

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

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS SUÍNO

Dissertação de Mestrado

ANDRÉ FELIPE STRECK

Porto Alegre

2009

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

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS SUÍNO

André Felipe Streck

Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na Área de
Virologia Veterinária

Porto Alegre

2009

|

2 S914d Streck, André Felipe

Detecção e caracterização de amostras de parvovírus suíno. / André Felipe Streck. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

116 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. Cláudio Wageck Canal, Orient.

1. Virologia veterinária 2. Parvovirose suína I. Canal, Cláudio Wageck, Orient. II. Título.

CDD 616.019

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

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

ANDRÉ FELIPE STRECK

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS SUÍNO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos doutores:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Dr. Ricardo Alfredo Soncini
Membro da Comissão

Porto Alegre

2009

André Felipe Streck

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS DE PARVOVÍRUS SUÍNO

APROVADO POR

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Dr. Ricardo Alfredo Soncini
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A minha família, especialmente meus pais, Danilo e Valburga, minha irmã, Melissa e a Eliana, pela compreensão, apoio e carinho concedidos nestes dois anos de mestrado.

Ao Professor Cláudio W. Canal, pela oportunidade, orientação e estímulo para o aprendizado.

Aos professores Ivo Wentz, Fernando P. Bortolozzo, Sandro Bonatto e Mari Lourdes Bernardi pelas orientações e disponibilidade.

As colegas Carine K. Souza, Danielle Gava e Karla R. Gonçalves por me auxiliarem na realização deste trabalho, além da amizade e companheirismo.

Aos colegas de graduação, pós-graduação e funcionários do Laboratório de Virologia da UFRGS, pela amizade e cooperação com o trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS, pelo acolhimento e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos ou colegas que estiveram comigo durante este período, obrigado.

SUMÁRIO

| | | |
|------|---|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 2.1 | Histórico..... | 12 |
| 2.2 | Propriedades básicas | 13 |
| 2.3 | Diagnóstico | 21 |
| 2.4 | Epidemiologia | 23 |
| 2.5 | Sinais clínicos | 25 |
| 2.6 | Patogenia..... | 26 |
| 2.7 | Relação com o sistema imune do hospedeiro | 29 |
| 2.8 | Sorologia | 30 |
| 2.9 | Detecção direta..... | 31 |
| 2.10 | Associação com outros agentes..... | 32 |
| 2.11 | Variabilidade genética em vírus ssDNA e no parvovírus suíno | 33 |
| 2.12 | Controle da parvovirose | 38 |
| 2.13 | Existência de distintos parvovírus no suíno | 39 |
| | TRABALHO 1 | 42 |
| | TRABALHO 2 | 61 |
| 3 | DISCUSSÃO GERAL | 74 |
| 4 | CONCLUSÕES | 78 |
| | REFERÊNCIAS..... | 80 |
| | ANEXO 1..... | 98 |
| | ANEXO 2..... | 107 |
| | ANEXO 3..... | 114 |

RESUMO

A presente dissertação versou sobre o parvovírus suíno (PPV) onde, em um primeiro trabalho foi realizado o diagnóstico do PPV em leitões (saudáveis e refugos) e em fêmeas (de distintas ordens de parto) através de nested-PCR do soro. Os títulos de anticorpos das fêmeas foram determinados por Inibição da Hemaglutinação (HI) e comparados com os resultados da nested-PCR. A nested-PCR obteve resultados positivos em amostras de todas as categorias analisadas: leitões saudáveis (15,7% de animais positivos), leitões refugos (18,2%) e fêmeas (17,8%). Os índices de reprodutoras positivas para as distintas ordens de parto foram de 20,8%, 8,7%, 12,5%, 27,3%, 20,8% e 15,0% para as ordens de parto 1, 2, 3, 4, 5 e ≥ 6 , respectivamente. Através da HI, 84,7% dos soros possuíam anticorpos para PPV. Os títulos nas distintas ordens de parto foram de 2142,7 (8,7), 2403,1 (9,8), 2250,0 (9,9), 2952,2 (10,6), 2600,3 (9,8) e 2154,7 (9,7) para as ordens de parto 1, 2, 3, 4, 5 e ≥ 6 respectivamente ($\log_2 X$ entre parênteses). Não houve correlação estatisticamente significativa entre os resultados da nested-PCR e os títulos de HI. Ao contrário do que era esperado, fêmeas com altos títulos de anticorpos possuíam DNA do vírus na circulação. No segundo trabalho, foram estudadas seqüências da porção VP1/VP2 de PPV retiradas do GenBank, juntamente com cinco amostras seqüenciadas no presente estudo. A análise foi realizada quanto à presença de determinados aminoácidos e através de filogenia. Como resultados, o seqüenciamento revelou que duas das novas amostras (S30 e S31) apresentavam modificações em regiões consideradas importantes para a virulência do PPV. Entre estas, destaca-se a modificação no sitio 586, com a presença do aminoácido Thr. A análise filogenética demonstrou que as seqüências de PPV se dividem em dois grupamentos, porém com apenas um grupamento bem definido. Por último, o relógio molecular revelou que a separação dos dois grupos ocorreu há 2890 anos e a divisão dos sub-grupamentos mais recentes ocorreu nos últimos três séculos.

ABSTRACT

The present dissertation studied porcine parvovirus (PPV) and the first part describes the diagnosis of PPV in piglets sera (healthy and attrition) and females (with distinct parity orders. through nested-PCR. The antibody titers from females were analyzed by Hemoagglutination Inhibition and compared with the results from the nested-PCR. The nested-PCR results displayed positive animals in all sampled categories: healthy piglets (15.7% of positive animals), attrition piglets (18.2%) and females (17.8%). The results for the distinct parities orders were 20.8%, 8.7%, 12.5%, 27.3%, 20.8% and 15.0% for the parity orders 1, 2, 3, 4, 5 and ≥ 6 , respectively. The HI test detected 84.7% of the females positive to PPV. The titers in the distinct orders were 2142.7 (8.7), 2403.1 (9.8), 2250.0 (9.9), 2952.2 (10.6), 2600.3 (9.8) and 2154.7 (9.7) to the parity orders 1, 2, 3, 4, 5 and ≥ 6 respectively ($\log_2 X$ in parenthesis). No statically correlation was evidenced between the nested-PCR and the HI titers. Curiously, females with high antibody titers displayed the viral DNA in their circulation. In the second part, sequences of the PPV region VP1/VP2 were retrieved from GenBank, together with five samples sequenced in the present study. The analysis was performed by identifying the presence of specific aminoacids and by phylogeny. The sequenced samples displayed the presence of important aminoacids substitutions, including Thr in the 586 site in two samples (S30 and S31). The phylogenetic analysis revealed two clusters among the PPV sequences. However, only one cluster displayed a high definition. The molecular clock displayed that the separation between the two main clusters occurred 2890 years ago, and the separation between the most recent sub-clusters happened in the last 300 years.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante produtor mundial de alimentos e o agronegócio é um dos principais segmentos da economia nacional. Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor e também o quarto maior exportador de carne suína (ABIPECS, 2007). Entretanto, para manter a competitividade no mercado é preciso cuidar especialmente da sanidade das criações comerciais e, neste cenário, as doenças virais são preocupações constantes.

O parvovírus suíno (PPV) é considerado uma importante causa de problemas reprodutivos em suínos. Os sinais clínicos estão caracterizados por fetos mumificados, abortamento, natimortos e retorno ao estro (MENGELING et al., 2000). Nos últimos anos, foi evidenciado o surgimento e dispersão de novos patógenos causadores de falhas reprodutivas na suinocultura e, possivelmente por sua ação conjunta, o PPV ressurgiu como um importante agente infeccioso causador de perdas fetais em granjas.

O diagnóstico direto do PPV tem sido realizado em tecidos fetais através de hemaglutinação, imunofluorescência, ELISA e PCR (MENGELING, 1972; JOO et al., 1976a; RIVERA et al., 1986; HOHDATSU et al., 1988; SOARES et al., 1999). A detecção em tecidos distintos foi descrita utilizando a hibridização de ácidos nucléicos possibilitando a detecção do DNA viral no sêmen (GRADIL et al., 1990) e em leitões apresentando miocardite não supurativa através da PCR (BOLT et al., 1997). Entretanto, a detecção do PPV em soros ainda não foi realizada em amostras de campo, dificultando a avaliação da circulação do vírus dentro de uma granja.

Por outro lado, é comprovado que existem variações entre os genomas de amostras de campo de PPV, inclusive em regiões importantes para o caráter antigênico da amostra (SOARES et al., 2003; ZIMMERMANN et al., 2006). 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.

A presente dissertação foi composta por dois trabalhos. No primeiro, foi avaliada a presença do PPV, através de nested-PCR, em leitões (saudáveis e refugos) e em fêmeas (com diferentes ordens de parto) em criações comerciais, correlacionando estes resultados com os títulos de anticorpos obtidos por Inibição da Hemaglutinação. O segundo trabalho

visou caracterizar filogeneticamente as amostras de PPV obtidas no presente trabalho ou encontradas em banco de dados de genes, comparando-as com amostras utilizadas em vacinas comerciais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

O nome parvovírus foi proposto no Comitê Internacional para Nomenclatura de Vírus (ICTV) baseado no latim, onde a sintaxe *parvus* significa pequeno (ANDREWS, 1970). Esta nova nomenclatura substituiu a intenção de classificar estes vírus de fita simples de DNA como sendo picodnavírus (MAYOR e MELNICK, 1966). Atualmente, utiliza-se a classificação taxonômica determinada pelo ICTV (ICTV, 2008). Nesta, os parvovírus compõem a família *Parvoviridae* que, por sua vez, é dividida em duas subfamílias, a *Parvovirinae*, que infecta vertebrados, e a *Densovirinae*, que infecta insetos. A subfamília *Parvovirinae* é composta por cinco gêneros: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. O gênero *Parvovirus* possui 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 LuIII, vírus da panleucopenia felina, vírus minuto dos camundongos e vírus tumoral X. Conforme o ICTV (2008), todas as espécies deste gênero são antígenicamente distintas e sua infecção natural é comumente restrita a um único hospedeiro. Usualmente, as espécies possuem mais de 95% de similaridade em sua proteína não estrutural NS-1, sendo a maior variabilidade encontrada nas proteínas do capsídeo (VP).

O primeiro relato envolvendo possivelmente um membro da família *Parvoviridae* foi realizado há 50 anos, quando vírus de ratos provocaram efeito citopático em linhagens celulares (KILHAM e OLIVIER, 1959). Nos anos posteriores, vírus pertencentes a esta família já haviam sido encontrados em mais de cinco hospedeiros (HALLAUER e KRONAUER, 1960; BURGER et al., 1963; BERNHARD et al., 1963; HAMPTON, 1964; CARTWRIGHT e HUCK, 1967, ROSE et al., 1969) e seu tamanho, estrutura e propriedades sorológicas foram descritos (PAYNE, 1964; KARASAKI, 1966; HOGGAN, 1971; TINSLEY e LONGWORTH, 1973).

Em suínos, perdas reprodutivas em criações comerciais associadas a causas desconhecidas eram mundialmente altas até a década de 60 (LAWSON, 1961), sendo associadas a fatores ambientais, genéticos, nutricionais e agentes tóxicos (RASBECH,

1969). Ao final dos anos 60, com o avanço da virologia, a correlação de problemas reprodutivos com agentes infecciosos passou a ser mais bem compreendida e descrita (DUNNE, 1970). Entre a lista de infecções virais relacionadas a estes problemas estavam a peste suína clássica (YOUNG et al., 1955), os enterovírus suínos (DUNNE et al., 1965) e a Doença de Aujeszky (GORDON e LUKE, 1955). Em 1967, o PPV foi descrito pela primeira vez (CARTWRIGHT e HUCK, 1967), sendo posteriormente isolado em fetos em diversos países (BACHMANN, 1969; GENOV et al., 1971; JOHNSON e COLLINGS, 1969; COACKEY e SMITH, 1972; MENGELING, 1972; MORIMOTO et al., 1972; JOHNSON, 1973). Com o avanço das pesquisas, o PPV passou a ser considerado o principal agente responsável pela síndrome SMEDI (S: neonatos fracos [*stillbirth*]; M: mumificados [*mummification*]; ED: morte embrionária [*embryonic death*]; I: infertilidade [*infertility*]) (THOMSON e PROZESKY, 1994). Até a presente data, o PPV seguiu sendo relatado em diversos países e correlacionado com problemas reprodutivos em fêmeas suínas (MOSCARI et al., 1983; ROBINSON et al., 1985; FONI e GUALANDI, 1989; NASH, 1990; OBALDIA, 1991; BROLL et al., 1993; RIVERA et al., 1995; ORAVAINEN et al., 2005).

No Brasil, estudos de isolamento viral (GOUVEIA et al., 1984; BERSANO et al., 1995) e levantamentos sorológicos (GOUVEIA et al., 1984; MARTINS et al., 1984; BERSANO et al., 1993) relatam o PPV como um agente que circula nas criações brasileiras.

2.2 Propriedades básicas

Os membros da família *Parvoviridae* estão entre os menores vírus de DNA que afetam animais (SIEGL et al., 1985). Seu tamanho varia entre 18 e 26 nm, conforme a espécie do vírus. O PPV, juntamente com o vírus da panleucopenia felina (FPV) e o parvovírus canino (CPV-2) está entre os menores vírus desta família, com tamanhos entre 20 e 22 nm (TINSLEY e LONGWORT, 1973; CHAPMAN e ROSSMAN, 1993). O peso molecular (MW^1) do vírus é de 5,5 a 6,2 x 10⁶, com aproximadamente metade do peso

¹ *Molecular weight* (peso molecular) é a massa de uma proteína, sendo frequentemente expressa em Daltons (Da). É calculado através da distância em migração em gel de poliacrilamida.

dividido em sua massa protéica e outra metade composta por seu DNA (HORWITZ et al., 1996).

O genoma dos parvovírus é constituído por DNA linear de fita simples (CRAWFORTH et al., 1969). Sua extensão varia entre 4,5 *kilobases* (kb) a 5,5 kb, com os parvovírus autônomos atingindo as maiores extensões, e sua polaridade varia de acordo com a espécie do vírus (BATES et al., 1984; COTMORE e TATTERSALL, 1984; SIEGL et al., 1985). Em suas extremidades (3' e 5'), encontram-se seqüências palindrômicas com extensão variável entre 120 e 200 bases que formam estruturas em forma de “T” ou “Y” (BERNS e HAUSWIRTH, 1983; SHADE et al., 1986). Estas estruturas, aparentemente, apresentam função de *primers* (iniciadores) e manutenção da integridade da porção terminal do genoma. Na porção interna do genoma, são encontradas duas extensas fases de leitura abertas (*Open Reading Frames* - ORF²), situadas uma em cada lado, sem se sobrepor (Figura 1) (BERNS e LABOW, 1987; BERGERON et al., 1993). No caso do parvovírus suíno, a ORF situada à esquerda codifica para a proteína não-estrutural 1 (NS-1) e, através de *splicing*³, codifica as proteínas NS-2 e NS-3 (BERGERON et al., 1993). A proteína NS-1 possui atividade de helicase⁴ e *nickase*⁵ e é importante para a replicação e empacotamento viral (NUESCH et al., 1995), contudo, ainda pode se ligar às proteínas da célula hospedeira, induzir lise celular e apoptose (RAYET et al., 1998; DAEFFLER et al., 2003). As proteínas NS-2 e NS-3 ainda não têm função conhecida, contudo, acredita-se que estão igualmente relacionadas à replicação viral. Estas três proteínas possuem um único promotor, chamado P4, enquanto as proteínas estruturais possuem o promotor P40 (BERGERON et al., 1993). Este último é responsável pela regulação da transcrição das proteínas virais 1 e 2 (VP1 e VP2). A VP2 ainda irá formar outra proteína através de clivagem proteolítica, chamada de VP3 (Figura 1) (PARADISO, 1981). Além destas duas, outras ORFs pequenas também são encontradas em diferentes posições do genoma,

² É a porção de um genoma que contenha uma seqüência de nucleotídeos que potencialmente pode codificar uma proteína. A sua detecção é realizada observando a fase de leitura que não apresenta códons *stop* freqüentes.

³ Processo que remove os íntrons e reúne os éxons durante a transcrição do RNA. O *splicing* apenas ocorre em células eucariotas e, alguns vírus, como o PPV, podem utilizar este mecanismo para aumentar a variedade de suas proteínas (MISTELI et al., 1997).

⁴ Helicases são enzimas que quebram as ligações de ponte de hidrogênio entre as cadeias de DNA, fazendo com que estas se separem.

⁵ *Nickases* são uma nova classe de enzimas, que reconhecem uma seqüência específica em uma fita dupla de DNA e clivam apenas uma das fitas de maneira pré-determinada (ZHELEZNAYA et al., 2002).

inclusive sobrepostas às grandes ORFs (AMAND et al., 1991). A proteína SAT é um exemplo destas proteínas no PPV, utilizando parte do mesmo promotor da VP1 e VP2, a SAT mostrou-se fundamental para a replicação do vírus em células (ZÁDORI et al., 2005). Em outras espécies da família *Parvoviridae*, distintas e desconhecidas proteínas estão sendo descobertas com o advento de técnicas moleculares mais sensíveis (LUO e ASTELL, 1993; RAAB et al., 2002; ROS et al., 2006). Possivelmente, o genoma do PPV ainda apresente mais funções e proteínas a serem descobertas.

