



Atualização sobre a parvovirose na suinocultura

Update on porcine parvovirus at swine production

Danielle Gava^{1,2}, André Felipe Streck², Carine Kunzler Souza², Karla Rathje Gonçalves², Cláudio Wageck Canal², Fernando Pandolfo Bortolozzo¹ & Ivo Wentz¹

INTRODUÇÃO

Atualmente, as principais doenças que afetam os rebanhos suínos são multifatoriais e virais, acarretando principalmente em redução no desempenho e aumento dos custos de produção [52,73]. Neste cenário, o surgimento e dispersão de novos patógenos causadores de falhas reprodutivas fizeram, possivelmente, com que o parvovírus suíno (PVS) ressurgisse como um importante agente infeccioso causador de perdas embrionárias e fetais na suinocultura.

O PVS é um vírus que causa problemas reprodutivos em fêmeas suínas, com grande impacto, principalmente em nulíparas. Apesar de, usualmente, a infecção ser subclínica em suínos adultos, sua importância deve-se à capacidade de infecção transplacentária, levando à morte dos embriões e fetos [25,43,73]. A fim de que se possam adotar medidas de prevenção e diminuição do impacto da enfermidade no plantel, as metodologias de diagnóstico são de grande importância, sendo a determinação do perfil sorológico do rebanho essencial. É justamente neste item, diagnóstico associado com epidemiologia, que tem surgido os mais recentes trabalhos, sendo a grande maioria relacionada à biologia molecular.

Por outro lado, é comprovado que existem variações entre os genomas de amostras de campo de PVS, inclusive em regiões importantes para o caráter antigênico da amostra [78,93]. Contudo, até o presente momento, nunca foi realizado um estudo mais amplo e comparativo entre amostras de campo e amostras vacinais para compreender se estas variações gênicas estão comprometendo a eficácia das vacinas utilizadas no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão sobre o PVS, enfocando estudos recentes e pesquisas desenvolvidas no Brasil sobre o vírus.

PARVOVÍRUS SUÍNO

Classificação e caracterização do vírus

O PVS foi descrito pela primeira vez em 1967 [8], sendo posteriormente isolado em conceptos suínos em diversos países [9,25,44,54]. Até a presente data, o PVS segue sendo relatado em diversos países e correlacionado com problemas reprodutivos [5,17,56,59,70].

A família *Parvoviridae* é composta por duas subfamílias (*Parvovirinae* e *Densovirinae*). A subfamília *Parvovirinae* é composta por cinco gêneros: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. O gênero *Parvovirus* possui as espécies parvovírus de camundongos 1, parvovírus de galinha, parvovírus H-1, parvovírus HB, parvovírus Kilham de ratos, parvovírus Lapine, parvovírus RT, parvovírus suíno, vírus Lull, vírus da panleucopenia felina, vírus minuto dos camundongos e vírus tumoral X [24, 53]. Em suínos, apenas um gênero de parvovírus é conhecido, entretanto, técnicas moleculares possibilitaram a identificação de novos parvovírus. Há alguns anos, durante uma tentativa de identificar um vírus da hepatite E, foi identificado, acidentalmente, um novo parvovírus em

¹Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil. ²Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS/Brasil. CORRESPONDÊNCIA: D. Gava [daniellegava@gmail.com].

soros de suínos, denominado *Porcine parvovirus 2* (PPV2) [21]. Recentemente, em 2007, outro parvovírus foi identificado em soro de suínos, sendo por sua vez nominado *Porcine hokovirus* [33]. Estes dois novos parvovírus apresentam genomas filogeneticamente distantes do parvovírus suíno previamente descrito, por isto foram considerados como representantes de outro gênero dentro da família *Parvoviridae*. Até o momento, a identificação e caracterização destes vírus foram realizadas exclusivamente através de seu DNA. Novos estudos envolvendo propriedades bioquímicas, sorológicas, infecciosas e patogênicas ainda necessitam serem realizados para compreendermos a natureza destes vírus.

Os membros da família *Parvoviridae* são vírus pequenos, esféricos, com capsídeo icosaédrico e compostos por uma molécula de DNA linear de fita simples. Os parvovírus possuem somente quatro genes, distribuídos em duas regiões codificantes sobrepostas no genoma de 5 kilobases (Kb). O PVS possui 18 a 26 nm de diâmetro, é desprovido de envelope e as partículas virais possuem uma massa de 5,5 a 6,2 x 10⁶ daltons [52].

Seu genoma apresenta duas grandes fases abertas de leitura (*Open Reading Frames* - ORFs), sendo que a primeira compreende a metade esquerda (5') e codifica para proteínas não estruturais (*non structural* - NS), NS-1, NS-2 e NS-3. A NS-1 está associada à replicação do genoma viral e a NS-2 com a formação do capsídeo, controle da expressão gênica e também participa da replicação do genoma. A proteína NS-3 ainda não tem função conhecida, contudo, acredita-se que está igualmente relacionada à replicação viral. A segunda ORF está na metade direita (3') do genoma e codifica para as três proteínas do capsídeo, (*viral protein* - VP), VP1, VP2 e VP3. As duas últimas possuem epítomos que induzem a formação de anticorpos neutralizantes e pequenas diferenças nestas proteínas podem determinar o tropismo por diferentes tecidos e hospedeiros. Além disto, possuem na superfície estruturas características, como protuberâncias, depressões e cilindros circundados por depressões, que conferem funções biológicas, como reconhecimento e ligação a receptores celulares e características imunogênicas [52]. Possivelmente, o genoma do PVS ainda apresente mais funções e proteínas a serem descobertas.

Até o presente momento, somente um sorotipo de PVS foi identificado, entretanto existem diferenças de patogenicidade entre isolados de campo [52]. Foram realizados dois estudos avaliando a variabilidade genética de amostras circulantes de PVS. O primeiro foi realizado com amostras brasileiras, dos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, e foi evidenciado que as amostras se dividem em dois grupos filogenéticos distintos, e ainda com subdivisões internas [78]. O segundo foi realizado com amostras isoladas na Alemanha e, igualmente, foi identificada a presença de dois grupos filogenéticos distintos. Conforme os autores, o estudo demonstrou que o PVS é geneticamente mais variável do que previamente se pressupunha [93]. A significância epidemiológica destas mutações e substituições no PVS foi melhor compreendida em um estudo que seqüenciou e analisou as diferenças entre a cepa patogênica Kresse e a pouco patogênica NADL-2 [3]. Neste trabalho, foi observado que as regiões não codificantes do genoma de ambas as cepas eram praticamente idênticas. A região de proteínas NS apresentou apenas algumas variações, embora todas silenciosas. Por sua vez, a região das proteínas VP apresentou maiores variações (oito), sendo seis modificações que alteravam o aminoácido (A-92!R, I-215 (378)!T, D-378 (528)!G, H-383 (533)!Q, S-436 (586)!P e R-565 (627)!K). Nos estudos acima referidos, a observação destes aminoácidos e a predição de sua importância para a patogenia do vírus haviam sido realizadas *in silico*.

