukaryotic Microbiology** v. 53, n.S1, p. 92-94, 2006.

SÁNCHEZ, R. E. *et al.* Change of porcine circovirus 2 target cells in pigs during development from fetal to early postnatal life. **Veterinary Microbiology**, v. 95, p. 15-25, 2003.

SANFORD, S. E.; JOSEPHSON, G. K.; REHMTULLA, A. J. *Actinobacillus suis* infection in pigs in southwestern Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 443-447, 1990.

SANFORD, S. E. PCV2-related reproductive failure in start-up herds. **Proceedings. 17<sup>th</sup> International Pig Veterinary Sociation Congress**, p. 1, 2002.

SARRADELL, J. *et al.* PMWS in Argentina. **The Veterinary Record**, Letters, v. 9, p. 323, 2002.

SCANZIANI, E. *et al.* Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 50, n. 2, p. 229-232, 1991.

SCRUGGS, D. W.; SORDEN, S. D. Proliferative vasculopathy and cutaneous hemorrhages in porcine neonates infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 339-342, 2001.

SEGALÉS, J. *et al.* Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 137-149, 2004.

SEGALÉS, J. *et al.* First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 600-601, 1997.

SIEGLER, R.L. *et al.* A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. **Pediatrics**, v. 94, p. 35-40, 1994.

SOARES, R. M. *et al.* Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. **The Journal of General Virology**, v. 84, p.1505-1515, 2003.

SOARES, R. M. *et al.* Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of Virology Methods**, v. 78, p. 191-198, 1999.

SOBESTIANSKY, J. *et al.* **Clínica e Patologia Suína**. Laboratórios Pfizer Ltda, 1999.

SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. **Doenças de Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, 770p, 2007.

SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health and Production**, v.8, p. 133-136, 2000.

SPRECHER DJ, LEMAN AD, DZIUK PD *et al.* causes and control of swine stillbirths. **Journal American Veterinary Association**, v. 165, p. 698-701, 1974.

STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N. *et al.* Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 40, p. 261-271, 1993.

SUAREZ, P. *et al.* Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). **Archives of Virology**, v. 135, p. 89-99, 1994.

SUR, J. H. *et al.* In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA by in situ hybridization at different times post-infection. **Journal Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2280-2286, 1996.

TAYLOR, D. J. *Actinobacillus suis*. In: Straw, BE, D'Allaire S, Megeling WL, Taylor DJ. (Eds), **Disease of Swine**, 8<sup>a</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, p.624-627, 1999.

TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G.; POL, J. M. A. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. **The Veterinary Quarterly**, v. 13, p. 131-136, 1991.

THACKER, B. J.; GONZALES, P. L. Infectious reproductive diseases in swine. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 10, p. 669-680, 1988.

THOMA, R. *et al.* Chlamydiae in porcine abortion. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 467-469, 1997.

TRUJANO, M. *et al.* PCV-2 from emaciated pigs in Mexico. **Veterinary Record**, Letters, p. 792, 2001.

VAN ALSTINE, W.G.; KANITZ, C.L.; STEVENSON, G.W. Time and temperature survivability of PRRSV in serum and tissues. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 621-622, 1993.

VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H.; PENZAERT, M. Dual infections of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 325-335, 1996.

VAN WOENSEL, P.; VAN DER WOUW, J.; VISSER, N. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the polymerase chain reaction. **Journal Virology Methods**, v. 47, p. 273-278, 1994.

VANNIER, P. Infectious causes of abortion in swine. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 367-376, 1999.

VINCENT, I. E. *et al.* Dendritic cells: a Trojan horse for porcine circovirus type 2? **Proc. 4<sup>th</sup> International Symposium Emerging and re-emerging Pig Diseases**, University of Parma, Rome, p.157, 2003.

VITALE, M, *et al.* Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 57, n. 1, p. 25-27, 2005.

WALDVOGEL, A. S. *et al.* Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 377-385, 1995.



WASTENSON, Y. Epidemiology of verocytotoxin-producing *E. coli* in non-ruminant animals. In: Duffy G Garvey P, McDowell D, eds. **Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Trumbull (USA): Food & Nutrition Press Inc., p. 149-160, 2001.**

WEST, K. H. *et al.* Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n. 6, p. 530-532, 1999.

WILLIAM, T. C. Stillbirths, mummies, abortion, and early embryonic death. **Swine Reproduction**, v. 8, n. 3, p. 623-639, 1992.

WILSON, M. R. *et al.* A survey of productivity and its component interrelationship in Canadian swine herds. **Journal Animal Science**, v. 62, p. 576-582, 1986.

WILSON, R. J.; McORIST, S. *Actinobacillus suis* infection in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 317-319, 2000.

WOOD, R. L. Erysipelas. In: STRAW, B.E. *et al.* **Disease of swine**. Ames: Iowa State University, p. 419-430, 1999.

WRATHALL, A. E. *et al.* Seasonal variations in serum progesterone levels in pregnant sows. **The Veterinary Record**, v. 118, p. 685-687, 1986.

WRATHALL, A. E. Reproductive disorders in pigs. **Commonweath Agricultural Bureau**, v. 11, p. 311, 1975.

WRATHALL, A. An approach to breeding problems in the sow. **The Veterinary Record**, v. 89, p. 61-71, 1971.

YAEGER, M. J. An outbreak of *Actinobacillus suis* septicemia in grow/finish pigs. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 381-383, 1996.

YOO, I. J. *et al.* A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 289-292, 1994.

YOON, I. J. *et al.* An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 144-147, 1992.

ZANELLA, J. R. C. Ausência de ocorrência do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRS) no rebanho suíno do Brasil. In: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. Porto Alegre, RS. Anais do X Congresso da Abraves. Concórdia SC: Embrapa Suínos e Aves, v. 1, p. 182-186, 2001.

ZANELLA, J. R. C.; MORÉS, N. Diagnosis of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Brazil caused by porcine circovirus. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 522-527, 2003.

ZEEUW, E. J. L. *et al.* 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.