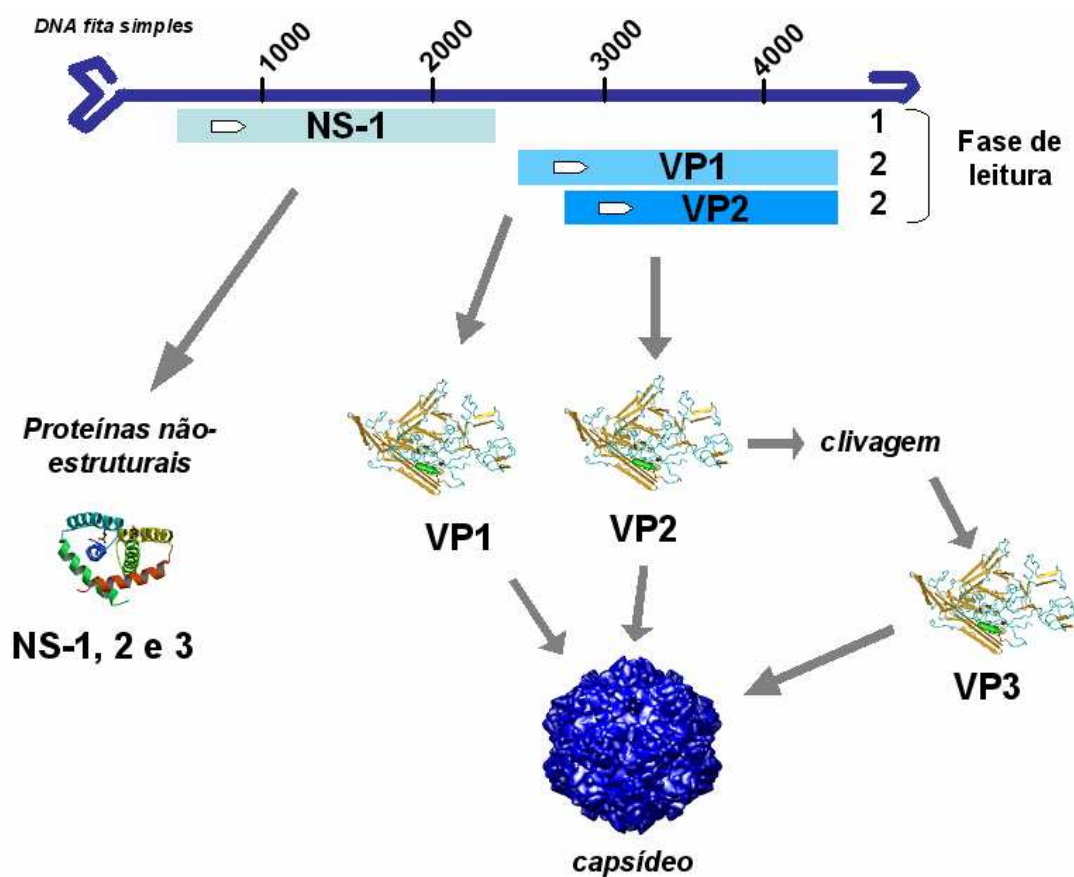


Figura 1. Representação da estrutura do genoma do PPV, com a localização das regiões que codificam as proteínas estruturais e não-estruturais. A fita de DNA está marcada a cada 1000 nucleotídeos.

O capsídeo dos parvovírus é uma partícula esférica formada a partir do arranjo das proteínas VP, que estão repetidas em mais de 60 cópias formando uma estrutura de simetria icosaédrica (CHAPMANN e ROSSMANN, 1993). Estas proteínas VP diferem apenas em sua porção inicial (amino-terminal) ou em modificações que ocorrem após a tradução

(SIMPSON et al., 2002). O tamanho das proteínas varia entre 80.000 a 86.000 kDa para a VP1, 64.000 a 75.000 kDa para a VP2 e 60.000 a 62.000 kDa para a VP3 (HORWITZ et al., 1996). Cada uma das 60 cópias em que as proteínas se agrupam é composta pelo grupo de aminoácidos comum da posição 37 a 584 (carboxi-terminal) da VP2 (TSAO et al., 1991). A única região ausente no capsídeo é a porção N-terminal da VP1, porém ainda é desconhecido como e por que é realizada sua excisão (XIE e CHAPMAN, 1996). Os agrupamentos são compostos por oito arranjos do tipo folha beta⁶ antiparalelas, conforme disposto na Figura 2 (ROSSMAN e JOHNSON, 1989; TSAO et al., 1991). A maior diferença de outros capsídeos é gerada pelo *loop*⁷ entre a cadeia β G e β H que tem tamanho de mais de 200 resíduos de aminoácidos, originando uma protuberância externa na face 3-*fold* (LILJAS, 1991).

⁶ Arranjo secundário, onde as cadeias polipeptídicas se associam formando uma estrutura achatada e rígida.

⁷ Projeção em forma de alça formada por aminoácidos, geralmente mantida por pontes dissulfeto.

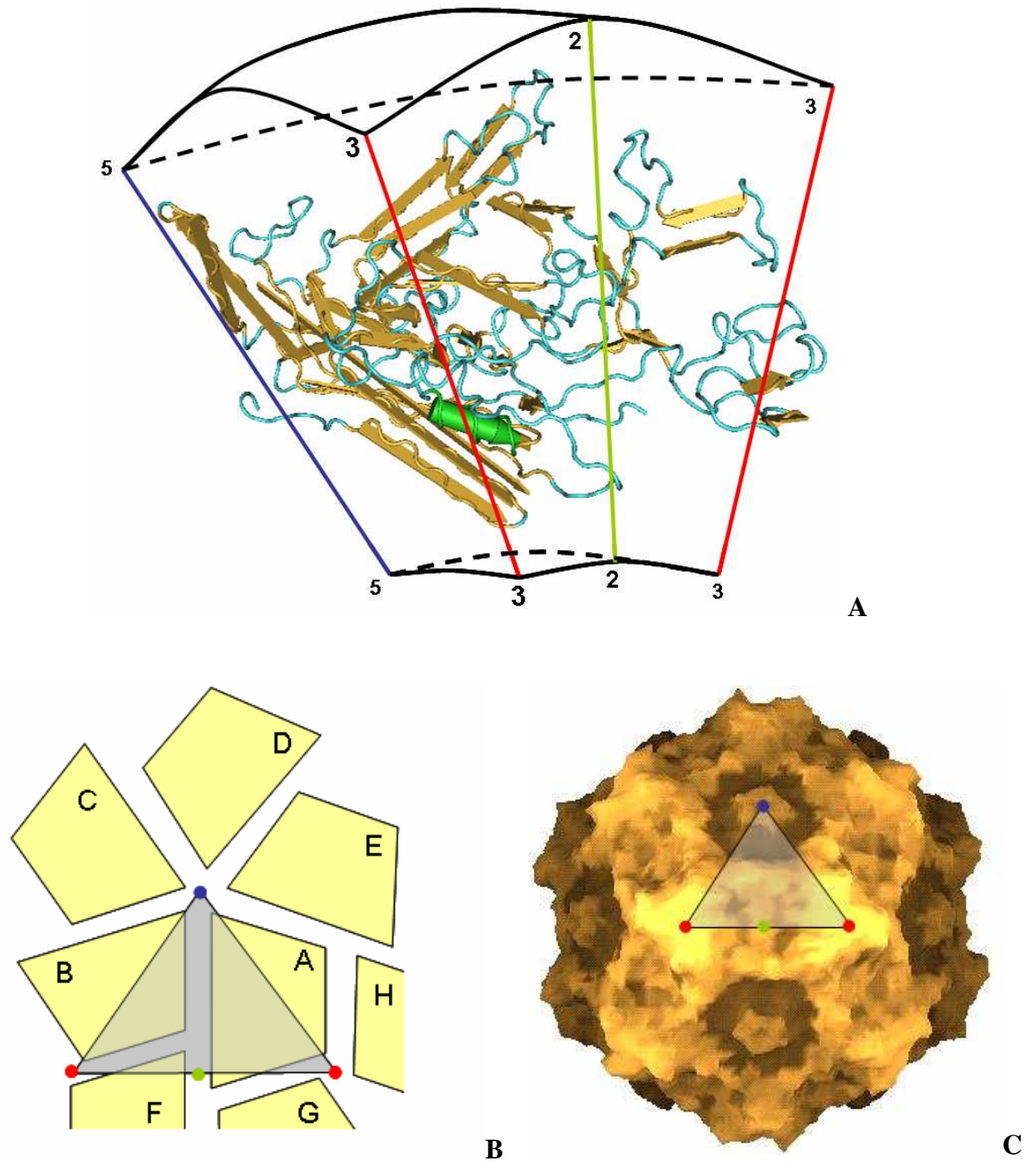


Figura 2. **A.** Visualização da proteína VP2 através da técnica de *cartoon*, acentuando seus domínios funcionais. A imagem foi gerada pelo *software* Cn3D versão 4.1., com coordenadas oriundas do banco de domínios “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Domains>”. **B.** Representação esquemática das subunidades que compõem a partícula viral. O capsídeo completo pode ser composto repetindo a estrutura piramidal 60 vezes. **C.** Visualização das estruturas do PPV através de cristalografia por difração de raio-X. A modelagem da estrutura foi realizada através do site: “http://viperdbscripps.edu/info_page.php?VDB=1”. Em todas as figuras, o 5'fold está em azul, o 3'fold em vermelho e o 2'fold em verde. A modelagem e detalhes nas ilustrações foram realizadas pelo autor desta dissertação.

A superfície interna do capsídeo de grande parte dos vírus apresenta vários aminoácidos básicos, presumivelmente para interagir com o fosfato da cadeia de DNA (BAN e MCPHERSON, 1995; XIE e CHAPMAN, 1996). Os parvovírus, diferentemente, apresentam os aminoácidos da superfície interna neutra. Contudo, as proteínas destes vírus apresentam muitos resíduos básicos entre seus sítios de ligação, resultando em uma relação eletrostática de grande entalpia⁸ (STEITZ et al., 1990). A superfície externa dos parvovírus é ligeiramente polar, embora apresente uma grande porção hidrofóbica. A presença de hidrofobicidade pode explicar a propensão das proteínas a se agruparem e formarem o capsídeo, além de auxiliar na interação com membranas das células e endossomos (XIE e CHAPMAN, 1996). As estruturas presentes na superfície da maioria dos parvovírus consistem de pequenas *spikes* (protuberâncias) na porção *3-fold*, *dimples* (depressões) na porção *2-fold* e *canyons* (cilindros circundados de depressões) na porção *5-fold* (TSAO et al., 1991).

Antes dos parvovírus conseguirem realizar a replicação e infecção, os vírus passam por uma série de interações no caminho entre o núcleo celular, onde são replicados, e a superfície da célula. A escolha do receptor varia entre os parvovírus e determina a especificidade com o hospedeiro, tropismo para determinados tecidos e pode influenciar a via endossomal que será seguida. Todos os parvovírus utilizam receptores que irão mediar à realização da endocitose celular e, entre estes receptores, destacam-se certas variedades de glicoproteínas, glicanos e glicolípídeos (HARBINSON et al., 2008). Entretanto, o receptor (ou receptores) utilizado pelo PPV ainda não é conhecido. Após a ligação com o receptor, os vírus são transportados no interior dos endossomos até as proximidades do núcleo (SEISENBERGER et al., 2001; DING et al., 2005). Durante o trajeto, o interior dos endossomos é submetido a uma redução de pH, que resulta em uma modificação reversível no capsídeo, favorecendo o escape viral do endossomo (VIHINEN-RANTA et al., 2002; FARR et al., 2005). Recentemente, foi observado que um parvovírus similar, o CPV-2, consegue escapar do endossomo mesmo sem haver acidificação (MANI et al., 2006; HARBINSON et al., 2008). O mecanismo de escape é descrito como realizado pela região da VP1 com a função de fosfolipase A₂ (PLA2) (GIROD et al., 2002; BLEKER et al., 2005; GRIEGER et al., 2007). De acordo com estes trabalhos, a seqüência PLA2 altera e

⁸ Grandeza física que representa a energia total de um sistema.

induz curvaturas na membrana dos endossomos, favorecendo a formação de poros. O acesso dos parvovírus até o núcleo ainda não é completamente conhecido, mas acredita-se que os vírus consigam entrar nos microtúbulos celulares e, assim, chegar ao núcleo (VIHINEN-RANTA et al., 2000; KELKAR et al., 2006; HIROSUE et al., 2007). Teoricamente, a entrada destes pequenos vírus poderia ser realizada através do complexo de poros do núcleo (NPC) de forma passiva e mantendo o vírus intacto (HARBINSON et al., 2008). Porém, um estudo onde se realizou o bloqueio destes poros revelou que o vírus conseguiu entrar no núcleo da mesma forma, sugerindo a existência de uma via alternativa de entrada (COHEN e PANTE, 2005). O mecanismo dos parvovírus para desnudamento e entrega do genoma não é conhecido, juntamente com os agentes que auxiliam este processo. Entre as teorias, está o estacionamento do capsídeo nos NPCs, seguida de uma simples extrusão do DNA viral do capsídeo dentro do núcleo (BARTLETT et al., 2000; VIHINEN-RANTA et al., 2000; MANI et al., 2006).

Uma vez com o genoma posto dentro do núcleo, a replicação dos parvovírus é altamente dependente do meio celular em que se encontram. Para que a replicação possa ocorrer, a célula necessita estar na fase “S⁹” de crescimento (RHODE, 1973). Possivelmente, esta replicação nesta fase está relacionada com o requerimento da DNA polimerase da célula, podendo o vírus utilizar a DNA polimerase α ou δ (KOLLECK et al., 1982). Além da fase “S”, a fase “G1¹⁰” também é utilizada pelo promotor P4 do vírus, transcrevendo proteínas NS e, possivelmente, preparando o núcleo para a replicação viral (DELEU et al., 1999).

O modelo de replicação dos parvovírus está baseado nas extremidades palindrômicas de genoma, que formam um *hairpin*¹¹, sendo denominado *Rolling Hairpin Model* (TATTERSALL e WARD, 1976). Neste modelo, a DNA polimerase se liga ao *hairpin* da extremidade 3’OH e sintetiza outra fita complementar de todo o genoma, inclusive do *hairpin* 5’P. Esta região, na fita recém sintetizada, terá final 3’OH. Após ação de enzima helicase, formará um novo *hairpin* 3’OH e fornecerá outro sítio de ligação para a

⁹ Fase do ciclo celular onde ocorre a replicação do DNA. Nesta fase, as enzimas de replicação celular estarão em maior concentração, propiciando a replicação do PPV.

¹⁰ A fase G1 é caracterizada por expressão de genes e síntese de proteínas. Isto permite a célula produzir todas as proteínas necessárias para a síntese de DNA.

¹¹ Estrutura formada pelo DNA similar a um grampo de cabelo, isto por que as extremidades apresentam seqüências palindrômicas que acabam anelando-se.

DNA polimerase sintetizar nova cópia do DNA viral (Figura 3). O final deste processo resulta em uma molécula de DNA dupla fita que contém quatro cópias do genoma viral (em fita simples). A clivagem deste DNA origina quatro moléculas contendo o genoma viral, duas com polaridade positiva e duas negativas, que são empacotadas separadamente. No empacotamento, as proteínas do capsídeo podem reconhecer o *hairpin* da extremidade 3'OH e empacotar as fitas simples dentro do capsídeo (WILLWAND e HIRT, 1991). Porém, ainda não está esclarecido como o pequeno e compacto capsídeo dos parvovírus consegue armazenar mais de 5 kb de DNA.

O gênero *Dependovirus*, também conhecidos como vírus adeno-associados (AAV) representa uma exceção na replicação dos parvovírus. Estes vírus, usualmente, necessitam de uma co-infecção com adenovírus ou herpesvírus para conseguir replicar (CASTO et al., 1967; BULIER et al., 1981; BAUER e MONREAL, 1986). Como estes vírus não apresentam importância veterinária, a sua replicação não será abordada nesta revisão.

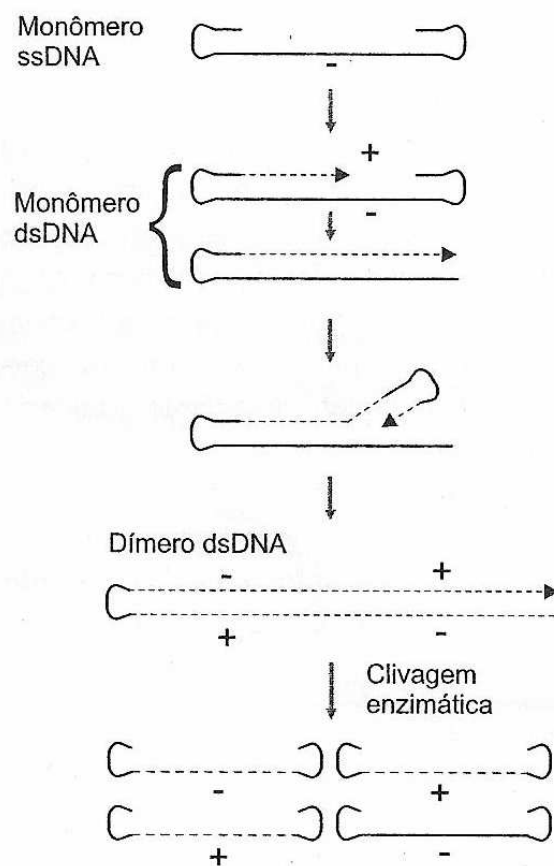


Figura 3. Esquema representativo da replicação do genoma viral. Adaptado de Murphy et al. (1999).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da parvovirose suína pode ser realizado através de várias técnicas. Entre estas, as técnicas sorológicas obtiveram uma maior importância devido a dificuldades na detecção e isolamento do PPV. Além do que, as infecções com vírus de campo induzem altos títulos de anticorpos e resposta prolongados, aumentando a eficácia dos métodos sorológicos (ROEHE et al., 2007). A técnica de inibição da hemaglutinação (HI) para os parvovírus passou a ser utilizada após 1966, quando foi descoberta a capacidade destes de aglutinar hemácias de determinadas espécies (BRAILOVSKY, 1966). Nos anos seguintes, o método de HI foi descrito e padronizado por vários autores, podendo ser realizado com hemácias de cobaias, galinhas, humanos e ratos (CARTWRIGHT et al., 1969; FUJISAKI 1975; JOO et al., 1976a). Atualmente, este método segue sendo utilizado como método

padrão ouro (*standard*) para a detecção de anticorpos em laboratórios de referência no Brasil. O teste de ELISA adaptado para o PPV possui eficácia equivalente ao HI (HOHDATSU et al., 1988; WESTENBRINK et al., 1989). Algumas vantagens do ELISA, como a leitura automatizada, alta reprodutibilidade e possibilidade de vendagem em kits, tornam este teste uma boa opção para o diagnóstico sorológico, principalmente para a análise de grande número de amostras pela agroindústria. Outros métodos sorológicos também foram adaptados para o PPV, como a micro-aglutinação em tubo (JOO et al., 1975), imunodifusão em gel de ágar (TOO et al., 1983), imunofluorescência (RIVERA et al., 1986) e a aglutinação rápida em placa (LÜ et al., 2006). Entretanto nenhuma destas técnicas conseguiu obter a praticidade ou confiança do HI ou ELISA para o PPV.