Recentemente, foi realizado um estudo inoculando cepas de PVS enquadradas em distintos grupos filogenéticos em fêmeas gestantes. Foi observado que amostras do grupo composto por novas cepas da Alemanha apresentaram maior virulência, com uma maior patogenia e disseminação entre os fetos [92]. O autor ainda realizou um estudo com neutralização cruzada e observou que as substituições dos aminoácidos de superfície (descritos acima) diminuíram significativamente a afinidade dos anticorpos. Apesar de poucos estudos *in vivo* realizados até o momento, é muito provável que os aminoácidos de superfície desempenhem papel fundamental na virulência do PVS e na sua adaptação ao hospedeiro.

Ao relacionar as propriedades físico-químicas do PVS, foi observado que este possui atividade hemoaglutinante sobre os eritrócitos e a densidade situa-se entre 1,39 e 1,42 g/cm³ em gradiente de cloreto de céσιο. O vírus é estável em pH entre 3 e 9, e a temperatura de 56°C por 60 minutos [22]. Por outro lado, desinfetantes à base de formalina, hipoclorito de sódio e agentes oxidantes são capazes de diminuir a infectividade ou inativar o vírus [6].

Uma característica marcante do PVS é a dependência de células na fase S do ciclo celular para sua replicação. A infecção por este vírus afeta principalmente órgãos que apresentam células com altas taxas de multiplicação, como, as células embrionárias, células da medula óssea e células precursoras do epitélio intestinal [43]. Em cultivos celulares *in vitro*, multiplica-se principalmente em células renais e testiculares de suínos, com indução

de efeito citopático [13,49,61]. Por apresentar grande estabilidade no ambiente, podendo manter infectividade durante meses, o PVS é também um importante contaminante em laboratórios e em produtos de origem suína utilizados na saúde humana [80].

Epidemiologia e patogenia

A infecção pelo PVS está amplamente distribuída na população suína mundial, tanto doméstica quanto selvagem, sendo raras as granjas livres do vírus [15,75,77]. No Brasil, estudos sorológicos utilizando a prova de inibição da hemaglutinação (HI) em suínos provenientes de granjas comerciais indicaram que o vírus já está estabelecido no País há pelo menos duas décadas, causando problemas reprodutivos [19,40]. Outros trabalhos relataram que a soroprevalência do PVS em granjas comerciais é superior a 80% [4,72], demonstrando que o vírus circula no plantel de suínos brasileiro.

A introdução do vírus no rebanho pode ocorrer principalmente pela aquisição de reprodutores infectados. A transmissão pode ser através de contato oronasal com animais infectados ou a partir de suas secreções e excreções, tendo o sêmen, fetos e envoltórios fetais como importantes fontes de disseminação [20]. Em trabalhos com inoculação experimental do PVS em machos reprodutores, foi possível o isolamento viral a partir do testículo e de linfonodos escrotais, comprovando a susceptibilidade e conseqüente transmissão do vírus pelo sêmen [37]. Ressalta-se que ainda faltam estudos que utilizem técnicas mais sensíveis para quantificar a incidência de PVS em machos e estabelecer sua importância.

Após a penetração, o vírus replica-se em tecidos linfóides, medula óssea e criptas intestinais. A viremia ocorre 2-4 dias após a infecção e persiste por 2-3 dias. A infecção pode ser crônica, com replicação do vírus em células intestinais e excreção nas fezes por longos períodos, contribuindo para a contaminação ambiental [43].

A ampla distribuição do PVS também levanta a possibilidade de alguns suínos serem persistentemente infectados e excretarem o vírus periodicamente. Além disto, há a sugestão da ocorrência de animais portadores imunotolerantes, que nascem infectados, mas sem anticorpos. No entanto estes casos são raros e ainda não comprovados [25]. Acredita-se que o manejo utilizado, especialmente as condições de isolamento dos animais e o nível de higiene, possa ser o principal responsável pela maior ou menor disseminação viral no plantel.

A resposta imune ao PVS é pouco conhecida em seus detalhes. Em infecções experimentais, foi observado que células mononucleares periféricas proliferam em contato com o PVS e atingem um platô de resposta após 90-120 dias. A ação das células T citotóxicas e demais linfócitos ainda não apresenta resposta significativa neste período [32]. Após o primeiro contato com o agente, quando ocorrem re-infecções, o sistema de resposta imunoadquirido passa a ter importância [32]. Este sistema de resposta é estimulado por fragmentos antigênicos que se ligam a receptores específicos nos linfócitos T. Para que ocorra esta ligação, a célula infectada deve processar o antígeno e apresentá-lo através de MHC de classe I [55]. Entre as células efetivas e importantes para o processamento do antígeno estão células B, macrófagos e, por fim, as células dendríticas que são descritas como as mais eficientes para capturar e processar partículas de PVS [76]. As células T citotóxicas (CD8⁺) reconhecem estes antígenos processados e realizam parte do controle sobre a infecção viral através da liberação de toxinas [76], impedindo a disseminação de células infectadas. Ressalta-se que a imunologia celular é uma área que ganhou importância nos últimos anos com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e, provavelmente, poderá evoluir na compreensão da relação entre a parvovirose suína e o sistema imune do hospedeiro.

Com relação à imunidade passiva, os leitões absorvem grande quantidade de anticorpos anti PVS através do colostro, cujos títulos decaem progressivamente. Em infecções pós-natais, anticorpos anti PVS são detectados a partir de sete dias após a infecção, atingindo níveis máximos em uma a duas semanas após, podendo persistir por meses ou até anos [26,64]. Este período de duração de anticorpos não está bem determinado e não se sabe se eles são decorrentes da imunidade passiva, de infecção primária ou de sucessivas infecções. Estudos envolvendo o perfil sorológico de suínos, do nascimento até a idade reprodutiva, bem como correlação com anticorpos da mãe (colostro e sangue) estão sendo desenvolvidos [D. Gava, resultados não publicados].