O isolamento viral pode ser utilizado para o diagnóstico devido ao efeito citopático que o vírus causa em determinadas células, como inclusões intranucleares, núcleo picnótico¹², irregularidade no contorno, granulações, vacúolos citoplasmáticos, diminuição na velocidade de divisão e conseqüente morte celular (CARTWRIGHT et al., 1969; MENGELING, 1972; MIRANDA et al., 1992). O PPV 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 divisões celulares, as linhagens celulares, como a ESK, PK15, SK6, ST, STE e SPEV, vêm sendo utilizadas com boa sensibilidade para a replicação viral (MENGELING, 1972; MIRANDA et al., 1992; ZIMMERMANN et al., 2006). Entretanto, mesmo em células de linhagem, a técnica não é muito eficaz devido à baixa infecciosidade do vírus a partir de tecidos provenientes de abortos ou fetos mumificados (ROEHE et al., 2007). Estes tecidos abortados, quando chegam ao laboratório, geralmente, encontram-se autolisados, o que dificulta a replicação viral. Além disto, o PPV pode necessitar de sucessivas passagens até causar efeito citopático.

A detecção direta do PPV pode ser realizada por distintos métodos, baseados em características do fenótipo ou genoma do vírus. Até meados da década de 80, a técnica mais comumente utilizada era a hemaglutinação (HA). Assim como o HI, esta técnica está baseada na capacidade hemaglutinante do vírus (BRAILOVSKY, 1966) e, através da realização de diluições seriadas pode determinar o título viral (JOO et al., 1976c). O avanço

¹² O núcleo apresenta um volume reduzido, com sua cromatina condensada.

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 a hibridização de ácidos nucléicos (ORAVEERAKUL et al., 1990). 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 aliar sensibilidade, especificidade e praticidade. Para a detecção do PPV, foram descritas duas técnicas de PCR, uma por um grupo americano (MOLITOR et al., 1991) e outra por um grupo brasileiro (SOARES et al., 1999). Interessantemente, as duas técnicas apresentam alvos genômicos bem distintos, a americana é projetada para amplificar a região correspondente as proteínas VP, enquanto a brasileira é projetada para a região NS. No Brasil, a técnica estabelecida pelo grupo brasileiro é utilizada em laboratórios de referência para a confirmação da parvovirose em tecidos fetais.

Atualmente, novos métodos de detecção estão sendo desenvolvidos. A PCR em tempo real já foi adaptada para a detecção do PPV por dois grupos de pesquisa (WILHELM et al., 2006 e MCKILLEN et al., 2007). A PCR em tempo real, além de poder ser mais sensível e específica do que a PCR convencional, possui como vantagem adicional à capacidade de quantificação e leitura automatizada. Porém, o custo elevado do equipamento está retardando sua difusão no Brasil. Ainda como perspectiva, a técnica de *micro-array*¹³ pode vir a ser utilizada para o diagnóstico para PPV. 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 (JACK et al., 2008; LEBLANC et al., 2008; OJHA e KOSTRZYNSKA, 2008).

2.4 Epidemiologia

O PPV é considerado um agente disseminado por toda população suína mundial. Em países com extensas áreas produtivas, como o Brasil, poucas criações podem ser

¹³ *Microarray* (traduzida como microarranjo) é uma técnica que permite medir milhares de parâmetros simultaneamente. Consiste em um arranjo pré-definido de seqüências de DNA sensibilizadas sob uma lâmina. A amostra a ser testada é posta para hibridizar com o DNA sensibilizado sob a lâmina, podendo a leitura ser realizada em leitores a laser ou leitores de fósforo radioativo (conforme a marcação de DNA utilizada).

consideradas livres do vírus. Possivelmente, um dos fatores que mais contribui para esta característica é a habilidade do PPV de resistir a condições adversas fora do hospedeiro. O vírus apresenta capacidade de resistir a grandes variações de temperatura e a muitos dos desinfetantes (BROWN, 1981), podendo sobreviver por até quatro meses em excreções e secreções (MENGELING e PAUL, 1986). Devido a estas características, a transmissão oronasal é considerada a principal via de infecção para animais adultos (MENGELING, 1999).

Conforme a literatura, a doença afeta principalmente fêmeas de primeiro parto, mas o vírus pode infectar animais de todas as idades (MORAES e COSTA, 2007; ROEHE et al., 2007). A doença ocorre quando as fêmeas que apresentam baixos títulos de anticorpos adquirem o vírus durante a gestação e, como o PPV apresenta avidéz por células em divisão, o feto e o envoltório fetal podem ser atingidos. Fêmeas multíparas apresentam menores problemas causados pelo vírus devido ao desenvolvimento de imunidade ativa (MENGELING et al., 2000).

A presença do vírus é raramente evidenciada em leitões, que são considerados imunes por possuírem anticorpos protetores contra o PPV adquiridos através do colostro (MENGELING et al., 2000). Esta imunidade passiva diminui progressivamente nos leitões, permanecendo por até quatro a seis meses de idade (PAUL et al., 1982). Após o amadurecimento do sistema imune, os animais adquirem imunidade ativa contra o PPV, que, aparentemente, persiste por toda a vida do animal, podendo ser reforçada por repetidas exposições ao vírus de campo (MENGELING et al., 2000).

Os efeitos do vírus sobre o embrião ou feto estão relacionados com a idade em que a fêmea adquire a infecção. Durante o início da gestação, o conceito é protegido pela zona pelúcida impedindo a infecção pelo PPV. Ao ingressar no estágio de embrião, a infecção pode resultar em morte embrionária seguida de reabsorção fetal. Após a ossificação, que inicia em torno do 35º dia de gestação, a infecção do feto pelo PPV igualmente ocasiona a morte, mas a reabsorção é impedida pelo esqueleto, resultado em mumificação fetal. A partir do período em que o feto torna-se imunocompetente, por volta dos 70 dias de gestação, ele é capaz de produzir anticorpos próprios e sobreviver à infecção (JOO et al., 1976b; MENGELING e CUTLIP 1976). Outra possibilidade para a baixa infectividade do PPV em fetos no último terço da gestação seria uma menor atividade de mitose, resultando

em maiores dificuldades para a replicação do vírus (MENGELING et al., 2000). Em condições experimentais, inoculando fêmeas com o vírus durante o início da gestação, alguns neonatos sobreviventes apresentavam vírus, contudo sem apresentar anticorpos, sugerindo neste caso uma reação de imunotolerância (CARTWRIGHT et al., 1971). Porém, a presença de animais imunotolerantes é extremamente rara, com poucos casos de campo conhecidos (JONHSON et al., 1976; MENGELING, 1999).

Os machos reprodutores podem desempenhar um papel importante na epidemiologia viral. O vírus, em infecções agudas, é excretado por várias vias, incluindo o sêmen, o que já foi evidenciado de forma experimental e natural (MCADARAGH e ANDERSON, 1975; GRADIL et al., 1990). Em trabalhos com inoculação experimental do PPV em machos reprodutores, foi possível o isolamento viral a partir do testículo e de linfonodos escrotais, indicando a susceptibilidade e conseqüente transmissão do vírus pelo sêmen (LUCAS et al., 1974; MENGELING et al., 2000). Ressalta-se que ainda faltam estudos que utilizem técnicas mais sensíveis para quantificar a incidência de PPV em machos e identificar sua importância.

O PPV também pode ser encontrado em outras espécies animais. Em javalis (*Sus scrofa*), vários estudos sorológicos evidenciaram o contato com este vírus, através da detecção de anticorpos (NEW et al., 1994; VICENTE et al., 2002; VENGUST et al., 2006; FENATI et al., 2009). Curiosamente, sorologia positiva para PPV foi encontrada em uma população recém descoberta de javalis e distante de outros animais, bem como em javalis africanos (*Phacochoerus aethiopicus*), indicando que o vírus consegue replicar nestes animais, contudo em nenhum destes casos o vírus foi isolado ou caracterizado (THOMSON e PEENZE, 1980; GIPSON et al., 1999).

2.5 Sinais clínicos

A manifestação clínica observada decorrente da infecção pelo PPV são falhas reprodutivas, principalmente em nulíparas (MENGELING et al., 2000). As manifestações estão diretamente relacionadas com o período gestacional em que a fêmea foi infectada. As fêmeas podem apresentar retorno ao estro, abortamento, baixo número de leitões ao parto, fetos mumificados e natimortos (GILLICK, 1970; DONALDSON-WOOD et al., 1976, MENGELING, 1999). O único sinal que pode ser observável na fêmea é uma redução em

sua cintura, quando os fetos morrem na última metade da gestação e seus fluidos passam a ser reabsorvidos (MENGELING, 1999). Na granja, sinais importantes para identificação de parvovirose são atrasos na parição e períodos entre partos prolongados (MENGELING et al., 2000).

O PPV ainda foi isolado e relacionado a outros sinais clínicos. Entre estes estão o isolamento do vírus de pulmões de suínos com pneumonia (DARBYSHIRE e ROBERTS, 1968), o isolamento na região dos turbinados em suínos com rinite (MENGELING, 1972), isolamento em animais com diarreia (DEA et al., 1985; YASUHARA et al., 1989) e isolados a partir de lesões cutâneas (KRESSE et al., 1985; CHOI et al., 1987; WHITAKER et al., 1990; LAGER e MENGELING, 1994). A única evidência de replicação viral em um destes tecidos foi encontrada em células epiteliais situadas na cripta do intestino, através da microscopia eletrônica. Neste trabalho, o vírus não apresentou afinidade por anticorpos específicos para PPV, sendo sugerido pelo autor que este parvovírus poderia ter características antigênicas distintas do PPV (DUHAMEL et al., 1991). É importante ressaltar que a maioria destes achados são eventos isolados, podendo ser apenas achados acidentais.

2.6 Patogenia

A patogenia do PPV em fêmeas está principalmente relacionada com sua capacidade de infecção do feto (MENGELING et al., 2000). Ainda não está claro como o vírus consegue ultrapassar a barreira transplacentária, que separa a circulação materna da circulação fetal (WILHELM et al., 2005). Os suínos apresentam placenta epitélio-corial, onde o trofoderma¹⁴ fetal está em contato com o epitélio uterino. Ambos formam microvilos, que se interdigitam resultando em uma ampla área para difusão de substâncias (MIGLINO et al., 2001). As células que formam estas camadas estão intimamente ligadas por junções que não permitem a passagem de pequenas moléculas, como por exemplo, os anticorpos (WILHELM et al., 2005). 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 (MENGELING et al., 2000). Fisicamente, devido ao seu tamanho, o PPV não conseguiria

¹⁴ O trofoderma é a camada externa de células do blastocisto, formará a placenta e outros anexos.

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 (VALLET e FREKING, 2007). A passagem por replicações sucessivas através das camadas placentárias é improvável devido à ausência do vírus em mensurações realizadas nestas camadas (MENGELING et al., 1978). Foi observado que linfócitos fetais podem estar presentes na circulação da mãe (RUDEK e KWIATKOWSKA, 1983). 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 (PAUL et al., 1979; KRAKOWKA et al., 2000). A presença do vírus em tecidos linfóides de animais adultos também tem sido descrita, reforçando esta teoria (LUCAS et al., 1974; MENGELING et al., 2000).

Quando o vírus atinge o embrião ou o feto, encontra um ambiente favorável para se replicar devido à alta taxa de mitose que a maioria destes tecidos apresenta. Examinando a distribuição do PPV em diferentes tecidos fetais, o vírus foi encontrado no intestino, coração, fígado, pulmão, rim, baço, timo, gônadas e cérebro (ORAVEERAKUL et al., 1993; WILHELM et al., 2005). Foi observado que as cepas de PPV mais virulentas apresentam maior concentração e maior difusão entre os tecidos, porém sem maiores predileções definidas por determinados tecidos (Figura 4) (WILHELM et al., 2005). Por outro lado, em trabalho recente realizado no Brasil, foi observada, através de PCR, uma maior incidência de PPV no pulmão e coração de fetos mumificados (WOLF et al., 2008). Acredita-se que a morte do embrião ou feto ocorre devido à replicação viral nos tecidos do concepto (MENGELING et al., 2000), embora maiores detalhes sobre a patogenia viral ainda não foram esclarecidos.

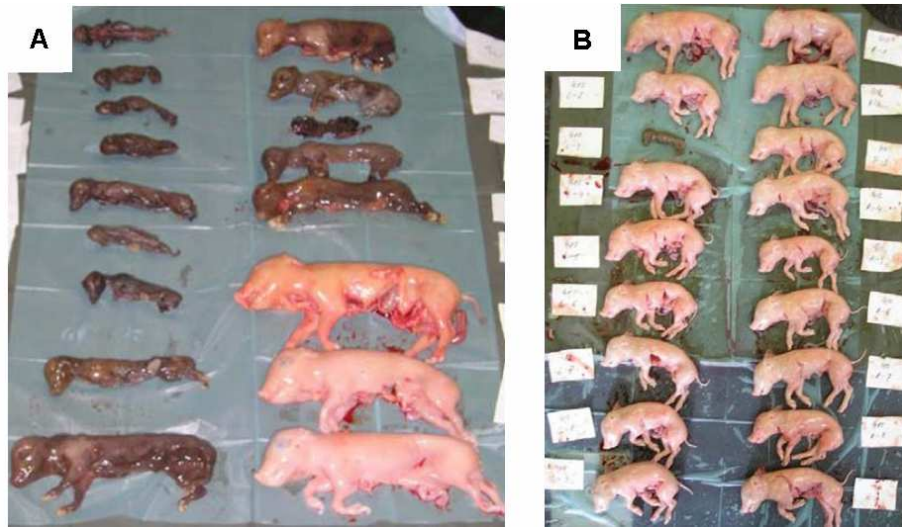


Figura 4. Fetos após infecção experimental com duas cepas de PPV. **A:** Ceba PPV27a, relacionada à alta virulência na Alemanha. **B:** Ceba NADL-2, considerada de baixa virulência. Fêmeas gestantes foram inoculadas com os vírus aos 40 dias e os fetos foram retirados aos 90 dias de gestação. Adaptado de Zeeuw (2006).

A presença de lesões microscópicas ou macroscópicas ocasionadas pelo PPV não foi descrita em animais adultos não-gestantes (MENGELING, 1999). Em gestantes, as lesões microscópicas caracterizam-se por acúmulo de células mononucleares no endométrio, lâmina própria e miométrio, podendo estar dispersas ou adjacentes aos vasos. A presença de infiltrados linfocitários no cérebro, coróide do olho e medula espinhal também foi evidenciada nestes animais. (HOGG et al., 1977; LENGHAUS, 1978). Em neonatos, o PPV pode afetar o coração, ocasionando miocardite não-supurativa (BOLT et al., 1997).

As lesões macroscópicas em embriões são a morte, seguida da reabsorção de fluídos e tecidos moles e, possivelmente, microscopicamente, as lesões sejam a necrose e dano vascular. Já no feto, as lesões macroscópicas são perdas de condição corporal, congestão, edema, hemorragia e acúmulo de líquido sanguinolento em cavidades corpóreas. Após a morte do feto, ocorre uma descoloração da pele resultante da hemorragia, dando ao feto uma tonalidade escura. A desidratação dos tecidos leva à mumificação (MENGELING, 1999). As lesões microscópicas consistem em necrose celular em diversos tecidos, inflamação e infiltração de células mononucleares (JOO et al., 1977; LENGHAUS, 1978).

2.7 Relação com o sistema imune do hospedeiro

A capacidade do parvovírus suíno de ocasionar lesões está intimamente relacionada ao sistema imune de seu hospedeiro. A primeira defesa que o sistema imune utiliza contra o PPV são barreiras físicas, químicas e microbianas (ROTH, 1999). As defesas físicas incluem o processo de autolimpeza, tosse, espirro e fluxo de muco no trato respiratório e diarreia e vômito no trato gastro-intestinal. As barreiras químicas incluem o pH ácido do trato intestinal e uma série de enzimas em ambos os tratos. Por último, a barreira microbiana está presente no intestino e no muco do trato respiratório (ROTH, 1999, TIZARD, 2002). Possivelmente, por apresentar um capsídeo simples e compacto (CHAPMANN e ROSSMANN, 1993), capaz de suportar alterações bruscas de temperatura e pH (CARTWRIGHT et al., 1969; MENGELING, 1972; MORIMOTO et al., 1972), o PPV consiga ultrapassar esta primeira barreira com facilidade. O conceito ainda apresenta uma proteção física a mais do que o leitão ou o suíno adulto, já que, para infectá-lo, o vírus terá que ultrapassar a barreira placentária.

Após o primeiro contato com o agente, quando ocorrem re-infecções, o sistema de resposta imunoadquirido passa a ter importância (LADEKJÆR-MIKKELSEN e NIELSEN, 2002). Este sistema de resposta é estimulado por epítopos que se ligam a receptores específicos nos linfócitos T ou células T. Para que ocorra esta ligação, a célula infectada deve processar o antígeno e apresentá-lo através de MHC de classe I (MORÓN et al., 2003). 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 PPV (MORÓN et al., 2002). As células T citotóxicas ($CD8^+$) reconhecem estes antígenos processados e realizam parte do controle sobre a infecção viral através da liberação de citotoxinas (RUEDA et al., 2004), 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.

A forma mais conhecida de defesa do sistema imune contra o PPV é através do desenvolvimento de anticorpos específicos para o vírus. Esta imunidade ativa é associada a altos títulos de anticorpos contra PPV, maiores que 256 quando mensurados por HI

(JOHNSON et al., 1976). Os títulos de anticorpos induzidos pelo PPV, além de altos, são duradouros, podendo ser utilizados para o monitoramento de rebanhos.

2.8 Sorologia

A mensuração dos títulos sorológicos de anticorpos para PPV iniciou nos anos 70, com a padronização da técnica de HI (JOO et al., 1976a). Os estudos realizados passaram a observar presença de títulos elevados, com uma diferença bem demarcada de acordo com a faixa etária dos animais (Tabela 1). Foi evidenciado que animais jovens, abaixo de seis meses, apresentavam títulos baixos (supostamente oriundos da imunidade passiva) e, após este período, quase todos os animais estudados (95-100%) apresentavam títulos acima de 256 (oriundos da imunidade ativa) (JOHNSON et al., 1976). Desta forma, ficou evidenciado o caráter ubiqüitário do vírus, assim como sua ampla capacidade de disseminação dentro de uma granja.

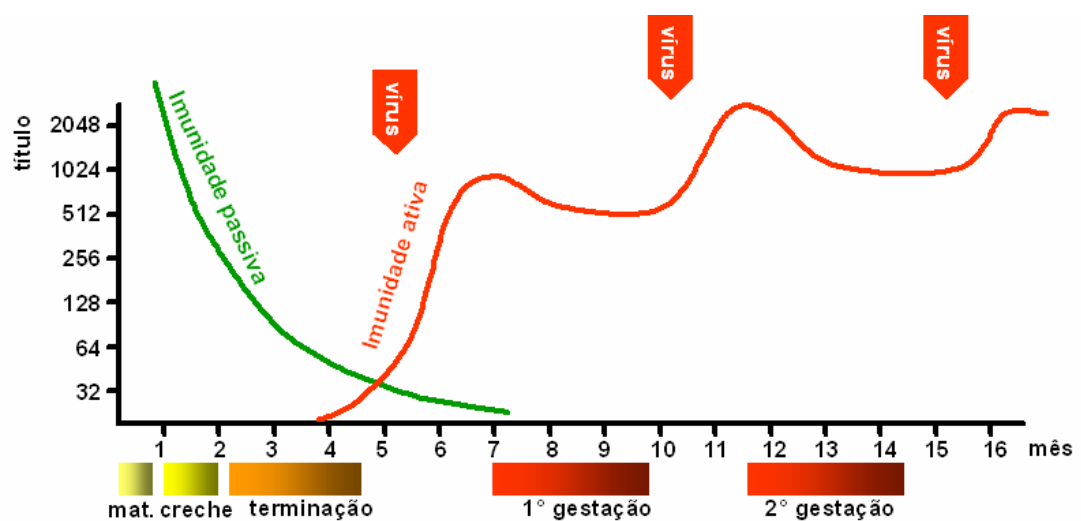


Figura 5. Gráfico demonstrando a imunidade ofertada por anticorpos em relação à categoria. As setas vermelhas (com inscrição “vírus”) indicam possíveis contatos com vírus de campo. Adaptado de Johnson et al. (1976).

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 PPV 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 (ORAVAINEN et al., 2005; ORAVAINEN et al., 2006).

A distinção entre títulos de anticorpos 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 em HI (ORAVAINEN et al., 2006). Entretanto, a impossibilidade de diferenciar anticorpos estimulados por vacinas de uma resposta estimulada por vírus circulantes, juntamente com a falta de uniformização de métodos sorológicos, dificultam este tipo de análise.

Devido a isto, informações sobre as perdas reprodutivas da granja e diagnóstico por detecção direta passaram a ser necessários (ORAVAINEN et al., 2005). Além disto, quando apenas fêmeas nulíparas são vacinadas, ou então, a vacinação é irregular, a proporção de fêmeas múltiparas susceptíveis a infecção aumenta gradualmente (HUYSMAN et al., 1992).

No Brasil, já foram realizados levantamentos sorológicos em criações comerciais antes da introdução da vacina (GOUVEIA et al., 1984) e após seu uso (LOBATO et al., 1989; LOBATO, 1992; BARTHASSON et al., 2006; PIMENTEL et al., 2006) e em criações rústicas para fins de subsistência (RODRIGUEZ et al., 2003). Em todos os trabalhos, foram observadas elevadas porcentagens de animais com títulos heterogêneos anti-PPV. 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.

2.9 Detecção direta

Diferentemente da detecção indireta, através de sorologia, a detecção direta do PPV poderia fornecer a comprovação de que o vírus está replicando no hospedeiro, podendo levar a perdas reprodutivas. Tradicionalmente, esta é realizada através da técnica de isolamento viral (LESLIE-STEEN e KIRKBRIDE, 1983) e da PCR (MORENO et al., 2007; PESCADOR et al., 2007; WOLF et al., 2008) em tecidos oriundos de abortamentos. 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.

2.10 Associação com outros agentes

A emergência de novos vírus, como o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV), ocasionou grandes perdas econômicas para a suinocultura (ALBINA, 1997; TOMÁS et al., 2008). Devido à capacidade imunodepressora destes vírus (DREW, 2000; SEGALÉS et al., 2004), a infecção associada a outros patógenos, entre eles o parvovírus suíno, tem sido verificada por diversos autores.

O PCV2 é considerado o principal agente associado à Síndrome da Refugagem Multissistêmica do Suíno (PMWS) (MEEHAN et al., 1998; MOROZOV et al., 1998). Esta síndrome afeta principalmente leitões desmamados, ocasionando perda progressiva de peso, deficiência respiratória e, ocasionalmente, lesões de pele (HARDING, 1996). Estudos experimentais realizados com a finalidade de reproduzir a PMWS têm demonstrado que o PCV2 é fundamental para o desenvolvimento da síndrome, porém acredita-se que outros agentes infecciosos sejam necessários (ALLAN et al., 1999; KENNEDY et al., 2000; CASTRO et al., 2007). Entre os agentes associados estão o PPV, PRRSV, torque teno vírus (TTV), vírus da influenza suína, coronavírus e bactérias, como, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* (KIM e LYOO, 2002; KRAKOWKA et al., 2000; PALLARES et al., 2002; KEKARAINEN et al., 2006; CASTRO et al., 2007; DORR et al., 2007). O PPV, em inoculações experimentais, potencializou a ação do PCV2, ocasionando a PMWS com uma maior intensidade (ALLAN et al., 1999; KENNEDY et al., 2000). Apesar destas pesquisas, o principal agente associado ao PCV2 ainda não foi elucidado, sendo que, recentemente, o TTV tem sido apontado como um provável co-fator para a PMWS (KEKARAINEN et al., 2006).

Diferentemente do PCV2, o PRRSV é capaz de produzir a síndrome PRRS mesmo sem outros agentes associados (DEA et al., 1992; CHRISTIANSON et al., 1993; ROSSOW et al., 1994). A síndrome causa principalmente anorexia, abortos (no terço final da gestação), natimortos e neonatos fracos (CHRISTIANSON et al., 1993; MENGELING et al., 2000). O vírus possui elevada capacidade imunodepressora, favorecendo a infecção por

agentes secundários, como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis* (DONE e PATON, 1995). Assim como o PRRSV, o PPV também causa falhas reprodutivas, seria esperado que este conseguisse se beneficiar da imunodepressão ocorrida na PRRS. Entretanto, até o momento, os estudos realizados não comprovaram qualquer relação positiva entre o PPV e o PRRSV em falhas reprodutivas (QUINTANA et al., 2001; LAROCHELLE et al., 2003; RITZMANN et al., 2005).

2.11 Variabilidade genética em vírus ssDNA e no parvovírus suíno

Em geral, acreditava-se que vírus com genomas compostos por DNA não possuíam maior variabilidade do que genes eucariotos (FLINT et al., 2000; VILLARREAL e DE FILIPPIS, 2001), de modo que o estudo da variabilidade genética não seria uma área de importância no controle e prevenção de doenças causadas por estes vírus (LÓPEZ-BUENO et al., 2006). Esta idéia foi inicialmente construída porque, em grande parte, estes vírus utilizam o complexo de polimerase celular, que é capaz de manter alta fidelidade devido a um mecanismo de reparação de erros (ECHOLS e GOODMAN, 1991), possibilitando baixas taxas de mutação (substituição de nucleotídeo por etapa de replicação) em genes celulares de 10^{-10} a 10^{-9} (DRAKE, 1991). Em contrapartida, os vírus com genoma composto por RNA, por não possuírem sistemas de reparação de erros, apresentam taxas de mutação variando entre 10^{-5} a 10^{-3} (DRAKE, 1993), conforme a adaptação populacional ao hospedeiro (LÓPEZ-BUENO et al., 2006).

Até poucos anos atrás, o conhecimento sobre como as mutações ocorriam em vírus estava restrito a erros na polimerase, modificações em nucleotídeos causadas por enzimas celulares e introdução de inserções ou deleções por replicação e recombinação (DUFFY et al., 2008). Entretanto, estudos *in vivo* sobre a dinâmica das mutações revelaram a existência de fatores adicionais, como oxidação, metilação¹⁵ de bases e desaminação¹⁶, que podem afetar as taxas de mutação (FREDERICO et al., 1990; DRAKE, 1993; XIA e YUEN, 2005; DUFFY et al., 2008). Alguns destes fatores, como a desaminação, podem ocorrer por indução química ou ao acaso, principalmente afetando o DNA se o seu genoma permanecer por mais tempo sob forma de fita simples (FREDERICO et al., 1990; XIA e YUEN, 2005).

¹⁵ Metilação é o termo utilizado para denominar a substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo metila.

¹⁶ Mudança de uma base normal (A, C, T ou G) para uma base atípica.

Neste contexto, estudos envolvendo mutações de *ssDNA* passaram a ser realizados, evidenciando taxas de mutação de até 10^{-6} (Figura 5) (RANEY et al., 2004). Acredita-se que esta alta taxa de mutação, similar a vírus de RNA, seja mais evidente em vírus com tamanho genômico menor que 13 kb (DUFFY et al., 2008), como os parvovírus.

Os parvovírus de carnívoros possibilitaram o primeiro relato bem documentado sobre a evolução de vírus de *ssDNA* (DUFFY et al., 2008), através da evolução e mudança de hospedeiro do vírus da panleucopenia felina (FPV) para o parvovírus canino (CPV-2) (LÓPEZ-BUENO et al., 2006). A base desta mudança foi a adaptação do FPV aos cães através da troca de vários aminoácidos nas proteínas do capsídeo (HUEFFER e PARRISH, 2003). Acredita-se que a emergência e adaptação do CPV-2 ocorreram entre 1968 e 1978, atingindo uma taxa de substituição de $7,1 \times 10^{-3}$ nucleotídeos por sítio por ano (SHACKELTON et al., 2005). Após adaptado em seu novo hospedeiro, o CPV-2 continuou a sofrer substituições em seus nucleotídeos, originando os tipos 2a, 2b (PARRISH et al., 1985; PARRISH et al., 1988) e 2c (Anexo 1). Atualmente, informações genéticas sobre os parvovírus autônomos estão disponíveis para amostras isoladas de distintos hospedeiros, entre eles bovinos, carnívoros, humanos, martas, roedores e suínos, apresentando níveis distintos de mutações para cada um deles (BUONAVOGLIA et al., 2001; BADGETT et al., 2002; SOARES et al., 2003; MANNING et al., 2007; PARSYAN et al., 2007; KNUUTTILA et al., 2009; LÓPEZ-BUENO et al., 2008).

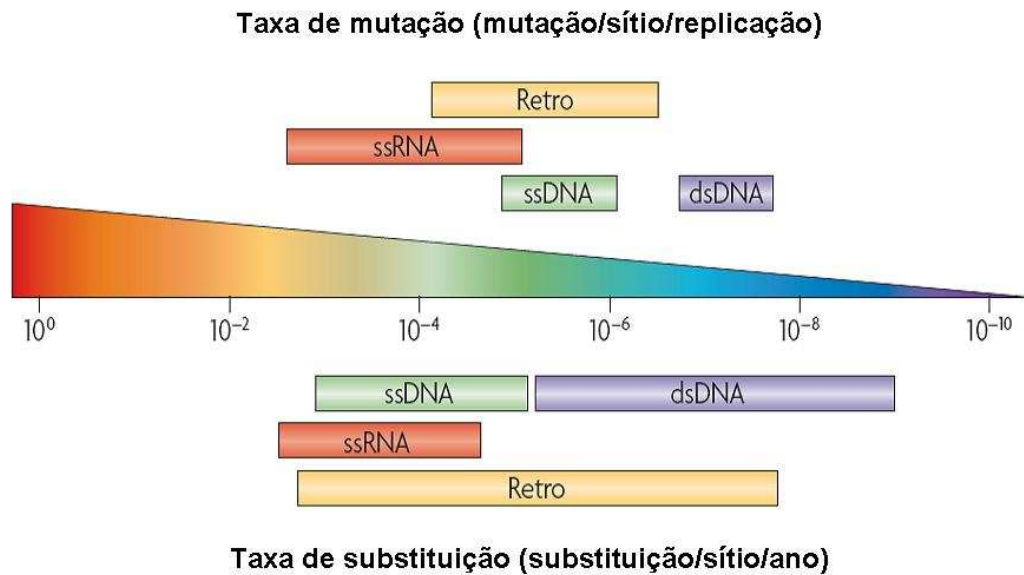


Figura 6. Comparação entre taxas de mutação (acima) e substituições em vírus (abaixo), adaptado de Duffy et al. (2008). A delimitação de cada grupo viral foi realizada através dos valores extremos encontrados no cálculo dos valores de substituição ou mutação. Os vírus utilizados para compor o cálculo foram: vírus da imunodeficiência humana tipo I e *simian foamy virus* (retrovírus), vírus da estomatite vesicular suína e lissavírus de morcegos europeu (*ssRNA*), parvovírus canino e vírus do caracol da folha amarela (*ssDNA*) e papilomavírus BK e herpesvírus (*dsDNA*).

Em suínos, foram realizados dois estudos avaliando a variabilidade genética de amostras circulantes de PPV. O primeiro foi realizado com amostras brasileiras, dos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, evidenciando que as amostras se dividiam em dois grupos filogenéticos distintos, porém ainda com subdivisões internas (SOARES et al., 2003). O segundo foi realizado com amostras isoladas na Alemanha e, igualmente, foi identificada a presença de dois grupos filogenéticos distintos (Figura 6). Conforme os autores, o estudo demonstrou que o PPV é geneticamente mais variável do que previamente se pressupunha (ZIMMERMANN et al., 2006).

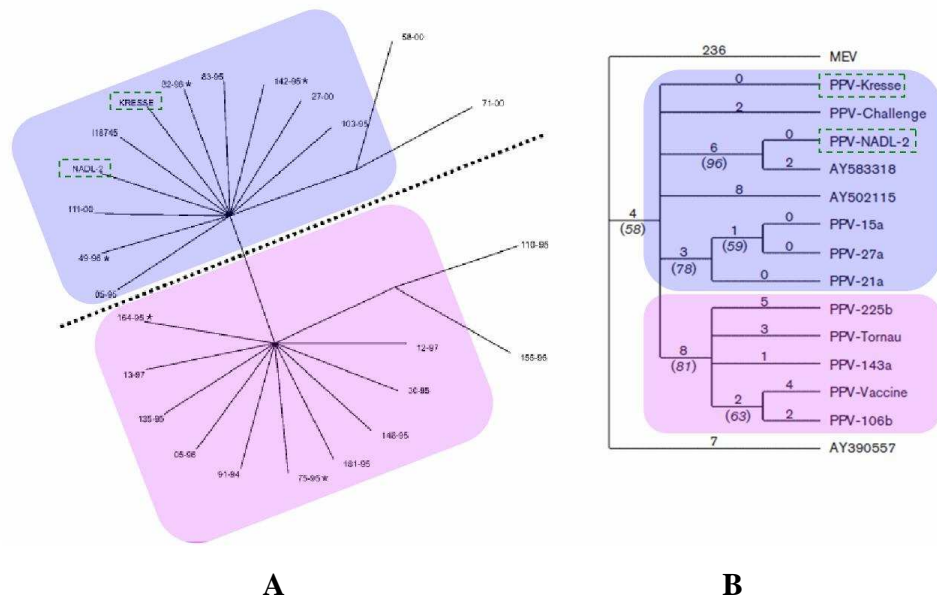


Figura 7. Visualização das árvores filogenéticas de PPV encontrados nos trabalhos de Soares et al. (2003) (A) e Zimmermann et al. (2006) (B). As árvores foram construídas pelos referidos autores através da análise dos aminoácidos, utilizando o método *maximum-parsimony*. Os distintos grupos obtidos em cada trabalho estão destacados (azul e lilás), assim como as cepas Kresse e NADL-2 (pontilhado verde).

A significância epidemiológica destas mutações e substituições no PPV foi mais bem compreendida em estudo que sequenciou e analisou as diferenças entre a cepa patogênica Kresse e a pouco patogênica NADL-2 (BERGERON et al., 1996). 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-92¹⁷→R, I-215 (378)→T, D-378 (528)→G, H-383 (533)→Q, S-436 (586)→P e R-565 (627)→K). Outros autores, estudando o tropismo de cepas de CPV, FPV e MVM, verificaram que estes possuem regiões imunodominantes situadas nas proteínas do capsídeo (PARRISH e CARMICHAEL, 1986; GARDINER et al., 1988; PARRISH, 1991; TSAO et al., 1991; ETINGOV et al., 2008). Ao extrapolar a estrutura tridimensional das proteínas do capsídeo do PPV, com os vírus acima referidos, foi observado que a modificação D-378→G está

¹⁷ Numeração dos aminoácidos da proteína VP2 de acordo com Bergeron et al. (1996). Em parênteses está a numeração de acordo com a proteína VP1 para cada sítio.

próxima à base do vértice triplo, enquanto que a S-436→P está no topo do mesmo vértice. As modificações I-215→T, H-383→Q e R-565→K estão no vértice duplo, podendo ser potencialmente importantes por possuírem resíduos responsáveis pela resposta do hospedeiro e hemaglutinação (Figura 7) (BERGERON et al., 1996).