Existe uma grande controvérsia quanto ao título de anticorpos anti PVS considerado protetor. Acredita-se que apenas títulos maiores ou iguais a 80 ou 160 protegem os animais da infecção [65]. Contudo, outros autores afirmam que títulos menores que 80 não protegem contra a infecção, mas podem proteger contra a infecção transplacentária e conseqüente transtorno reprodutivo em fêmeas vacinadas. Foi demonstrado que em animais vacinados desafiados por via oral e nasal com PVS, títulos a partir de 10 já fornecem proteção [46]. Cabe salienta

que a infecção natural produz títulos mais altos do que a vacinação.

O PVS é capaz de infectar todas as categorias da produção de suínos, contudo as fêmeas nulíparas, que não possuem imunidade para o vírus, são as que apresentam maior risco de infecção seguida de problemas reprodutivos. Em fêmeas pluríparas, com prévio contato ao agente, o efeito do vírus passa a ser reduzido ou nulo [43,83]. Em um estudo realizado em 323 amostras de soro de leitões saudáveis e refugos, foi evidenciado através da reação em cadeia da polimerase (nested-PCR) a prevalência de 15,7% e 18,2% de animais positivos respectivamente, não sendo encontrada diferença entre os grupos [A.F. Streck, resultados não publicados]. No mesmo estudo, 129 amostras de soro de fêmeas de diferentes ordens de parto (OP) também foram avaliadas por nested-PCR e HI. Neste, em 17,8% das amostras foi detectado o DNA viral, sendo que a OP1 teve maior número de fêmeas positivas que a OP2. O número de fêmeas positivas aumentou da OP2 até OP4, e então tornou a diminuir. O teste de HI mostrou 84,7% de fêmeas positivas, 7,3% suspeitas e 8,1% negativas. De uma forma geral, este estudo determinou que o vírus circula nos rebanhos brasileiros entre 15 e 18% nas diferentes categorias animais [A.F. Streck, resultados não publicados].

As fêmeas nulíparas podem estar protegidas pela presença de anticorpos maternos até três a sete meses de idade, conforme variação individual [26,64]. Desta forma, enquanto algumas fêmeas estão desprotegidas pela ausência de anticorpos maternos, outras, que ainda apresentam anticorpos maternos, podem ficar desprotegidas pela neutralização do antígeno vacinal ocasionada pelos anticorpos maternos. Em qualquer uma destas situações, as fêmeas nulíparas estarão suscetíveis à infecção, devido à ausência de resposta humoral [59]. Outros estudos estão sendo realizados com o objetivo de identificar o real perfil sorológico de nulíparas antes da primeira vacinação, e também de estabelecer a soroconversão pós vacinação nesta categoria [D. Gava, resultados não publicados].

As fêmeas não imunes são suscetíveis à infecção em qualquer fase da gestação e, como consequência desta infecção, a transmissão transplacentária pode acarretar em morte embrionária ou fetal, levando ao retorno do estro ou ao nascimento de leitões mumificados e/ou natimortos [43,73]. Devido à lenta difusão viral pela placenta, muitas vezes, somente uma parte da leitegada pode ser afetada. Este evento leva à apresentação de fetos em diferentes estágios de desenvolvimento, ocasionando leitegadas irregulares, tanto em relação ao desenvolvimento fetal quanto ao número de leitões paridos [25,42,83].

Caso a infecção ocorra até os 30 dias de gestação, pode ocorrer morte parcial ou total dos embriões. Os embriões são reabsorvidos e ocorre retorno ao estro (regular ou irregular). Se sobreviverem mais de quatro embriões até o 12º dia de gestação, a mesma pode ser mantida, apesar do tamanho reduzido da leitegada [45]. Após o 30º dia de gestação, ocorre deposição de cálcio nos ossos fetais, impedindo a reabsorção. Ocorrendo infecção entre 30 e 70 dias de gestação, ocorre a morte dos fetos, onde os tecidos moles são reabsorvidos, mas o tecido ósseo não, levando à mumificação e, no caso de morte de todos os fetos, possível prolongamento da gestação [34,47]. Após os 65-70 dias de gestação, os fetos geralmente tornam-se imunocompetentes, sendo capazes de responder à infecção. Neste caso, o vírus é eliminado e anticorpos específicos podem ser detectados no soro [43,73]. Outra possibilidade para a baixa infectividade do PVS em fetos no último terço da gestação seria uma menor atividade de mitose, resultando em maiores dificuldades para a replicação do vírus [48].

Ainda não está claro como o vírus consegue ultrapassar a barreira transplacentária [87]. As células que formam as camadas placentárias estão intimamente ligadas por junções que não permitem a passagem de pequenas moléculas, como por exemplo, os anticorpos [87]. Acredita-se que a passagem do vírus da mãe para o feto poderia ser realizada através de fluídos sanguíneos ou linfáticos, células, como linfócitos e macrófagos, ou por replicação progressiva através dos tecidos que isolam o feto [48]. Fisicamente, devido ao seu tamanho, o PVS não conseguiria ultrapassar esta barreira sem auxílio, embora, recentemente, observou-se que fetos com menor desenvolvimento fazem com que suas placentas sofram um alargamento entre as junções celulares, permitindo maior passagem de nutrientes e moléculas [85]. Foi observado que linfócitos fetais podem estar presentes na circulação da mãe. Possivelmente, a passagem das células do sistema imune seja utilizada pelo vírus para atingir o feto. Embora a replicação viral em macrófagos nunca foi observada, trabalhos relatam que monócitos periféricos e macrófagos fagocitam o vírus, podendo permanecer com a partícula viral por longos períodos [66].

Examinando a distribuição do PVS em diferentes tecidos fetais, o vírus foi encontrado no intestino, coração, fígado, pulmão, rim, baço, timo, gônadas e cérebro [62,87]. Foi observado que as cepas de PVS mais virulentas apresentam maior concentração e distribuição mais ampla entre os tecidos, porém sem maiores predileções definidas por determinados tecidos [87]. Por outro lado, em trabalho recente realizado no Brasil, foi observada, através de

PCR, uma maior incidência de PVS no pulmão e coração de fetos mumificados [89]. Acredita-se que a morte do embrião ou feto ocorre devido à replicação viral nos tecidos do concepto [48], embora maiores detalhes sobre a patogenia viral ainda não foram esclarecidos.