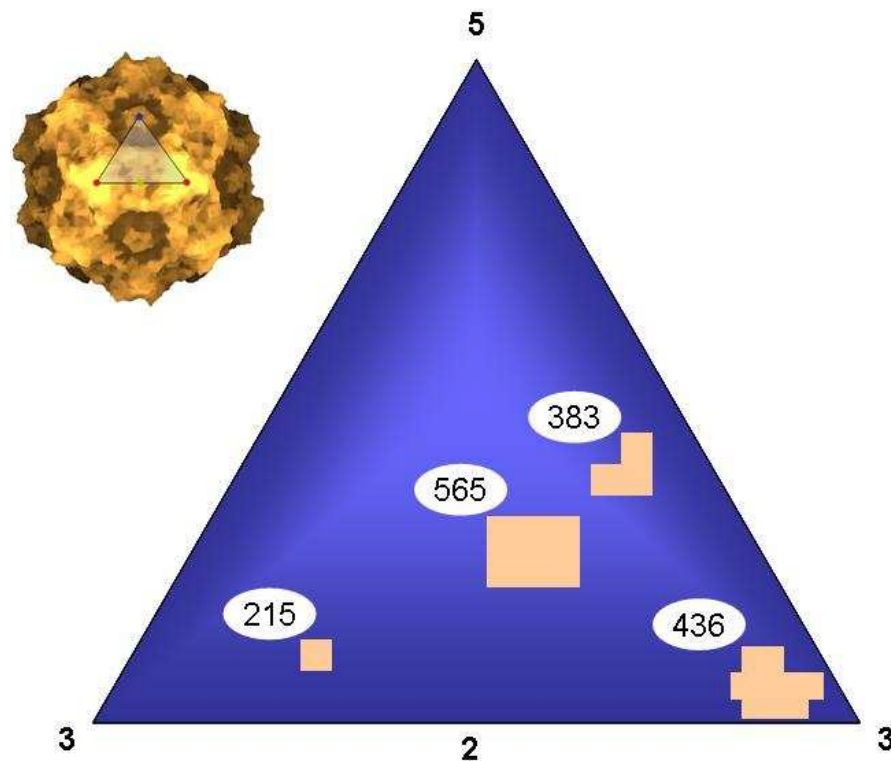


Figura 8. Mapa dos aminoácidos de superfície (215, 383, 436 e 565) em uma unidade do capsídeo icosaédrico. Adaptado de Bergeron et al. (1996). Numeração conforme a proteína VP2.

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 PPV enquadradas em distintos grupos filogenéticos em fêmeas gestantes (Figura 6, quadro B). Foi observado que amostras do grupo composto por novas cepas da Alemanha apresentaram maior virulência, com uma maior patogenia e disseminação entre os fetos (ZEEUW et al., 2007). 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.

Como relatado, o esclarecimento da virulência do PPV, sob o ponto de vista de seu genoma, não foi completamente obtido. Alguns autores relataram sobre a possibilidade de que uma região repetida de 127 nucleotídeos possa ser a responsável pela virulência do vírus (SIMPSON et al., 2002; SOARES et al., 2003), embora outros autores relatem que esta região não alterou a virulência das amostras estudadas por eles (ZEEUW et al., 2007). Apesar de poucos estudos *in vivo* realizados até o momento, é muito provável que os aminoácidos de superfície desempenhem papel fundamental na virulência do PPV e na sua adaptação ao hospedeiro.

2.12 Controle da parvovirose

Até o presente momento não existe tratamento específico para a parvovirose. Medidas gerais de manejo dirigidas a promover um bom estado sanitário do rebanho, devem ser adotadas (MENGELING, 1999; ROEHE et al., 2007). Dentre estas, a vacinação é a principal medida a ser adotada, cujo objetivo é estimular a imunidade do plantel para evitar a infecção dos embriões ou fetos (ROEHE et al., 2007).

Antes do advento da vacinação, utilizava-se a técnica de *feed-back* para controle da parvovirose. Esta técnica procura estabelecer uma infecção natural das leitoas aproximadamente um mês antes da primeira cobertura. A imunização era realizada através do contato direto com porcas do plantel ou pela exposição às fezes, restos de placenta e fetos mumificados. O *feed-back* deixou de ser utilizado por apresentar um alto risco, pois pode infectar animais susceptíveis com outras doenças de impacto econômico sobre a reprodução (ROEHE et al., 2007).

As primeiras vacinas desenvolvidas, ainda durante a década de 70, foram feitas com o vírus inativado (SUZUKI e FUJISAKI, 1976; JOO e JOHNSON, 1977; MENGELING et al., 1979). Nos anos posteriores, a cepa pouco patogênica NADL-2 passou a ser amplamente utilizada para a elaboração da vacina inativada (ZEEUW et al., 2007), embora, na atualidade, as cepas virais utilizadas pela empresas farmacêuticas são consideradas um segredo comercial e há poucas informações publicadas. Ainda assim, as mudanças ocorridas na tecnologia para obtenção do antígeno, inativantes, adjuvantes e conservantes

nas vacinas inativadas, possivelmente, sejam as principais modificações realizadas nas vacinas disponíveis (WRATHALL et al., 1984; MOLITOR et al., 1985; GESTIN et al., 1998; ROIC et al., 2006).

Outros tipos de vacinas já foram testados experimentalmente, como partículas recombinantes do tipo *virus-like particles* (VLP) (MARTÍNEZ et al., 1992; MARANGA et al., 2002; PAN et al., 2008), expressão em *Lactobacillus casei* carreadores de proteínas do capsídeo do PPV (YIGANG e YIJING, 2008), uso do vírus da doença de Aujeszky como vetor para expressão do PPV (WU et al., 2006) e através de atenuação viral (FUJISAKI et al., 1982; PAUL e MENGELING, 1984; IZUMIDA et al., 1986). Apesar dos resultados obtidos nestes estudos, a vacina inativada continua a ser largamente utilizada devido a sua maior margem de segurança e, provavelmente, por empresas farmacêuticas não investirem em novas vacinas para o PPV.

Os programas de vacinação utilizados nas granjas variam conforme a categoria animal. As leitoas de reposição recebem a primeira dose da vacina aos 170-180 dias de idade, ou 30 dias antes da cobertura. A segunda dose é aos 190-200, ou quinze dias após a primeira dose. As porcas recebem a vacina de dez a quinze dias após cada parto. E por último, os machos são vacinados de cinco a seis semanas antes de serem utilizados na primeira cobertura, com uma segunda dose de dez a quinze dias após. A partir deste momento, deveriam ser vacinados anualmente (ROEHE et al., 2007).

Tradicionalmente, a adoção de um bom programa de vacinação é considerada uma forma eficaz de controle da parvovirose suína (MENGELING, 1999; ROEHE et al., 2007). Entretanto, em estudo verificando a atividade de neutralização gerada por cepas vacinais, foi observado que estas não conseguiram gerar capacidade neutralizante completa frente a novas cepas circulantes na Europa (ZEEUW et al., 2007). As cepas vacinais do referido estudo são utilizadas há mais de 30 anos na Europa, podendo não gerar mais atividade neutralizante completa frente as novas variantes antigênicas.

2.13 Existência de distintos parvovírus no suíno

Em outras espécies animais, como seres humanos e caninos, os parvovírus estão presentes através de dois ou mais gêneros (APPEL et al., 1979; SHADE et al., 1986; CARMICHAEL et al., 1994; HOKYNAR et al., 2002; NGUYEN et al., 2002; JONES et

al., 2005). Em suínos, apenas um gênero de parvovírus é comumente 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 soros de suínos, denominado parvovírus suíno 2 (PPV2) (HIJISATA et al., 2001). Recentemente, em 2007, outro parvovírus foi identificado no soro de suínos, sendo, por sua vez, nominado hokovírus suíno (LAU et al., 2008). Estes dois novos parvovírus apresentam genomas que estão filogeneticamente distantes do parvovírus suíno previamente descrito (Figura 8), por isto foram considerados como representantes de outro gênero dentro da família *Parvoviridae*, que possivelmente não se originou do PPV.

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 ser realizados para compreendermos a natureza destes vírus.

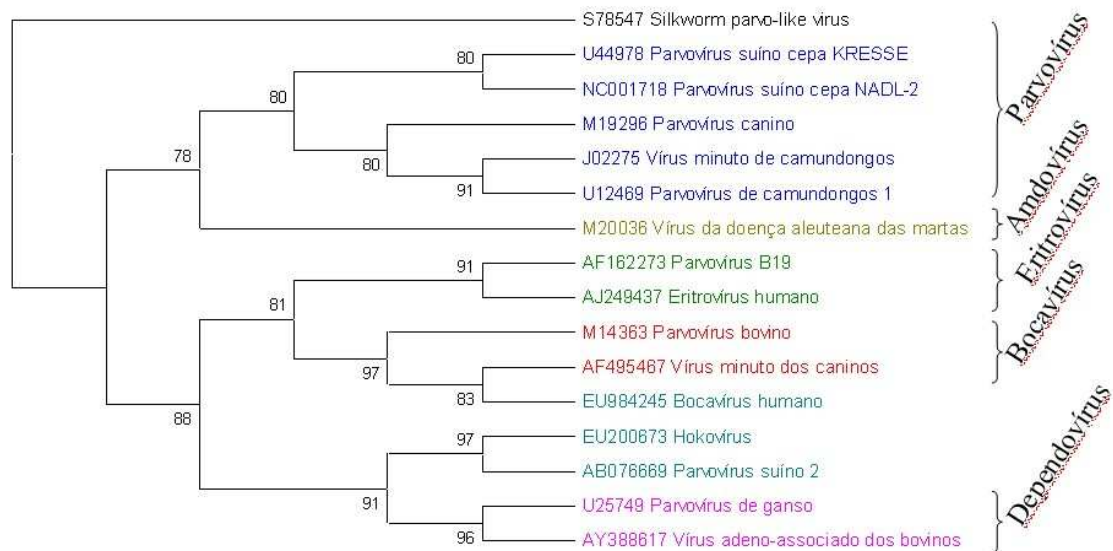


Figura 9. Análise filogenética do genoma completo das seqüências do hokovírus suíno, parvovírus suíno 2 (PPV2) e demais gêneros representantes da subfamília *Parvovirinae* (acesso GenBank e nome da espécie). A seqüência de *silworm parvo like virus* foi utilizada como *outgroup*. A árvore foi construída com o método Maximum Parsimony, com 1000 repetições, através do *software* Mega 4.0 (http://www.megasoftware.net/fixed_bugs.html).

TRABALHO 1

Evaluation of porcine parvovirus in serum from piglets and pregnant sows

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Veterinary Microbiology

Artigo formatado segundo normas do periódico.

1

2 **Evaluation of porcine parvovirus in serum from piglets and pregnant sows**

3

4

5 André Felipe Streck¹6 Danielle Gava²7 Karla Rathje Gonçalves¹8 Carine Kunzler Souza¹9 Fernando Pandolfo Bortolozzo²10 Ivo Wentz²11 Cláudio Wageck Canal¹

12

13 Complete postal addresses:

14 1. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande
15 do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090 Prédio 42.602 CEP 91540-000, Porto Alegre, Brazil).16 2. Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
17 (Av. Bento Gonçalves, 9090 Prédio 42.602 CEP 91540-000, Porto Alegre, Brazil).

18

19 Corresponding author (C.W. Canal): Telephone: 55 51 3308 6926. E-mail:
20 claudio.canal@ufrgs.br

21

22 **Abstract**23 Porcine parvovirus (PPV) is a widespread DNA virus that causes reproductive failure in
24 swine. The aim of the present study was to investigate the presence of PPV in serum of

25 nursery piglets (healthy n=191 and attrition n=132) and regularly vaccinated sows (with
26 different parity orders [PO] n=129), collected from different herds. Altogether, 452 animals
27 were sampled in 27 herds from 16 municipalities that were owned by five companies. All
28 samples were analyzed by nested-PCR and the samples of sows were also evaluated by
29 Hemagglutination Inhibition (HI). PPV DNA was detected through nested-PCR in healthy
30 piglets (15.7%), attrition piglets (18.2%) and sows (17.8%). The fourth PO presented the
31 higher number of positive samples. Fifteen municipalities had at least one positive sample
32 and four companies had positive animals. The serology showed that 84.7% of the sows had
33 detectable antibodies and the sows from the fourth PO had the higher mean titer to PPV. In
34 the present study, an unexpected high level of PPV detection was found in serum from
35 nursery piglets and vaccinated sows. This finding could indicate that PPV is circulating in
36 different swine production categories irrespective of the antibody titers.

37

38 Keywords: Porcine parvovirus, PPV, PCR, swine, diagnosis

39

40 **1. Introduction**

41 Porcine parvovirus (PPV) is considered an important cause of reproductive failure
42 in swine. Clinical signs characterized by fetal death, mummification, stillbirths and delayed
43 return to estrus are commonly associated with PPV infection in a herd (Mengeling et al.,
44 2000). In the last few years, there was evidenced the emergence and spread of new viruses
45 causing reproductive disorders; however, the PPV remains an important pathogenic
46 infectious viral agent in porcine fetal death (Wolf et al., 2008).

47 For having diffuse epitheliochorial placentae, the main protections for piglets are
48 the immunoglobulins acquired through colostrum (Bourne et al., 1974). The protection

49 offered by the maternal immunity remains from three until seven months of life (Paul et al.,
50 1982), which may coincide with the first vaccination made around five months of life
51 (Mengeling, 1999; Roehe et al., 2007). Vaccination is considered the most effective and
52 safe way to prevent PPV induced fetal losses in sows (Oravainen et al., 2005). Attenuated
53 and inactivated vaccines have been developed. However, to be more secure, inactivated
54 vaccines are the more frequently used around the world, including Brazil (Thompson and
55 Prozesky, 1994; Roehe et al., 2007).

56 The PPV spreading occurs by the oronasal contact with excretions and
57 contaminated fluids. Semen, fetuses and infected fetal fluids are also important virus
58 sources (Mengeling, 1999; Guérin and Pozzi, 2005). PPV diagnosis have been performed in
59 fetal tissue by virus isolation, hemagglutination, immunofluorescence, ELISA and PCR
60 (Mengeling, 1972; Joo et al., 1976; Rivera et al., 1986; Hohdatsu et al., 1988; Soares et al.,
61 1999). Different samples reported were the boar semen through the use of nucleic acid
62 hybridization for the presence of viral DNA (Gradil et al., 1990) and piglets presenting non-
63 suppurative myocarditis by nested-PCR (Bolt et al., 1997). Meanwhile, the detection of
64 PPV in serum has not been reported yet, and there are no tools to verify circulation of the
65 virus within the herd.

66 The aim of the present investigation was to assess the presence of PPV DNA in the
67 serum of two swine categories (piglets and sows). In addition, piglets were analyzed
68 according to their health status (healthy or attrition) and the sows were analyzed in different
69 parity orders (PO), associating with Hi titers to PPV.

70

71 **2. Materials and Methods**

72 **2.1 Samples**

73 Four hundred fifty five (452) serum samples were collected from piglets and
74 pregnant sows, from July 2007 to June 2008. These samples were from 27 herds, belonging
75 to five companies (a-e) localized in 16 municipalities (A-P), that are in the principal swine
76 production region (Southern Region) from Brazil (Figure 1). Among the 452 samples, 323
77 belonged to piglets with 40 to 80 days of life. These piglets were sampled according to their
78 health status after clinical examination (191 healthy and 132 attrition animals). Other 129
79 samples belonged to sows with 20 days of pregnancy that were in different PO. According
80 to the company's information, these sows were regularly vaccinated for PPV 40 days
81 before they were collected. The companies, localization of the herd, health condition of
82 piglets or PO of the sows are displayed in Table 1 and 2.

83

84 2.2 DNA extraction and nested-PCR amplification

85 The DNA extraction from serum (100 μ L) was carried out using a protocol based on
86 silica (Boom et al., 1990). After extraction, the DNA was diluted in 50 μ L of 10 mM Tris-
87 HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE), and stored at -20°C. The amplification of the non-
88 structural gene (NS-1) by nested-PCR was carried out as already described (Soares et al.,
89 1999) with the following modifications: initial heating at 95°C for 2 minutes, 35 cycles of
90 denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 45 seconds, extension at 72°C
91 for 45 seconds, and final extension at 72°C for 5 minutes for each nested-PCR round.
92 Amplification products (137 bp) were electrophoresed in 2% agarose gels with 40 mM
93 Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0 (TAE) running buffer and stained with 0.1 μ g/mL of
94 Blue Green I (LGC, Brazil).

95

96 2.3 DNA sequencing

97 In order to verify the specificity of the amplification products, both strands of the
98 nested-PCR amplification products (137 bp) from two serum samples were sequenced
99 using an automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm
100 capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems, USA). DNA templates (30 ng) were
101 labeled using 3.2 pmol of the internal primers (Soares et al., 1999) and 2 μ L of BigDye
102 Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, USA) in a final volume
103 of 10 μ L. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied
104 Biosystems, USA) thermocycler. The sequences obtained were aligned with the PPV strain
105 Kresse (GenBank accession number U44978.1) and NADL2 (L23427.1) sequences using
106 the software Bioedit Sequence Alignment Editor
107 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

108

109 2.4 Serological analysis

110 Antibody titers against PPV in pregnant sow serum were determined by
111 Hemagglutination Inhibition (HI) test (Joo et al. 1976), using guinea pig erythrocytes.
112 Animals were considered negative when HI titers were ≤ 32 , suspected when = 64 and
113 positive when ≥ 128 . Antibody titers of five sows could not be determined.

114

115 2.5 Statistical analysis

116 The statistical analysis of the nested-PCR results was performed by the Chi-square
117 test and Fischer's Exact test. The One-way ANOVA test was used to compare the antibody
118 titers among the PO. Analysis was performed using GraphPad Prism, version 5.00 for
119 windows (GraphPad) and SAS System GLM Procedure. Values of $P < 0.05$ were considered
120 statistically significant.