O PVS também está relacionado com outros vírus imunodepressores emergentes na suinocultura mundial, como o PCV2 e a síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRS) [14,38]. Em infecções concomitantes com PCV2, o PVS pode atuar de forma sinérgica, aumentando a severidade das lesões [14,30]. A emergência do PCV2, associado às propriedades do PVS, pode ter interferido na apresentação da infecção por PVS, tornando a parvovirose suína a mais importante virose causadora de problemas reprodutivos em fêmeas suínas no Brasil [16].

Manifestações clínicas e lesões

As manifestações clínicas observadas são dependentes da fase gestacional e categoria de infecção. Na maioria das vezes o único indício da infecção são alterações reprodutivas, como morte embrionária seguido de reabsorção, abortamentos (questionável), fetos mumificados e neonatos fracos, observados principalmente em nulíparas. Essas manifestações podem ser acompanhadas de retorno ao estro, nascimento de um número reduzido de leitões, fêmeas vazias ao parto e atraso na data de parição. Devido à difusão lenta da infecção, é comum a presença de fetos em diferentes estágios de desenvolvimento, podendo ocorrer fetos mumificados, natimortos e normais na mesma leitegada [34,45,47].

A infecção em machos é assintomática e não afeta a qualidade do sêmen nem a libido [82]. As infecções pós-natais usualmente passam despercebidas, podendo ocasionalmente induzir febre e leucopenia [10]. Além destas manifestações, dermatite [31] e enterite [11,12] também têm sido associadas ao PVS. A única evidência de replicação viral foi encontrada nas células epiteliais das criptas intestinais, através da microscopia eletrônica. Neste trabalho, o vírus não apresentou afinidade por anticorpos específicos para PVS, sendo sugerido que este parvovírus poderia ter características antigênicas distintas [12]. É importante ressaltar que a maioria destes achados são eventos isolados, podendo ser apenas achados acidentais.

Nenhuma lesão macroscópica é observada na fêmea. Entretanto, microscopicamente, pode-se observar infiltrado inflamatório mononuclear no endométrio e presença de linfócitos no sistema nervoso central, medula e coróide ocular. Nos fetos, as lesões são características de mumificação, variando com o estágio evolutivo. Congestão, edema, hemorragia e necrose podem ser observados, associados com infiltrado inflamatório mononuclear perivascular, hipertrofia endotelial e, eventualmente, inclusões intranucleares [44].

Diagnóstico

A parvovirose deve ser sempre lembrada quando forem observados os sinais clínicos citados anteriormente, com principal ênfase à mumificação fetal afetando principalmente nulíparas. A confirmação clínica deve ser realizada através de exames laboratoriais.

O diagnóstico de PVS pode ser realizado através de histopatologia, hibridização *in situ*, imunofluorescência e PCR [86]. Entretanto, como os tecidos de escolha (pulmão e rim dos fetos) geralmente encontram-se autolisados, torna-se importante a utilização de técnicas sorológicas, como HI e *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) [43].

Como o PVS é capaz de aglutinar eritrócitos, o uso de HI é eficiente na detecção de anticorpos contra o vírus. Além disto, é o teste sorológico de referência, além de ser de fácil aplicação e baixo custo [43]. Entretanto, quando utilizado como ferramenta para avaliação do perfil sorológico do plantel, torna-se uma prova laboriosa. Além disto, não existe padronização dos parâmetros relacionados à temperatura de incubação, espécie e idade do doador de hemácias e tratamento prévio da amostra, o que interfere na repetibilidade dos resultados [35]. Desta forma, o diagnóstico sorológico com o emprego do ELISA vem sendo utilizado em vários países, pois, além de dispensar o tratamento prévio das amostras pode ser padronizado e automatizado [22,69]. Contudo, esta técnica ainda não é aplicada na rotina diagnóstica no Brasil, fato que, se utilizada, poderia facilitar o diagnóstico da doença e permitir o estabelecimento com maior agilidade do perfil sorológico das granjas brasileiras.

No Brasil, já foram realizados levantamentos sorológicos utilizando HI, em criações comerciais antes do uso comum da vacina [19] e após seu uso [2,35] e em criações rústicas para fins de subsistência [72], contudo todas antes da presença do PCV2. Em todos os trabalhos, foram obtidas elevadas porcentagens de animais com títulos heterogêneos anti-PVS. Assim como em relatos de outros países, a maioria destes estudos sorológicos não

apresenta outros parâmetros reprodutivos, tornando uma avaliação sobre a vacina ou cepas de campo circulantes difícil de ser realizada.

A partir do uso da vacina em quase todas as granjas, a interpretação do título de anticorpos passou a ser uma prática difícil. Estudos que realizaram a verificação sorológica de PVS em plantéis passaram a relatar a presença de imunidade na maioria dos animais (como esperado após a vacinação), entretanto, também a presença de títulos altos e muitas vezes heterogêneos passou a ser observada [58,59]. De uma forma geral, a distinção entre títulos vacinais e oriundos de desafios de campo poderia ser realizada através do nível de anticorpos, por que a estimulação humoral realizada pelas vacinas geralmente não excede títulos de 512 [58]. Entretanto, a impossibilidade de diferenciar anticorpos adquiridos passivamente de uma resposta ativa, juntamente com a falta de standardização de métodos sorológicos, dificulta este tipo de análise.

O isolamento viral pode ser utilizado para o diagnóstico devido ao efeito citopático, como inclusões intranucleares, núcleo picnótico, irregularidade no contorno, granulações, vacúolos citoplasmáticos, diminuição na velocidade de replicação e conseqüente morte celular [8,44,49]. O PVS apresenta boa afinidade por células de testículo e rim de leitões ou embriões. Como o cultivo celular primário apresenta maior risco de contaminação e proporciona um pequeno número de replicações celulares, as linhagens celulares, como a ESK, PK15, SK6, ST, STE e SPEV, vêm sendo utilizadas com boa sensibilidade para a replicação viral [45, 50, 96]. Entretanto, mesmo em células de linhagem, a técnica não é muito eficaz, pois a infecciosidade do vírus é diminuída ou inativada em tecidos fetais, principalmente mumificados, devido ao avançado estado de autólise [73]. Além disto, o PVS pode necessitar de sucessivas passagens até causar efeito citopático.