121

122 3. Results**123 3.1 PPV detection in piglets serum**

124 The 137 bp amplification product was detected in 54 (16.7%) of the 323 piglets
125 samples. From the 191 serum of healthy piglets evaluated, 30 (15.7%) were positive for
126 PPV. From the 132 attrition piglets, 24 (18.2%) samples were positive. As showed in Table
127 1, the positive samples were homogenously distributed in the distinct municipalities, the
128 exceptions were C (0%), K (60%) and L (0%). All companies had positive samples, which
129 were 14 (13.3%), 23 (17.8%), 7 (16.3%) and 10 (21.7%) for company a, b, c and d,
130 respectively. No amplification products were obtained from the negative controls (TE
131 buffer) used in each nested-PCR round. The amplification product sequences analyzed from
132 NS-1 gene of PPV of two samples displayed complete identity (100%) with the NS-1
133 sequence of the two known PPV strains.

134

135 3.2 PPV detection in pregnant sows serum

136 Positive nested-PCR samples were identified in 23 (17.8%) among the 129 samples
137 (Table 2). The positive results are displaying in Table 2. Sows from PO1 had more positive
138 samples than from PO2. The number of positive sows increase from PO2 until PO4, but
139 there was a decrease of positive samples in the subsequent PO. All PO had positive sows
140 from at least two municipalities (Table 2). PO4 showed uniform distribution of positive
141 samples from different herds (numbers 16, 17, 18, 20, 23 e 26), with exception of herd
142 number 19 (50%), 25 (0%) and 26 (44.4%), highlighting the samples collected from herd
143 25 which belonged to “e” company.

144

145 3.3 Serological status of the sows

146 HI analysis of the serum from the sows displayed that 84.7% were positive for
147 antibodies against PPV, 7.3% were suspect and 8.1% negative. According to Figure 2, the
148 HI mean titers ($\log_2 X$ in parenthesis) for different PO were 2142.7 (8.7), 2403.1 (9.8),
149 2250.0 (9.9), 2952.2 (10.6), 2600.3 (9.8) and 2154.7 (9.7) to parity orders 1, 2, 3, 4, 5 and \geq
150 6, respectively. The PO4 had the higher mean titer (2952.2) and the higher percentage of
151 high titers (70%) (> 512). The mean titer of the sows was 2607.5 (9.7). All sampled herds
152 had at least one animal with high titer and 54.8% of all animals presented high titers. The
153 result of nested-PCR and HI titers for each sample are displayed on supplementary data.
154 The relationship between HI titers and nested-PCR results are displayed on Figure 3. The
155 majority of the positive nested-PCR results were from samples with high titers (>512).
156 There was no statistical association between the HI titers and the nested-PCR results.

157

158 4. Discussion

159 The percentage of nested-PCR positive samples for PPV in healthy and attrition
160 piglets was similar. The causes for attrition can be multiple but nowadays in the South
161 Region of Brazil, there is a consensus that porcine circovirus type 2 (PCV2) is the main
162 cause. Since it was shown an association between PPV and PCV2, as well as with
163 Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (Allan et al., 1999; Krakowka et al., 2000),
164 we speculated that piglets with attrition could have a higher number of PPV positives, what
165 was not the case. Also, on these sampled herds, the mummification rate was below 1.5%,
166 what is considered normal (Dial et al., 1992) and other PPV related problems were not
167 occurring significantly. Although the clinical signs of PPV are displayed only in the female

168 reproductive phase, the presence of the virus in piglets could be responsible to keep PPV
169 among the herd.

170 In the present study, 17.8% of the gilts were also positive by nested-PCR (Table 2).
171 It is expected that the gilts that are not immune for the virus are those which present a
172 higher infection risk followed by reproductive problems (Mengeling, 1999; Roehe et al.,
173 2007). It was observed that there was almost the same number of positive sows to PPV in
174 all PO (no statistical difference), what was not expected, since, high PO sows have a greater
175 number of vaccine doses and have a greater chance to be naturally infected during their
176 larger life span. The vaccination or challenge increases the antibody titers, it was expected
177 a decrease in the number of nested-PCR positive sows of higher PO. Meanwhile, this study
178 does not evaluate the importance of the cellular response in the parvoviruses infection and
179 by this way another form of immunity not related with humoral response.

180 The prevalence of HI positive sows was 84.7%, with presence of high titers in all
181 sampled herds. This prevalence is higher than previously described in other countries (Foni
182 and Gualandi, 1989; Nash, 1990; Oravainen et al., 2005). According to Oravainen et al.
183 (2006), on-field vaccination results in a consistent increase of humoral immunity not
184 exceeding the antibody titer 512 in the majority of animals. The presence of 54.8% of the
185 sows with titer equal or higher than 1024 is an indicative that the humoral immune response
186 of the sows was boosted by infection with a field virus.

187 According to the classical literature (Mengeling, 1999; Roehe et al., 2007), it is
188 expected that a high antibody titer neutralizes field virus and the virus is able to infect only
189 sows with lower titers. However, in the present study, the majority of the sows with
190 positive nested-PCR result also displayed high antibody titers to PPV (Figure 3). Also,
191 piglets and sows presented similar levels of PPV infection (15-18%) although it was

192 expected that the categories with larger life span were more able to have contact with field
193 virus and, consequently, more resistant to further challenges. The possible explanations for
194 this fact could be the presence of antigenic distinct viruses in these herds or that PPV
195 infection is independent of the antibody status of the host. Until now, PPV is considered to
196 have only one serotype, with humoral immunity known as playing a prominent role in the
197 protection against parvovirus infection (Zeeuw et al., 2007). Some antigenic variations on
198 the viral protein were described that could influence on this protection (Soares et al., 2003;
199 Zimmermann et al., 2006). Recently, a low antibody neutralization activity was found in
200 one of these variations and related with PPV virulence (Zeeuw et al., 2007). However, the
201 knowledge about the cellular immunity in the response to PPV infection is poorly described
202 (Ladekjær-Mikkelsen and Nielsen, 2002; Rueda et al., 2004.) and its real importance is
203 unknown. An exception was found in the PO number ten, with did not displayed any
204 positive sample. A possible explanation is the few number of serum sampled in each PO,
205 witch may contribute to these discrepancy.

206 This is the first study displaying that PPV could be directly detected from piglet and
207 sow serum in field samples. Traditionally, the serum is used to detect and quantify humoral
208 immunity through antibodies against PPV. After the appearance and vast implementation of
209 the vaccine in the eighties (Wrathall et al., 1984; Edwards et al., 1986), the analysis of the
210 herd infection only from serum became non-conclusive, being necessary information about
211 the reproductive performance and detection from non-viable fetuses to confirm the
212 involvement of the agent in the infection (Mengeling, 1972; Oravainen et al., 2005).
213 However, due to the advanced state of autolysis and, occasionally, fetal mummification,
214 viral DNA detection can be less efficient from this source. Another problem of this
215 diagnosis is that the virus can only be detected at the moment when the reproductive

216 problem is observed (abortion, fetal mummification or natimortality). The use of this
217 nested-PCR technique, directed towards detecting the PPV in serum, was able to identify
218 the presence of PPV in other moments of the swine life and will help to better understand
219 the virus epidemiology.

220

221 **5. Conclusion**

222 The DNA detection of PPV from serum revealed that this sample is useful for
223 detection of viremia. The use of these protocol allowed us to detect between 15 and 18% of
224 PPV viremic piglets (healthy and attrition), and sows with different PO. Surprisingly, there
225 was no correlation between PPV viraemia and antibody titers by HI. The findings of this
226 study may contribute to a new understanding of the PPV epidemiology.

227

228 **Acknowledgments**

229 Financial support was provided through the Conselho Nacional de Desenvolvimento
230 Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), FAPERGS and Propesq/UFRGS. We are also
231 thankful to the veterinarians who collected de serum samples, Dr. Mari Lourdes Bernardi
232 for the statistical analysis and Simbios Biotecnologia Ltda that kindly supplied de DNA
233 extraction kits.

234

235 **References**

236 Allan, G.M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S., Meehan,
237 B.M., Adair, B.M., 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-
238 infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 121, 1–
239 11.

- 240 Bolt, D.M., Häni, H., Müller, E., Waldvogel, A.S., 1997. Non-suppurative myocarditis in
241 piglets associated with porcine parvovirus infection. *J. Comp. Pathol.* 117, 107-118.
- 242 Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E.,
243 Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J.*
244 *Clin. Microbiol.* 28, 495-503.
- 245 Bourne, F.J., Curtis, J., Johnson, R.H., Collings, D.F., 1974. Antibody formation in porcine
246 fetuses. *Res. Vet. Sci.* 16, 223–227.
- 247 Dial, G.D., Marsh, W.E., Polson, D.D., Vaillancourt, J.P., 1999. Reproductive failure:
248 differential diagnosis. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D’Allaire, S.,
249 Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, pp.
250 88–137.
- 251 Edwards, K.R., Emmerson, M.A., Luff, P.R., Wells, D.E., Muskettb, J.C., Wrathall, A.E.,
252 Richardson, C., Parker, B.N., Thornton, D.H., 1986. Efficacy of porcine parvovirus
253 vaccines. *Vet. Rec.* 119, 203–206.
- 254 Foni, E.; Gualandi, G.L., 1989. A serological survey of swine parvovirus infection in Italy.
255 *Microbiologica* 12, 241–245.
- 256 Gradil, C., Molitor, T., Harding, M., Crabo, B., 1990. Excretion of porcine parvovirus
257 through the genital tract of boars. *Am. J. Vet. Res.* 51, 359-362.
- 258 Guérin, B., Pozzi, N., 2005. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as
259 epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination.
260 *Theriogenology.* 63, 556–572.
- 261 Hohdatsu, T., Baba, K., Ide, S., Tsuchimoto, M., Nagano, H., Yamagami, T., Yamagishi,
262 H., Fujisaki, Y., Matumoto, M., 1988. Detection of antibodies against porcine parvovirus in
263 swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 17, 11-19.
- 264 Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., Johnson, R.H., 1976. Rapid diagnostic techniques for
265 detection of porcine parvovirus infection in mummified foetuses. *Aust.Vet. J.* 52, 51-52.

- 266 Kollok, R., Tseng, B.Y., Goulian, M., 1982. DNA polymerase requirements for parvovirus
267 H-1 DNA replication in vitro. *J. Virol.* 41, 982-989.
- 268 Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. Viral
269 wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic
270 wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and
271 porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 37, 254-263.
- 272 Ladekjær-Mikkelsen, A.S., Nielsen, J., 2002. A longitudinal study of cell-mediated
273 immunity in pigs infected with porcine parvovirus. *Viral Immunol.* 15, 373-384.
- 274 Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 2000. The effect of porcine parvovirus and
275 porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance.
276 *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 199-210.
- 277 Mengeling, W.L., 1999. Porcine Parvovirus. In: Straw, B.E., D'allaire, S., Mengeling,
278 W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames,
279 IA, pp.119-124.
- 280 Mengeling, W.L., 1972. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated
281 in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 33, 2239-2248.
- 282 Nash, W.A., 1990. Porcine parvovirus survey. *Vet. Rec.* 126, 175-176.
- 283 Oravainen, J., Hakala, M., Rautiainen, E., Veijalainen, P., Heinonen, M., Tast, A.,
284 Virolainen, J.V., Peltoniemi, O.A.T., 2006. Parvovirus antibodies in vaccinated gilts in field
285 conditions – results with HI and ELISA tests. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 91–93.
- 286 Oravainen, J., Heinonen, M., Tast, A., Virolainen, J.V., Peltoniemi, O.A.T., 2005. High
287 porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. *Reprod.*
288 *Dom. Anim.* 40, 57-61.
- 289 Paul, P.S., Mengeling, L.W., Pirtle, E.C., 1982. Duration and biological half-life of
290 passively acquired colostrum antibodies to porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* 43, 1376-
291 1379.

- 292 Rivera, E., Sjöland, L., Karlsson, K.A., 1986. A solid phase fluorescent immunoassay for
293 the rapid detection of virus antigen or antibodies in fetuses infected with porcine
294 parvovirus. *Arch. Virol.* 88, 19-26,
- 295 Roehe, P.M., Sobestiansky, J., Barcellos, D.E.S.N., 2007. Parvovirose. In: Sobestiansky, J.
296 and Barcellos, D. (Eds.), *Doença dos Suínos*, Cãnone editorial, Goiânia, pp.286-293.
- 297 Rueda, P., Morón, G., Sarraseca, J., Leclerc, C., Casal, J.I., 2004. Influence of flanking
298 sequences on presentation efficiency of a CD8+ cytotoxic T-cell epitope delivered by
299 parvovirus-like particles. *J. Gen. Virol.* 85, 563-572.
- 300 Soares, R.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Martins, V.G., Bacci, M., De
301 Campos, F.M., Richtzenhain, L.J., 2003. Genetic variability of porcine parvovirus isolates
302 revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J. Gen. Virol.*
303 84, 1505-1515.
- 304 Soares, R.M., Durigon, E.L., Bersano, J.G., Richtzenhain, L.J., 1999. Detection of porcine
305 parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly
306 conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Methods.* 78, 191-198.
- 307 Thomson, G.R., Prozesky, L., 1994. Porcine parvovirus infection. In: Coetzer, J.A.W.;
308 Thomson, G.R.; Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious diseases of livestock*, Oxford University
309 Press, South Africa, pp.888-894.
- 310 Wolf, V.H.G., Menossi, M., Morão, G.B., Gatti, M.S.V., 2008. Molecular basis for porcine
311 parvovirus detection in dead fetuses. *Genet. Mol. Res.* 7, 509-517.
- 312 Wrathall, A.E., Wells, D.E., Cartwright, S.F., Frerichs, G.N., 1984. An inactivated, oil-
313 emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure.
314 *Res. Vet. Sci.* 36, 136-143.
- 315 Zeeuw, E.J.L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.J., Truyen, U., 2007. Study of the
316 virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and
317 vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J. Gen. Virol.* 88, 420-427.

318 Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H. J., Heinritzi, K., Truyen, U., 2006. VP1
319 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J. Gen. Virol.*
320 87, 295-301.

321

Table 1. Number of serum samples from piglets analyzed, number and percentage of nested-PCR positive samples according to the municipality (MUN), company and health condition.

| MUN (n=12) | Herd (n=14) | Companies | Health condition | Nested-PCR positive | Percentage (%) |
|------------------|----------------|-----------|---------------------|------------------------|----------------|
| A | 1 (n=105) | a | healthy | 14 | 13.3 |
| B | 2 (n=43) | b | healthy | 11 | 25.6 |
| B | 3 (n=43) | b | healthy | 5 | 11.6 |
| B | 4 (n=43) | b | attrition | 7 | 16.3 |
| C | 5 (n=8) | c | attrition | 0 | 0.0 |
| D | 6 (n=7) | c | attrition | 2 | 28.6 |
| E | 7 (n=8) | c | attrition | 1 | 12.5 |
| F | 8 (n=6) | c | attrition | 1 | 16.7 |
| G | 9 (n=6) | c | attrition | 1 | 16.7 |
| H | 10 (n=8) | c | attrition | 2 | 25.0 |
| I | 11 (n=16) | d | attrition | 3 | 18.7 |
| J | 12 (n=10) | d | attrition | 1 | 10.0 |
| K | 13 (n=10) | d | attrition | 6 | 60.0 |
| L | 14 (n=10) | d | attrition | 0 | 0.0 |
| Total | 323 | - | - | 54 | 16.7 |
| Healthy | 191 | - | - | 30 | 15.7a |
| Attrition | 132 | - | - | 24 | 18.2a |

a (P>0.05)

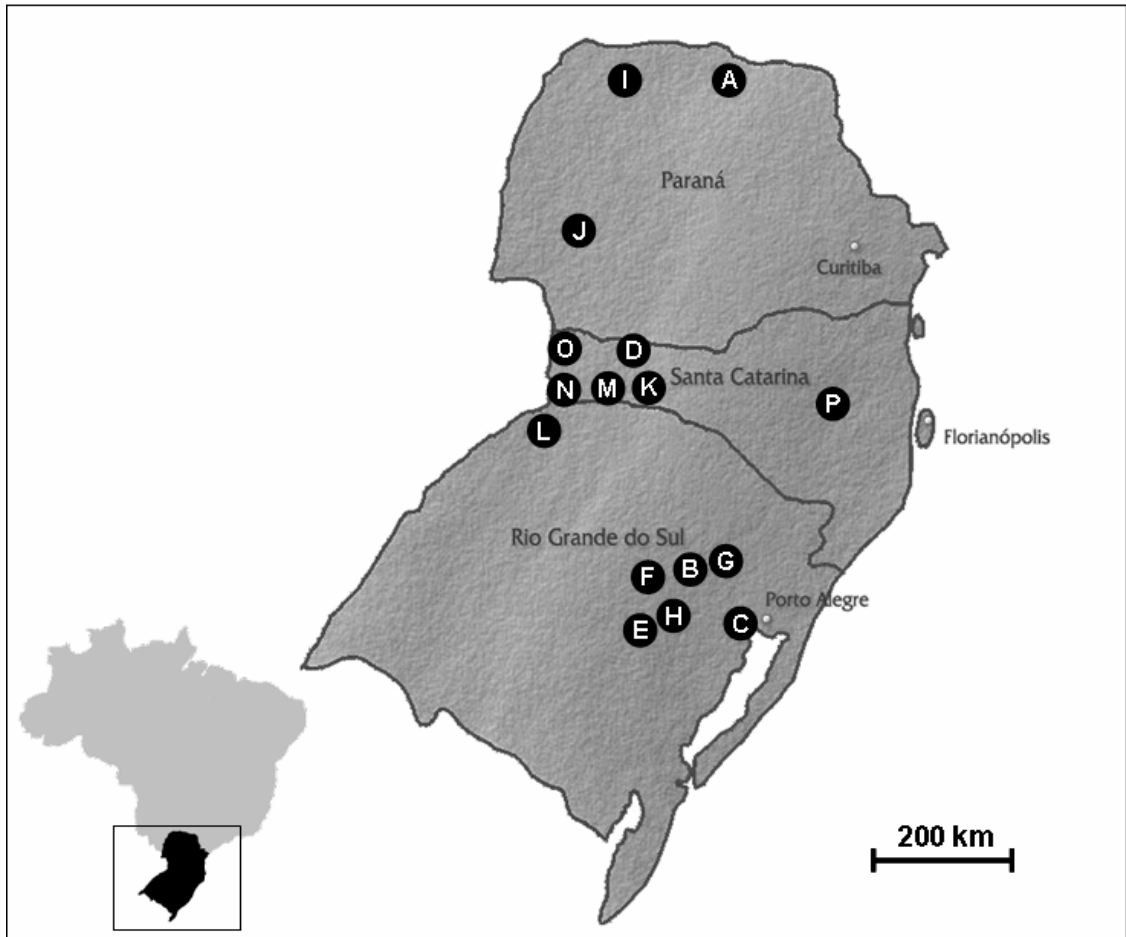
322

Table 2. Number of serum samples from pregnant sows analyzed according the localization (municipality), herd, company and parity order (PO). The number of positive samples for each municipality (MUN) is within parenthesis in the middle of the table.

| MUN (n=4) | Herd (n=13) | Company | Parity Order | | | | | | Total n (%) |
|------------------------|----------------|---------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| | | | PO1 (n=24) | PO2 (n=23) | PO3 (n=16) | PO4 (n=22) | PO5 (n=24) | PO \geq 6 (n=20) | |
| M | 15 (n=8) | A | 1(1) | 1 | 2 | 1 | 1 | 2(1) | 2 (25.0) |
| N | 16 (n=7) | A | 2 | 1 | 1(1) | 1(1) | 1 | 1 | 2 (28.6) |
| N | 17 (n=10) | A | 2 | 0 | 2 | 3(1) | 2 | 1 | 1 (10.0) |
| O | 18 (n=10) | A | 3 | 0 | 3 | 3(1) | 1 | 1 | 1 (10.0) |
| O | 19 (n=10) | A | 3(2) | 3(1) | 1(1) | 2 | 1(1) | 0 | 5 (50.0) |
| O | 20 (n=10) | A | 1 | 1 | 0 | 1(1) | 3 | 4 | 1 (10.0) |
| O | 21 (n=10) | A | 1 | 1 | 1 | 1 | 4(2) | 2 | 2 (20.0) |
| O | 22 (n=10) | A | 2 | 2 | 1 | 1 | 2(1) | 2 | 1 (10.0) |
| O | 23 (n=8) | A | 2(1) | 1 | 1 | 1(1) | 2 | 1 | 2 (25.0) |
| O | 24 (n=7) | A | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1(1) | 1 (14.3) |
| P | 25 (n=20) | E | 3 | 8 | 2 | 4 | 1 | 2 | 0 (0.0) |
| O | 26 (n=9) | A | 1 | 3(1) | 1 | 1(1) | 1(1) | 2(1) | 4 (44.4) |
| O | 27 (n=10) | A | 2(1) | 1 | 0 | 3 | 3 | 1 | 1 (10.0) |
| Total n (%) | 129 | - | 5 (20.8)a | 2 (8.7)a | 2 (12.5)a | 6 (27.3)a | 5 (20.8)a | 3 (15.0)a | 23 (17.8) |

a (P>0.05)

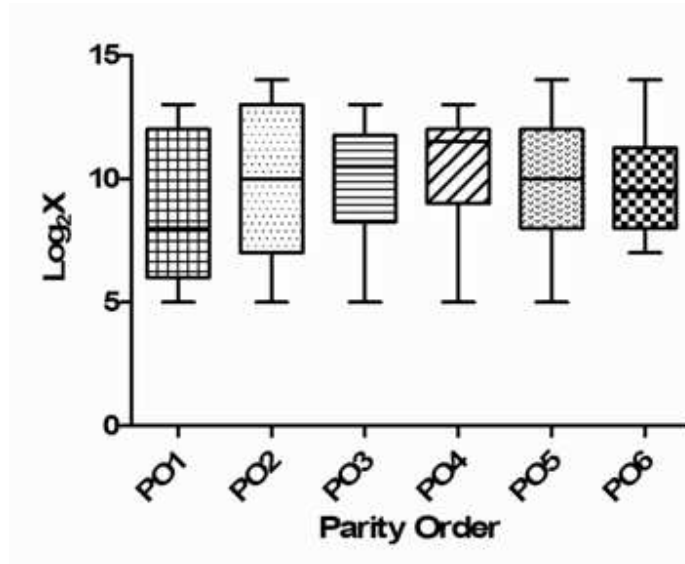
323

324 **Figure 1.**

325

326 Map of the Brazilian South Region displaying the origin of the samples.

327 **Figure 2.**

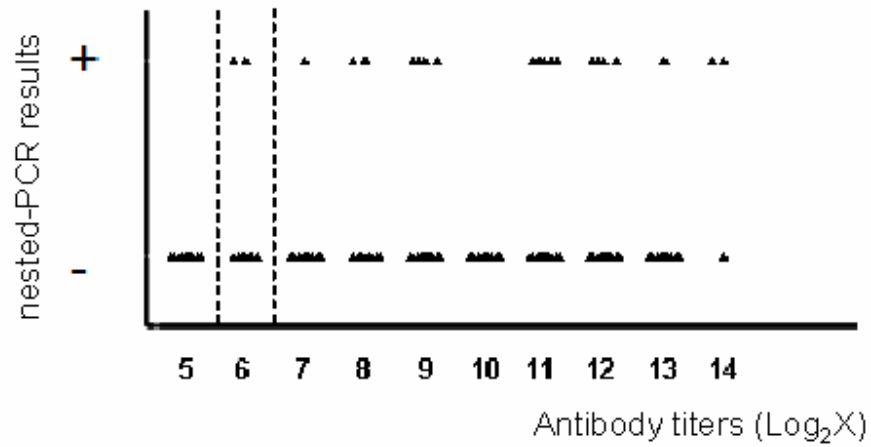


328

329 Distribution of antibody titers (Log₂) in serum samples collected from distinct parity orders.

330 The variances between the parity groups do not differ significantly (P < 0.05).

331

332 **Figure 3.**

333

334 Distribution of nested-PCR positive (+) and negative (-) results among the antibody titers

335 (Log₂) of serum samples. Samples located before the dashed lines were considered negative

336 and in the middle of dashed lines were suspected.

337

338

TRABALHO 2

Análise filogenética de seqüências do gene VP1/VP2 de parvovirus suíno

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Journal of General Virology
Artigo formatado segundo normas do periódico, com exceção ao idioma utilizado.

1
2 Análise filogenética de seqüências do gene VP1/VP2 de parvovírus suíno

3

4 André Felipe Streck¹

5 Carine Kunzler Souza¹

6 Karla Rathje Gonçalves¹

7 Danielle Gava²

8 Janice Reis Ciacci Zanella³

9 Sandro Luis Bonatto⁴

10 Cláudio Wageck Canal¹

11

12 Endereço completo:

13 1. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande
14 do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090, Prédio 42.602, CEP 91540-000, Porto Alegre, Brasil).

15 2. Laboratório de Virologia, Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade
16 Federal do Rio Grande do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090, Prédio 42.602, CEP 91540-
17 000, Porto Alegre, Brasil).

18 3. Embrapa Suínos e Aves (BR 153, Km 110, CEP 89700-000, Concórdia, Brasil).

19 4. Centro de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica (Av.
20 Ipiranga, 6681, Prédio 12, bloco C, sala 172, 90619-900, Porto Alegre, Brasil).

21

22 Autor para correspondência (C.W. Canal): Telefone: 55 51 3308 6926. Fax : 55 51 3308
23 7325. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

24

25 **Resumo**

26 No presente trabalho, todas as seqüências de parvovírus suíno (PPV), porção VP1/VP2 do
27 genoma, dispostas no GenBank, acrescidas de cinco novas sequencias de cepas brasileiras,
28 foram comparadas e analisadas filogeneticamente. Foi evidenciada que duas amostras do
29 Brasil apresentam o aminoácido Thr no sítio 586, relacionado à virulência. A análise
30 filogenética revelou a existência de apenas um grupamento consistente, composto por oito
31 amostras chinesas. A análise por relógio molecular demonstrou que as mais recentes

32 variações nos PPV ocorreram nos últimos três séculos e, possivelmente, tiveram pouca
33 influência das práticas de prevenção e controle utilizadas na suinocultura recente.

34 Palavras-chave: parvovírus suíno, PPV, filogenia, proteína viral, VP.

35 **Texto**

36 O parvovírus suíno (PPV) é considerado uma importante causa de problemas
37 reprodutivos em suínos. Os sinais clínicos estão caracterizados por fetos mumificados,
38 abortamento, natimortos e retorno ao estro (Mengeling *et al.*, 2000). Nos últimos anos, foi
39 evidenciado o surgimento e dispersão de novos patógenos causadores de falhas
40 reprodutivas na suinocultura e, possivelmente por sua capacidade de ação conjunta com
41 outros agentes, o PPV permaneceu como um importante agente infeccioso.

42 O capsídeo dos parvovírus é uma partícula esférica formada a partir do arranjo das
43 proteínas VP (proteínas virais), que estão repetidas em mais de 60 cópias formando uma
44 estrutura de simetria icosaédrica (Chapmann & Rossmann, 1993). As proteínas VP1 e VP2
45 são traduzidas na mesma fase de leitura, porém com distintos códons de início, e a VP3 é
46 um produto de modificações pós-tradução da VP2 (Simpson *et al.*, 2002).

47 Acredita-se que substituições em aminoácidos específicos destas proteínas sejam
48 responsáveis por diferenças de patogenicidade entre cepas de PPV. Entre estas, destacam-se seis
49 modificações (T-195¹⁸→S, I-378→T, D-528→G, H-533→Q, S-586→P e R-715→K)
50 (Bergeron *et al.*, 1996). Outros autores, estudando o tropismo de cepas de CPV, FPV e
51 MVM, verificaram que estas possuem regiões imunodominantes situadas nas proteínas do
52 capsídeo (Parrish & Carmichael, 1986; Gardiner *et al.*, 1988; Parrish, 1991; Tsao *et al.*,
53 1991; Etingov *et al.*, 2008). Ao extrapolar a estrutura tridimensional das proteínas do
54 capsídeo do PPV, com os vírus acima referidos, foi observado que a modificação D-
55 528→G está próxima à base do vértice triplo, enquanto a S-586→P está no topo do mesmo
56 vértice. As modificações I-378→T, H-533→Q e R-715→K estão no vértice duplo,
57 podendo ser potencialmente importantes por possuírem resíduos responsáveis pela resposta
58 do hospedeiro e hemaglutinação (Bergeron *et al.*, 1996).

59 Trabalhos avaliando a variabilidade genética de cepas de PPV comprovaram que
60 existem variações entre os genomas de amostras de campo de PPV, inclusive nestas regiões
61 importantes para o caráter antigênico da amostra (Soares *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*,

¹⁸ Numeração dos aminoácidos da proteína VP1 de acordo Bergeron *et al.* (1996).

62 2006). Recentemente, foi realizado um estudo com cepas de PPV enquadradas em distintos
63 grupos filogenéticos e foi observado que amostras do grupo composto por novas cepas
64 apresentaram maior virulência, com uma maior disseminação e patogenia entre os fetos.
65 Neste trabalho, evidenciou-se que determinadas substituições dos aminoácidos de
66 superfície diminuiriam significativamente a afinidade dos anticorpos gerados por vacinas
67 (Zeeuw *et al.*, 2007).

68 Apesar de existirem vários estudos sobre o PPV, ainda não foi realizado um estudo
69 abrangendo todas as seqüências disponíveis. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar
70 filogeneticamente todo o material disposto no GenBank/EMBL/DDBJ, além de analisar
71 geneticamente amostras brasileiras recentemente caracterizadas.

72 Em dezembro de 2008, todas as seqüências contendo a região correspondente a
73 VP1/VP2 dispostas no GenBank/EMBL/DDBJ foram obtidas do site do NCBI
74 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com a palavra-chave “porcine parvovirus”. No total, 57
75 seqüências de PPV foram analisadas, distribuídas da seguinte forma: 29 provenientes do
76 Brasil (AY145472; AY145473; AY145474; AY145475; AY145476; AY145477;
77 AY145478; AY145479; AY145480; AY145481; AY145482; AY145484; AY145485;
78 AY145486; AY145487; AY145488; AY145489; AY145490; AY145491; AY145492;
79 AY145493; AY145494; AY145495; AY145496; AY145497; AY145498; AY145499;
80 AY145500 e AY145500), 16 da China (AY390557; AY459350; AY502115; AY786299;
81 AY583318; AY686602; AY781130; AY788086; AY788087; AY788088; DQ464345;
82 DQ675456; EF212027; EU790641; EU790642 e AY390557), seis da Alemanha
83 (AY684864; AY684865; AY684867; AY684870; AY684871 e AY684869), uma da
84 Inglaterra (AY684866), três vacinas (I18745; A26477; AY684872) e as cepas controle
85 NADL-2 (L23427) e Kresse (U44978). As seqüências AY789532, EF026981, EF026982,
86 AY597052, EU707336, DQ158864 e EF363312, que são da mesma região, não foram
87 utilizadas por não apresentarem tamanho compatível na região analisada.

88 Além dos genes obtidos através do NCBI, as regiões VP1/VP2 de cinco amostras
89 brasileiras foram seqüenciadas e adicionadas à análise. Destas, duas amostras são oriundas
90 de casos envolvendo abortamentos (PA: FJ643428 e PB: FJ643429), duas são de leitões
91 refugos com cerca de 55 dias de idade (S30: FJ643430 e S31: FJ643431) e uma amostra
92 gentilmente cedida pela Embrapa Suínos e Aves (FJ643427). A extração do DNA foi

93 realizada utilizando um protocolo à base de sílica (Boom *et al.*, 1990). Após a extração, o
94 DNA foi diluído em 50 µL de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE), e armazenado
95 a -20 °C. A reação da PCR para a amplificação da região VP1/VP2 foi realizada conforme
96 descrito anteriormente (Soares *et al.*, 2003), com modificações. A PCR foi realizada
97 utilizando o kit Go Taq DNA Polimerase (Promega, Brasil). As condições de amplificação
98 foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30
99 segundos, hibridização a 55 °C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e
100 extensão final a 72 °C por 5 minutos. O produto de amplificação foi submetido à
101 eletroforese em gel de agarose 2 %, com tampão de corrida 40 mM Tris-acetato, 1 mM
102 EDTA pH 8.0 (TAE) e corado com 0.1 µg/mL de Blue Green I (LGC, Brasil). Os produtos
103 de amplificação foram purificados através de kit GFX DNA and Gel Band Purification
104 (Amersham Bioscience, EUA). O produto de amplificação (30 ng) foi submetido a reação
105 juntamente de 3.2 pmol dos iniciadores internos (Soares *et al.*, 2003) e 2 µL de BigDye
106 Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, EUA) em um volume
107 final de 10 µL. A reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700
108 (Applied Biosystems, EUA). Ambas as fitas do produto da nested-PCR foram seqüenciadas
109 utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com
110 capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems, EUA).

111 Ao todo, foram alinhadas 65 seqüências (cinco deste experimento, 57 outros PPV e
112 três *outgroups*). As amostras utilizadas como *outgroup* foram: um parvovírus canino
113 (NC_001539), um minute virus of mice (J02275) e um vírus entérico das martas
114 (AF469009). O alinhamento múltiplo das seqüências foi realizado utilizando MEGA versão
115 4 (Takamura *et al.*, 2007), método ClustalW. O alinhamento foi realizado com uma
116 seqüência resultante de 658 pares de base (correspondente a 218 aminoácidos), com início
117 no nucleotídeo 3781 e término no nucleotídeo 4439 (de acordo com Bergeron *et al.*, 1996).

118 A relação filogenética entre as seqüências de PPV foi realizada utilizando os
119 métodos de Bayesian Inference (BI), Maximum Likelihood (ML) e Maximum Parsimony
120 (MP). Primeiramente, as seqüências foram comparadas por BI através do *software* Beast
121 versão 1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007). Foi utilizado o modelo de substituição de
122 DNA de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), gerando 50×10^9 repetições através do método
123 Markov Chain Monte Carlo (MCMC), avaliando o log-likelihood e re-distribuindo a cada

124 10.000 gerações. O relógio molecular utilizado foi baseado no modelo relaxado, com
125 calibração em 1×10^{-6} substituições por sítio a cada ano. Esta calibração foi estipulada com
126 base em trabalhos prévios (Luskashov & Goudsmit, 2001; López-Bueno *et al.*, 2006; Duffy
127 *et al.*, 2008). A análise por MP foi realizada no *software* PAUP 4.0.b (Swofford, 2002). Foi
128 realizada uma busca heurística, adição aleatória de seqüências e utilização do algoritmo
129 TBR (*tree bisection-reconnection*). A árvore consenso foi construída considerando as
130 árvores mais parcimoniosas encontradas em 1000 repetições. Por fim, para realizar a
131 análise por ML o modelo de substituição de DNA que melhor se adaptava as seqüências foi
132 obtido através do *software* ModelTest versão 3.8 (Pousada & Crandall, 1998). A análise
133 também foi realizada no *software* PAUP 4.0.b (Swofford, 2002). A busca heurística foi
134 realizada com adição aleatória de seqüências e utilização do algoritmo NNI (*nearest-*
135 *neighbor interchange*). Foram realizadas 100 repetições, criando o consenso a partir das
136 árvores mais parcimoniosas.

137 Ao analisar os nucleotídeos, a análise de todas as seqüências revelou variações em
138 37 sítios. Destes, 23 variações envolviam ao menos duas seqüências e 25 variações não
139 eram sinônimas. Na região considerada de alta variabilidade, entre os nucleotídeos número
140 3889 a 4239 (Zimmermann *et al.*, 2006), foram observadas 11 variações sinônimas e 20
141 não sinônimas. A presença de regiões conservadas (com mais de 30 nucleotídeos) foi
142 evidenciada nas posições: 3781-3814, 3831-3882, 4079-4114, 4211-4325, 4327-4369 e
143 4371-4413.