Outros métodos sorológicos também foram descritos, como a micro-aglutinação em tubo [28], imunodifusão em gel de ágar [84], imunofluorescência [71] e a aglutinação rápida em placa [36]. Entretanto nenhuma destas técnicas conseguiu comprovar a praticidade ou confiança a exemplo do HI e ELISA para o PVS.

O avanço nas pesquisas em biologia molecular possibilitou o desenvolvimento de métodos baseados na detecção de seqüências virais específicas. O primeiro método desenvolvido com esta tecnologia foi à hibridização de ácidos nucléicos [60]. Esta técnica possui boa sensibilidade e especificidade, mas, possivelmente, a necessidade do preparo de sondas específicas foi determinante para a baixa difusão deste método. Por sua vez, a PCR conseguiu associar sensibilidade, especificidade e praticidade. Duas técnicas de PCR para PVS estão descritas, uma americana e outra brasileira. Interessantemente, as duas técnicas apresentam alvos genômicos bem distintos, a americana é projetada para amplificar a região correspondente às proteínas VP [51], enquanto a brasileira é projetada para a região NS [80]. Da mesma forma, a técnica também têm sido estabelecida para detecção do vírus em tecidos de fetos abortados e natimortos [53,67,89] e em amostras de soro nas diferentes categorias animais [A.F. Streck, resultados não publicados]. Estes trabalhos relatam presença de positividade extremamente variada neste material, variando entre 5% a 95% conforme o trabalho. Apesar de utilizarem técnicas sensíveis como a PCR ou a nested-PCR, uma reação de autólise nos tecidos fetais poderia degradar as partículas virais, mascarando os resultados.

Atualmente, a PCR em tempo real têm sido descrita como uma forma eficiente de diagnóstico para PVS. Além de associar a sensibilidade e especificidade da PCR convencional, possui como vantagens a capacidade de quantificação e leitura automatizada [41,88]. Todavia, o custo elevado do equipamento e a dificuldade de estabelecimento de um banco de amostras padrão estão retardando sua difusão na rotina dos laboratórios de diagnósticos brasileiros.

Ainda como perspectiva, a técnica de micro-array pode vir a ser utilizada para o diagnóstico para PVS. A sua vantagem é a possibilidade de detecção simultânea de milhares de doenças, em um curto espaço de tempo. Até o momento, os relatos existentes na literatura sobre esta técnica estão focados principalmente no proteoma humano, sendo escassos os trabalhos para a detecção de patógenos de interesse veterinário [24,57].

Somando-se a isto, é imprescindível realizar o diagnóstico diferencial de outras doenças que causam problemas reprodutivos, como leptospirose, doença de Aujeszky, brucelose, PRRS, além de verificar a possível associação do PVS com PCV2. Em um estudo, no qual foram analisados diversos órgãos (pulmão, baço, fígado, linfonodo e rim) de suínos refugos por PCR, revelou 97% de animais positivos para PCV2 e 79% positivos para PVS. Todos os animais positivos para PVS foram positivos para PCV2, e os órgãos com maior número de positividade foram linfonodo e baço para ambos os vírus [18]. Em outro trabalho [D. Gava, resultados não publicados], 129 amostras de soro de leitões pertencentes à diferentes níveis sanitários (A: Saudável com baixo desafio para PCV2;

B: Saudável com alto desafio para PCV2 e C: Refugo e doente, com alto desafio para PCV2), foram avaliadas. Os resultados determinaram: Grupo A: 25,6% e 0%; Grupo B: 11,6% e 2,3%; Grupo C: 16,3% e 0%, positivos para PVS e para PCV2 respectivamente. Ao avaliarem estas mesmas amostras pela técnica de imunocitoquímica para PCV2, todos os grupos apresentaram animais positivos com títulos que variaram de 1:80 até 1:1280. Por sua vez, Pescador *et al.* [67] estudaram retrospectivamente (2005-2007) a associação de casos de abortos e natimortos com infecções por PCV2 e PVS. Entre as 121 amostras, 5,78% tinham lesões compatíveis com origem viral e foram positivos pelas técnicas de imunistoquímica e PCR para PCV2. Além disso, 2,47% também foram confirmados como co-infectados com PVS através da PCR. Antígenos de PCV2 foram observados principalmente em macrófagos e no interior de miócitos dos fetos suínos abortados e natimortos. PCV2 e PVS foram detectados em amostras em diferentes estágios de gestação.

Controle

Uma vez que não existe qualquer referência específica quanto ao tratamento da infecção pelo PVS, as ações devem concentrar-se em medidas preventivas. Devem ser adotadas medidas de manejo gerais, a fim de promover um bom estado sanitário do rebanho [73]. Todas as ações tomadas vão ao encontro de estabelecer uma imunidade sólida no rebanho, com principal foco às nulíparas.

Como a infecção é endêmica, o controle deve ser baseado na vacinação. As primeiras vacinas desenvolvidas, ainda durante a década de 70, foram elaboradas com o vírus inativado [27,45,81]. Nos anos posteriores, a cepa NADL-2 passou a ser amplamente utilizada para a elaboração da vacina inativada, embora atualmente o tipo de cepa utilizada pela empresas farmacêuticas é considerado um segredo comercial e há poucas informações publicadas [7,68,92]. Ainda assim, as mudanças ocorridas na tecnologia para obtenção do antígeno, adjuvantes e conservantes nas vacinas inativadas possivelmente sejam as principais modificações realizadas [50,74,90].

Outras apresentações de vacinas têm sido desenvolvidas, como partículas recombinantes expressas em sistema baculovírus [1,39], recombinante expressando a proteína VP2, produzida em *Lactobacillus casei* [91] e uma vacina híbrida (PVS e PCV2), utilizando sistema *virus-like particles* (VLP) [63]. Apesar da tecnologia empregada nestes estudos, a vacina inativada continua a ser largamente utilizada devido a sua maior margem de segurança. No Brasil, só existem comercialmente vacinas inativadas, podendo ser monovalente ou combinada com antígenos de outros vírus e bactérias.

Tradicionalmente, a adoção de um bom programa de vacinação é considerada uma forma eficaz de controle da parvovirose suína [43,73]. Entretanto, em estudo verificando a atividade de neutralização gerada por cepas vacinais, foi observado que as cepas vacinais não conseguiram obter completa capacidade neutralizante frente a novas cepas circulantes na Europa [92]. As cepas vacinais do referido estudo são utilizadas há mais de 30 anos na Europa, podendo não possuir mais completa atividade protetora contra as novas variantes antigênicas. Em outro estudo, cinco novas seqüências de cepas brasileiras foram comparadas e analisadas filogeneticamente com todas as seqüências de PVS, porção VP1/VP2 do genoma, dispostas no GenBank [A.F. Streck, resultados não publicados]. Foi evidenciada que duas amostras do Brasil apresentam o aminoácido Thr no sítio 586, relacionado à virulência. A análise filogenética revelou a existência de apenas um grupamento consistente, composto por oito amostras chinesas. A análise por relógio molecular demonstrou que as mais recentes variações nos PVS ocorreram nos últimos três séculos e indicaram possivelmente que estas variações já existiam antes do advento da vacinação comercial para a parvovirose.

Idealmente, deveria ser avaliado o perfil sorológico do rebanho, com o objetivo de identificar se as nulíparas estão sendo imunizadas no período correto, e também se existe necessidade de revacinação das fêmeas mais velhas, evitando gastos desnecessários.

REFERÊNCIAS

- 1 Antonis A.F., Brusckhe C.J., Rueda P., Maranga L., Casal J.I., Vela C., Hilgers L.A., Belt P.B., Weerdmeester K., Carrondo M.J. & Langeveld J.P. 2006. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine.* 24: 5481-5490.
- 2 Barthasson D.L., Brito W.M.E.D., Sobestiansky J., Caixeta S.P.M.B., Tavares T.M., Silva L.A., Arantes G.C. & Ciacci-Zanella J.R. 2006. Detecção de infecção por parvovírus suíno e gastroenterite transmissível em suínos criados de forma extensiva do Estado de Goiás. In: *Anais do III Congresso Latino-Americano de Suinocultura* (Foz do Iguaçu, Brasil). p.125.

- 3 Bergeron J., Hérbert B. & Tijssen P. 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and fields isolates. *Journal of Virology*. 70: 2508-2515.
- 4 Bersano J.G., Schotten M.H.S., Kroeff S.S.E. & Bastos G.M. 1993. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o parvovírus suíno no Estado de São Paulo. In: *Anais da Reunião Anual do Instituto Biológico* (São Paulo, Brasil). p.17.
- 5 Broll S., Waldvogel A.S., Roskopf M., Corboz L. & Pospischil A. 1993. The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. *Zentralbl Veterinarmed*. 40: 641-653.
- 6 Brown T.T. 1981. Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies virus, and transmissible gastroenteritis virus. *American Journal of Veterinary Research*. 42: 1033-1036.
- 7 Brown T.T., Whitacre M.D. & Robison O.W. 1987. Use of an inactivated vaccine for prevention of parvovirus-induced reproductive failure in gilts. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 190: 179-181.
- 8 Cartwright S.F. & Huck R.A. 1967. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. *Veterinary Record*. 81: 196-197.
- 9 Coackley W. & Smith V.W. 1972. Porcine parvovirus in Westerns Australia. *Australian Veterinary Journal*. 48: 536.
- 10 Cutlip R.C. & Mengeling W.L. 1975. Experimentally induced infection of neonatal swine with porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*. 36: 1179.
- 11 Dea S., Elazhary M.A., Martineau G.P. & Vaillancourt J. 1995. Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 49: 343-345.
- 12 Duhamel G.E., Bargar T.W., Schmitt B.J., Molitor T.W. & Lu W. 1991. Identification of parvovirus-like virus particles in intestinal crypt epithelial cells of pigs with diarrhea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3: 96-98.
- 13 Edwards K.R. & Thornton D.H. 1984. Tissue culture infectivity assay for porcine parvovirus. *Veterinary Record*. 115: 108.
- 14 Ellis J., Clark E., Haines D., West K., Krakowka S., Kennedy S. & Allan G.M. 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Veterinary Microbiology*. 98: 159-163.
- 15 Fenati M., Armaroli E., Corrain R. & Guberti V. 2008. Indirect estimation of porcine parvovirus maternal immunity decay in free-living wild boar (*Sus scrofa*) piglets by capture-recapture data. *The Veterinary Journal*. 180: 262-264.
- 16 Fernandes L.T., Ciacci-Zanella J.R., Sobestiansky J., Schiochet M.F. & Trombetta C. 2006. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 isolado do Brasil e parvovírus suíno em suínos SPF. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58: 1-8.
- 17 Foni E. & Gualandi G.L. 1989. A serological survey of swine parvovirus infection in Italy. *Microbiologica*. 12: 241-245.
- 18 Gonçalves K.R., Souza C.K., Streck A.F., Almeida L.L., Rodenbusch C.R., Macagnan M., Ravazzolo A.P. & Canal C.W. 2007. Estudo da ocorrência de parvovírus suíno e correlação com circovírus suíno tipo 2 em leitões refugos. In: *Anais do XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS* (Porto Alegre, Brasil). p.30.
- 19 Gouvêia A.M.G., Gomez M.C. & Reis R. 1984. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 4: 17-22.
- 20 Gradil C., Molitor T., Harding M. & Crabo B. 1990. Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. *American Journal of Veterinary Research*. 51: 359-362.
- 21 Hijisaka M., Abe K., Win K.M., Shimizu Y.K., Keicho N. & Yoshikura H. 2001. Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Japanese Journal of Infection and Disease*. 54: 244-245.
- 22 Horwitz M.S. 1996. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields B.N., Knipe D.M. & Howley P.M. (Eds). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott- Raven, 2587p.
- 23 International Committee on Taxonomy of Viruses. 2008. National Center for Biotechnology Information. *Taxonomy and index to virus classification and nomenclature taxonomic lists and catalogue of viruses*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acessado em: 11/2008.
- 24 Jack P.J., Amos-Ritchie R.N., Reverter A., Palacios G., Quan P.L., Jabado O., Briese T., Ian Lipkin W. & Boyle D.B. 2009. Microarray-based detection of viruses causing vesicular or vesicular-like lesions in livestock animals. *Veterinary Microbiology*. 133: 145-153.
- 25 Johnson R.H. & Collings D.F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. *Research in Veterinary Science*. 12: 570-572.
- 26 Johnson R.H., Donaldson-Wood C. & Allender U. 1976. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*. 52: 80-84.
- 27 Joo H.S. & Johnson R.H. 1977. Serological response in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. *Australian Veterinarian Journal*. 53: 550-553.
- 28 Joo H.S., Donaldson-Wood C.R. & Johnson R.H. 1975. A microneutralization test for the assay of porcine parvovirus antibody. *Archives of Virology*. 47: 337-341.
- 29 Joo H.S., Donaldson-Wood C.R. & Johnson R.H. 1976. A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Australian Veterinary Journal*. 52: 422-444.
- 30 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. *Journal of Comparative Pathology*. 122: 9-24.
- 31 Kresse J.I., Taylor W.D., Stewart W.W. & Eernisse K.A. 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Veterinary Microbiology*. 10: 525-531.
- 32 Ladekjaer-Mikkelsen A.S. & Nielsen J. 2002. A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with porcine parvovirus. *Viral Immunology*. 15: 373-384.
- 33 Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Tse H., Fu C.T.Y., Au W., Chen X., Tsoi H., Tsang T.H.F., Chan J.S.Y., Tsang D.N.C., Li K.S.M., Tse C.W.S., Ng T., Tsang O.T.Y., Zheng B., Tam S., Chan K., Zhou B. & Yuen K. 2008. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *Journal of General Virology*. 89: 1840-1848.
- 34 Lenghaus C., Forman A.J. & Hale C.J. 1978. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig fetuses with porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*. 54: 418.
- 35 Lobato Z.I.P. 1992. Evaluation of serological response of pigs immunized against porcine parvovirus with an experimental inactivated vaccine and by the feedback method. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 44: 155-156.
- 36 Lü J., Zhao J., Fang L., He Q., Cao S. & Chen H. 2006. A slide latex agglutination test for the rapid detection of antibodies in serum against porcine parvovirus. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 53: 59-61.
- 37 Lucas M.H., Cartwright S.F. & Wrathall A.E. 1974. Genital infection of pigs with porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology*. 84: 347-350.
- 38 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. *Journal of Veterinary Science*. 2: 201-207.
- 39 Maranga L., Rueda P., Antonis A.F., Vela C., Langeveld J.P., Casal J.I. & Carrondo M.J. 2002. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 59: 45-50.
- 40 Martins R.M., Roeh P.M., Guimarães L.J. & Rangel E.V. 1984. Sorologia de parvovírus suíno em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: *Anais do V Congresso Nacional de Veterinários Especialistas em Suínos* (Curitiba, Brasil). p.39.
- 41 McKillen J., Hjertner B., Millar A., Mcneilly F., Belák S., Adair B. & Allan G. 2007. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *Journal of Virological Methods*. 140: 155-165.
- 42 Mengeling W.L. & Cutlip R.C. 1976. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*. 37: 1393-1400.
- 43 Mengeling W.L. 1999. Porcine Parvovirus. In: Straw B.E., D'allaire S., Mengeling W.L. & Taylor D.J. (Eds). *Diseases of Swine*. 8.ed. Ames: Iowa State University Press, pp.119-124.
- 44 Mengeling W.L. 1972. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *American Journal of Veterinary Research*. 33: 2239-2248.
- 45 Mengeling W.L. 1979. Prenatal infection following maternal exposure to porcine parvovirus on either the seventh or fourteenth day of gestation. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 43: 106.
- 46 Mengeling W.L., Brown T.T., Paul P.S. & Gutekunst D.E. 1979. Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *American Journal of Veterinary Research*. 40: 204-207.
- 47 Mengeling W.L., Cutlip R.C., Wilson R.A., Parks J.B. & Marshall R.F. 1975. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 166: 993-995.
- 48 Mengeling W.L., Lager K.M. & Vorwald A.C. 2000. The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*. 60: 199-210.
- 49 Miranda A.C.C., Reis R. & Leite R.C. 1992. Avaliação da sensibilidade de linhagens celulares ao parvovírus suínos (PVS). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 43: 297-310.
- 50 Molitor T.W., Joo H.S. & Thacker B.J. 1985. Potentiating effect of adjuvants on humoral immunity to porcine parvovirus vaccines in guinea pigs. *Veterinary Microbiology*. 10: 209-128.
- 51 Molitor T.W., Oraveerakul K., Zhang Q.Q., Choi C.S. & Ludemann L.R. 1991. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *Journal of Virological Methods*. 32: 201-211.
- 52 Moraes M.P. & Costa P.R.S. 2007. Parvoviridae. In: Flores E.F. (Ed). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, pp.377-396.
- 53 Moreno A.M., Paixão R., Oliveira Júnior F.T.T., Gobi D.D., Novita S.M., Coutinho T.A. & Baccaro M.R. 2007. Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento em suínos no Brasil. In: *Anais do XIII Congresso da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos* (Florianópolis, Brasil). pp.249-252.
- 54 Morimoto T., Kurigi H., Miura Y., Sugimori T. & Fujisaki Y. 1972. Isolation of Japanese encephalitis virus and hemagglutinating DNA virus from the brain of still born piglets. *National Institute of Animal Health*. 12: 127-136.
- 55 Morón G., Rueda P., Sedlik C. & Leclerc C. 2003. In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway. *The Journal of Immunology*. 171: 2242-2250.
- 56 Obaldia N. 1991. Outbreaks of porcine parvovirus disease in Panama. *Tropical Animal Health and Production*. 23: 181-185.
- 57 Ojha S. & Kostrzynska M. 2008. Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. *Veterinary Research*. 39: 4.
- 58 Oravainen J., Hakala M., Rautiainen E., Veijalainen P., Heinonen M., Tast A., Virolainen J.V. & Peltoniemi O.A.T. 2006. Parvovirus antibodies in vaccinated gilts in field conditions - results with HI and ELISA tests. *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 91-93.

- 59 Oravainen J., Heinonen M., Tast A., Virolainen J. & Peltoniemi O. 2005. High porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. *Reproduction of Domestic Animals*. 40: 57-61.
- 60 Oraveerakul K., Choi C.S. & Molitor T.W. 1990. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2: 85-91.
- 61 Oraveerakul K., Choi C.S. & Molitor T.W. 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *Journal of Virology*. 66: 715-722.
- 62 Oraveerakul K., Choi C.S. & Molitor T.W. 1993. Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. *Archives of Virology*. 130: 377-389.
- 63 Pan Q., He K. & Huang K. 2008. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. *Vaccine*. 26: 2119-2126.
- 64 Paul P.S., Mengeling L.W. & Pirtle E.C. 1982. Duration and biological half-life of passively acquired colostrum antibodies to porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*. 43: 1376-1379.
- 65 Paul P.S., Mengeling W.L. & Brown T.T. 1980. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. *American Journal of Veterinary Research*. 41: 1368-1371.
- 66 Paul P.S., Mengeling W.L. & Brown T.T. 1979. Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. 25: 1003-1007.
- 67 Pescador C.A., Bandarra P.M., Castro L.A., Antoniaassi 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: 425-429.
- 68 Pye D., Bates J., Edwards S.J. & Hollingworth J. 1990. Development of a vaccine preventing parvovirus-induced reproductive failure in pigs. *Australian Veterinary Journal*. 67: 179-182.
- 69 Qing L., Lv J., Li H., Tan Y., Hao H., Chen Z., Zhao J. & Chen H. 2006. The recombinant nonstructural polyprotein NS1 of porcine parvovirus (PPV) as diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated pigs. *Veterinary Research Communications*. 30: 175-190.
- 70 Rivera E., Concha C., Bragança M., Gunnarsson A. & Karlsson K.A. 1995. Acute outbreak of porcine parvovirus infection in Mozambique. *Tropical Animal Health and Production*. 27: 217-220.
- 71 Rivera E., Sjöland L. & Karlsson K.A. 1986. A solid phase fluorescent immunoassay for the rapid detection of virus antigen or antibodies in fetuses infected with porcine parvovirus. *Archives of Virology*. 88: 19-26.
- 72 Rodriguez C.A.R., Homem V.S.F., Heinemann M.B., Ferreira Neto J.S., Richtzenhain L.J. & Soares R.M. 2003. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, estado do Pará. *Arquivo do Instituto Biológico*. 70: 501-503.
- 73 Roehe P.M., Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. 2007. Parvovirose. In: Sobestiansky J. & Barcellos D.E.S.N. (Eds). *Doenças de Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial, pp.286-293.
- 74 Roic B., Cajavec S., Ergotic N., Lipej Z., Madic J., Lojkic M. & Pokric B. 2006. Immune complex-based vaccine for pig protection against parvovirus. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 53: 17-23.
- 75 Roic B., Cajavec S., Tonicic J., Madic J., Lipej Z., Jemersic L., Lojkic M., Mihaljevic Z., Cac Z. & Sostaric B. 2005. Prevalence of antibodies to porcine parvovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*. 41: 796-799.
- 76 Rueda P., Morón G., Sarraseca J., Leclerc C. & Casal J.I. 2004. Influence of flanking sequences on presentation efficiency of a CD8⁺ cytotoxic T-cell epitope delivered by parvovirus-like particles. *Journal of General Virology*. 85: 563-572.
- 77 Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Höfle U., Villanúa D., Gauss C., Segalés J., Almería S., Montoro V. & Gortázar C. 2006. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*. 65: 731-743.
- 78 Soares R.M., Cortez A., Heinemann M.B., Sakamoto S.M., Martins V.G., Bacci M., Campos F.M. & Richtzenhain L.J. 2003. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *Journal of General Virology*. 84: 1505-1515.
- 79 Soares R.M., Durigon E.L., Bersano J.G. & Richtzenhain L.J. 1999. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of Virological Methods*. 78: 191-198.
- 80 Soucie J.M., Erdman D.D., Evatt B.L., Anderson L.J., Torok T.J., El-Jamil M., Barnhart E., Tepper M., Burrell H.N., Pickett A.M. & Mengeling W.L. 2000. Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate. *Transfusion Complications*. 40: 708-711.
- 81 Suzuki H. & Fujisaki Y. 1976. Immunizing effects of inactivated porcine parvovirus vaccine on piglets. *Bulletin of the National Institute of Animal Health*. 72: 17-23.
- 82 Thacker B.J., Joo H.S., Winkelmann N.L., Leman A.D. & Barnes D.M. 1987. Clinical, virologic, and histopathologic observations of induced porcine parvovirus infection in boars. *American Journal of Veterinary Research*. 48: 763-767.
- 83 Too H.L. & Love R.J. 1986. Some epidemiological features and effects on reproductive performance of endemic porcine parvovirus infection. *Australian Veterinary Journal*. 63: 50-53.
- 84 Too H.L., Seaman J.T., Littlejohns I.R. & Love R.J. 1983. Evaluation of a gel diffusion precipitin test for porcine parvovirus. *Australian Veterinary Journal*. 60: 161-165.

- 85 Vallet J.L. & Freking B.A. 2007. Differences in placental structure during gestation associated with large and small pig fetuses. *Journal of Animal Science*. 85: 3267-3275.
- 86 Waldvogel A.S., Broll S., Rosskopf M., Schwyzer M., & Pospischil A. 1995. Diagnosis of fetal infection with porcine parvovirus by in situ hybridization. *Veterinary Microbiology*. 47: 377-385.
- 87 Wilhelm S., Zeeuw E.J.L., Selbitz H.J. & Truyen U. 2005. Tissue distribution of two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. *Journal of Veterinary Medicine B*. 52: 323-326.
- 88 Wilhelm S., Zimmermann P., Selbitz H.J. & Truyen U. 2006. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *Journal of Virological Methods*. 134: 257-260.
- 89 Wolf V.H.G., Menossi M., Mourão G.B. & Gatti M.S.V. 2008. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. *Genetics and Molecular Research*. 7: 509-517.
- 90 Wrathall A.E., Wells D.E., Cartwright S.F. & Frerichs G.N. 1984. An inactivated, oil emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Research in Veterinary Science*. 36: 136-143.
- 91 Yigang X.U. & Yijing L.I. 2008. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. *Immunology*. 124: 68-75.
- 92 Zeeuw E.J.L., Leinecker N., Herwig V., Selbitz H.J. & Truyen U. 2007. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*. 88: 420-427.
- 93 Zimmermann P., Ritzmann M., Selbitz H.J., Heinritzi K. & Truyen U. 2006. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Journal of General Virology*. 87: 295-301.