144 Entre as substituições de aminoácidos descritas como possíveis responsáveis pela
145 patogenicidade do PPV (Bergeron *et al.*, 1996), quatro destes sítios foram analisados no
146 presente estudo (528, 533, 586 e 715), conforme disposto na Tabela 1. Dentre as novas
147 seqüências, três destas modificações foram observadas nas amostras S30 e S31 (D-528→G,
148 H-533→Q e R-715→K) e nenhuma nas amostras Embrapa, PA e PB. Entre as seqüências
149 de vacinas disponíveis no GenBank, duas (I18745 e A26477) apresentavam uma
150 modificação (R-715→K) e uma (AY684872) apresentou três modificações (D-528→G, S-
151 586→P e R-715→K). Nenhuma das vacinas apresentou a mesma disposição de
152 aminoácidos que a cepa Kresse (considerada de alta virulência), nos sítios relacionados à
153 virulência. Interessantemente, as amostras S30 e S31 possuíam um aminoácido Thr na
154 posição 586. Esta alteração, também foi evidenciada por Zimmermann *et al.* (2006), que

155 reportaram três amostras com esta substituição. Posteriormente, a presença da Thr neste
156 sítio foi relacionada a possibilidade de ocasionar queda na eficiência da neutralização por
157 anticorpos neutralizantes (Zeeuw *et al.*, 2007).

158 A análise filogenética deste trabalho foi focada na região VP1/VP2, considerada
159 uma região com pressão seletiva neutra, ideal para este tipo de análise (Shangjin *et al.*,
160 2008). Foi evidenciada a presença de dois grupamentos nas distintas árvores, apresentando
161 variações de acordo com o tipo de análise. O único grupamento que apresentou consistência
162 nas distintas análises foi composto por seqüências de origem chinesa (AY502115,
163 AY781130 AY786299, AY788086, AY788087, AY788088, DQ464345 e EU790642). As
164 demais seqüências apresentavam a formação de grupos e sub-grupos conforme o tipo de
165 análise, entretanto um consenso entre a árvore de BI, MP e ML não foi encontrado. A
166 presença de dois grupamentos já foi relatada em outros trabalhos (Soares *et al.*, 2003;
167 Zimmermann *et al.*, 2007; Shangjin *et al.*, 2008). Entretanto as amostras que compunham
168 cada grupamento e sub-grupamentos variaram conforme a metodologia de cada trabalho,
169 comprovado que muitas das variantes de PPV não se enquadram em grupamentos
170 definidos. Dentre as oito amostras chinesas que formaram um grupamento no presente
171 estudo, apenas a seqüência EU790642 foi utilizada em um estudo prévio (Shangjin *et al.*,
172 2008), não nos possibilitando relacionar a estudos prévios.

173 Ao relacionar a árvore filogenética com a virulência (Figura 1), foi observado que as
174 amostras de virulência similar tenderam a ficar nos mesmos sub-grupos. Não houve co-
175 relação com grupos maiores. Recentemente, uma análise similar foi realizada por Shangjin
176 *et al.* (2008), não conseguindo achar relação entre grupamentos e virulência. No presente
177 trabalho, estes resultados podem ser o reflexo da falta de definição da análise filogenética
178 sobre grande parte das seqüências. Por outro lado, poderia ser um indicativo de que as
179 proteínas estruturais não são as únicas (ou principais) responsáveis pela virulência. Além
180 do capsídeo, existe uma região repetida de 127 nucleotídeos que é creditada à virulência
181 (Simpson *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2003), porém esta hipótese é controversa (Zeeuw *et al.*,
182 2007).

183 O relógio molecular demonstrou uma distância de 5.579,64 anos (com desvio de
184 3.854,54 a 8.983,25 anos) com os vírus pertencentes ao *outgroup*. A subdivisão entre os
185 dois principais grupos ocorreu há 2890,19 anos (desvio 1.099,96 a 6.152 anos) e as mais

186 recentes variações ocorreram nos últimos três séculos. A calibração utilizada no relógio
187 molecular foi conservadora (na ordem de 10^{-6} substituições/sítio/ano), considerando o PPV
188 como um dos vírus mais conservados entre os parvovírus e vírus de fita simples de DNA
189 (Luskashov & Goudsmit, 2001; López-Bueno *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2008). As
190 informações fornecidas pelo relógio molecular, quanto ao surgimento do PPV e posteriores
191 subdivisões, estão dentro da margem dos 9.000 anos estimados para a domesticação dos
192 suínos (Chen *et al.*, 2007). A presença de um grande grupo apenas com amostras chineses
193 possivelmente seja resultante de um centro de domesticação asiático, separado de outros
194 centros (Giuffra *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 2005). As novas variantes do PPV ocorridas nos
195 últimos séculos possivelmente tenham origem no processo de fixação de determinadas
196 raças suínas realizado na Europa nos séculos XVIII e XIX (Kijas & Andersson, 2001). Por
197 outro lado, a presença de vírus encontrados no Brasil e China dentro de mesmos sub-
198 grupamentos deve ser conseqüência da importação de genética chinesa para a suinocultura
199 brasileira.

200 Embasado nestes resultados, pode-se verificar que as diferenças entre as cepas de
201 PPV receberam pouca influência dos eventos ligados a suinocultura nas últimas décadas.
202 Segundo os dados aqui amostrados, as vacinas comerciais utilizadas atualmente na
203 suinocultura, que possuem cerca de 30 anos, não seriam responsáveis pelo surgimento de
204 novas variantes, conforme sugerido previamente (Zeeuw *et al.*, 2007). Provavelmente, o
205 advento de técnicas mais sensíveis apenas facilitou a descoberta de variantes já existentes e
206 que circulam há muito tempo. Em contrapartida, o grande número de variantes pode
207 contribuir para uma proteção incompleta das vacinas, possibilitando, inclusive, a circulação
208 na granja de duas ou mais variantes de PPV. Esta possibilidade já foi detectada
209 anteriormente por Soares *et al.*, (2003), que encontrou duas variantes distintas (97,8 % de
210 identidade) na mesma granja em um intervalo menor que dois meses.

211 Este foi o primeiro trabalho analisando todas as seqüências existentes no
212 GenBank/EMBL/DDBJ da porção VP1/VP2 do PPV, adicionadas de cinco novas
213 seqüências do Brasil. Dentre estas, duas continham a variação antigênica Thr no sítio 586,
214 recentemente relacionada à patogenicidade. Entretanto, nossos resultados indicaram que
215 estas variações já existiam antes do advento da vacinação comercial para a parvovirose.

216

217 **Referências**

218

219 **Bergeron, J., Hérbert, B. & Tijssen, P. (1996).** Genome organization of the Kresse strain
220 of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with
221 those of NADL-2 and fields isolates. *J Virol* **70**, 2508-2515.

222 **Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E.**
223 **& Van Der Noordaa, J. (1990).** Rapid and simple method for purification of nucleic acids.
224 *J Clin Microbiol* **28**, 495-503.

225 **Chapman, M.S. & Rossmann, M.G. (1993).** Structure, sequence and function correlations
226 among parvoviruses. *Virology* **194**, 491-508.

227 **Chen, K., Baxter, T., Muir, W.M., Groenen, M.A. & Schook, L.B. (2007).** Genetic
228 resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *Int J Biol*
229 *Sci* **3**, 153-165.

230 **Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007).** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by
231 sampling trees. *BMC Evol Biol* **7**, 214.

232 **Duffy, S., Shackelton, L.A. & Holmes, E.C. (2008).** Rates of evolutionary change in
233 viruses: patterns and determinants. *Nat Genet* **9**, 267-276.

234 **Etingov, I., Itah, R., Mincberg, M., Keren-Naus, A., Nam, H.J., Agbandje-Mckenna,**
235 **M. & Davis, C. (2008).** An extension of the minute virus of mice tissue tropism. *Virology*
236 **379**, 245-255.

237 **Gardiner, E.M. & Tattersall, P. (1988).** Mapping of the fibrotropic and lymphotropic
238 host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **62**, 2605-2613.

239 **Giuffra, E., Kijas, J.M., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J.T. & Andersson, L.**
240 **(2000).** The origin of the domestic pig: Independent domestication and subsequent
241 introgression. *Genetics* **154**, 1785-1791.

242 **Kijas, J.M. & Andersson, L. (2001).** A phylogenetic study of the origin of the domestic
243 pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *J Mol Evol* **52**, 302-308.

244 **Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J.,**
245 **Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L.**
246 **& Cooper, A. (2005).** Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of
247 pig domestication. *Science* **11**, 1618-1621.

- 248 **López-Bueno, A., Villarreal, L.P. & Almendral, J.M. (2006).** Parvovirus variation for
249 disease: a difference with RNA viruses? *Curr Topics Microbiol Immunol* **299**, 349-370.
- 250 **Lukashov, V.V. & Goudsmit, J. (2001).** Evolutionary relationships among parvoviruses:
251 virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-
252 associated and avian parvoviruses *J Virol* **75**, 2729-2740.
- 253 **Mengeling, W.L., Lager, K.M. & Vorwald, A.C. (2000).** The effect of porcine parvovirus
254 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive
255 performance. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 199-210.
- 256 **Parrish, C.R. & Carmichael L.E. (1986).** Characterization and recombination mapping of
257 an antigenic and host range mutation of canine parvovirus. *Virology* **148**, 121-132.
- 258 **Parrish, C.R. (1991).** Mapping specific functions in the capsid structure of canine
259 parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* **183**,
260 195-205.
- 261 **Posada, D. & Crandall, K.A. (1998).** Modeltest: testing the model of DNA substitution.
262 *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- 263 **Simpson, A.A., Hébert, B., Sullivan, G.M., Parrish, C.R., Zádori, Z., Tijssen, P. &**
264 **Rossmann, M. (2002).** The structure of porcine parvovirus: comparison with related
265 viruses. *J Mol Biol* **315**, 1189-1198.
- 266 **Shangjin, C., Cortey, M. & Segalés, J. (2008).** Phylogeny and evolution of the NS1 and
267 VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Res* In press.
- 268 **Soares, R.M., Cortez, A., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Martins, V.G., Bacci,**
269 **M., De Campos, F.M. & Richtzenhain, L.J. (2003).** Genetic variability of porcine
270 parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene
271 VP2. *J Gen Virol* **84**, 1505-1515.
- 272 **Swofford, D. L. (2002).** *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other*
273 *Methods)*. Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
- 274 **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary
275 Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- 276 **Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Lau, M.,**
277 **Smith T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W. & Parrish, C.R. (1991).** The three-

278 dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**,
279 1456-1464.

280 **Zeeuw, E.J.L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.J. & Truyen, U. (2007).** Study of
281 the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates
282 and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J Gen Virol* **88**, 420-427.

283 **Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H. J., Heinritzi, K. & Truyen, U. (2006).** VP1
284 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J Gen Virol*
285 **87**, 295-301.

286

287

288 Tabela 1. Principais sítios de substituição entre as seqüências deduzidas de aminoácidos.

| Amostra | 470* | 528 | 533 | 557 | 573 | 586 | 705 | 714 | 715 |
|-------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| NADL-2 (EUA) | I | D | H | K | N | S | N | I | R |
| Kresse (EUA) | - | G** | Q | - | - | P | - | - | K |
| Embrapa (Brasil) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PA | - | - | - | - | K | - | - | - | - |
| PB | ND | - | - | - | - | - | - | - | - |
| S30 | - | G | Q | - | - | T | - | - | K |
| S31 | - | G | Q | - | - | T | - | - | K |
| 15a (Alemanha) | - | G | Q | - | - | T | - | - | K |
| 27a | - | G | Q | - | - | T | - | - | K |
| 143a | T | G | Q | N | - | T | - | - | K |
| Vacina (I18745) | - | - | - | N | - | - | K | - | K |
| Vacina (AY684872) | T | G | - | - | - | P | K | M | K |
| Vacina (A26477) | - | - | - | - | - | - | K | - | K |

289 *Numeração de aminoácidos de acordo com a proteína VP1 (Bergeron *et al.*, 1996).290 **A cor cinza é relacionada à alta virulência e cor preta à nova variante recentemente
291 descrita (Bergeron *et al.*, 1996; Zeeuw *et al.*, 2007).

292 ND: não determinado.

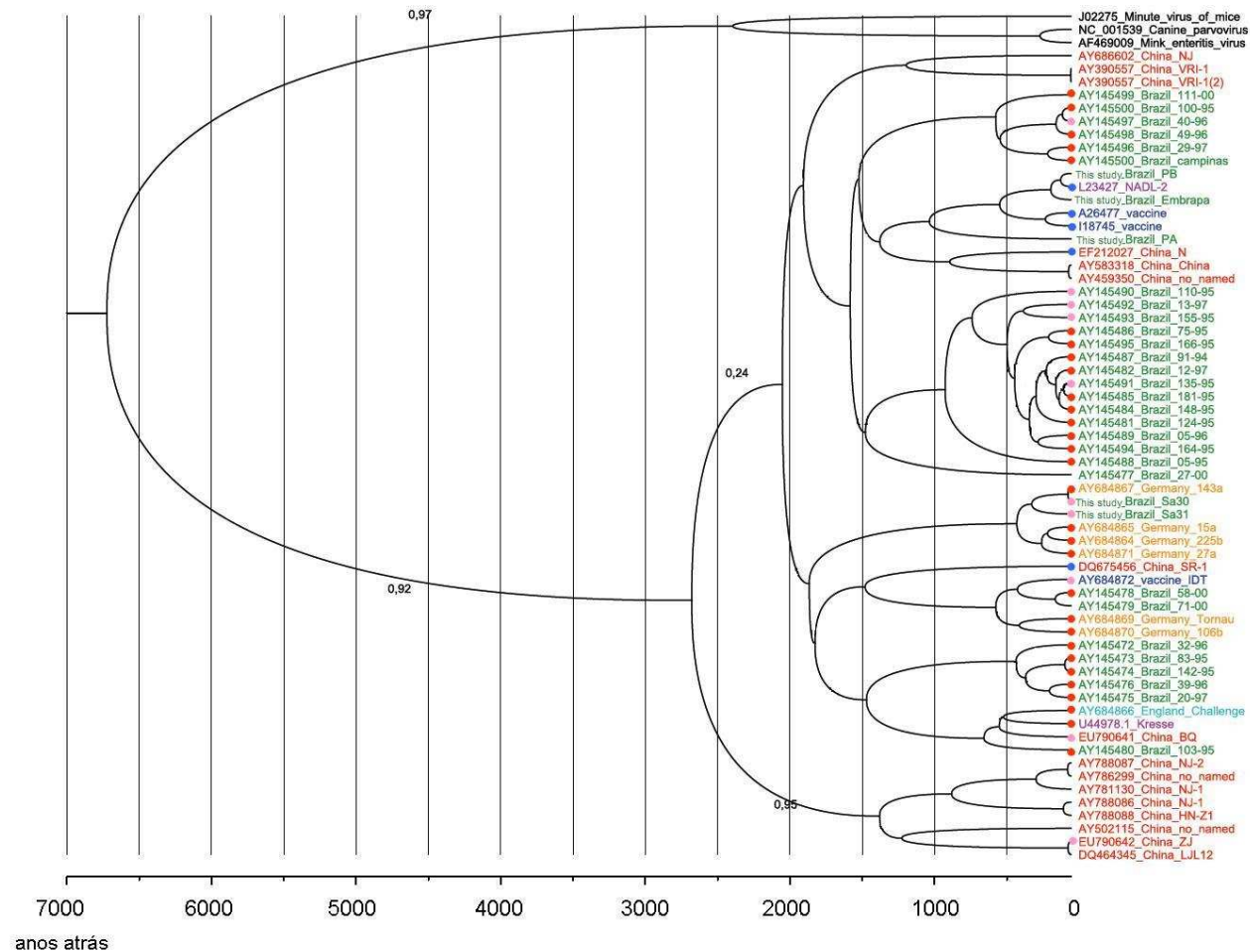


Figura 1. Árvore filogenética baseada na análise por BI para as seqüências de PPV, acrescidas das amostras de *outgroup*. As amostras estão identificadas da seguinte forma: número do GenBank_País_Nome da amostra. ● virulência alta; ● virulência moderada; ● virulência atenuada.

3 DISCUSSÃO GERAL

No Brasil, o PPV é um agente conhecido desde a década de 80 (GOUVEIA et al., 1984; MARTINS et al., 1984) e sua presença tem caráter ubíquo, independente de localização geográfica ou tipo de criação (comercial ou de subsistência) (BERSANO et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 2003; SOARES et al., 2003; MORENO et al., 2007). Com o surgimento de vacinas fornecidas por empresas farmacêuticas, no início dos anos 90, a vacinação (com vacina inativada) passou a ser uma prática comumente utilizada nas criações comerciais brasileiras. Atualmente, os rebanhos brasileiros continuam utilizando as mesmas vacinas, embora relatos apontem que sua utilização tornou-se variável conforme o valor dos índices de perdas reprodutivas obtidos nas granjas. Ao mesmo tempo, as preocupações sanitárias da suinocultura brasileira focam-se, de maneira intensa, em doenças emergentes, como TTV, PRSS e PCV2, tornando escassos os trabalhos envolvendo PPV.

Neste contexto, o presente trabalho é composto por dois artigos, sendo que o primeiro descreve o diagnóstico no soro de PPV em leitões (saudáveis e refugos) e fêmeas (em distintas ordens de parto) através de nested-PCR, correlacionando estes resultados com os títulos de Inibição da Hemaglutinação (HI) nestas fêmeas. A nested-PCR obteve resultados positivos em todas as categorias analisadas: leitões saudáveis (15,7% de animais positivos), leitões refugos (18,2%) e fêmeas (17,8%). Os índices de animais positivos para as distintas ordens de parto foram de 20,8%, 8,7%, 12,5%, 27,3%, 20,8% e 15,0% para as ordens de parto 1, 2, 3, 4, 5 e ≥ 6 , respectivamente. Ao analisar as fêmeas pelo método de HI, verificamos que 84,7% destas eram positivas. As médias dos títulos nas distintas ordens de parto foram de 2142,7 (8,7), 2403,1 (9,8), 2250,0 (9,9), 2952,2 (10,6), 2600,3 (9,8) e 2154,7 (9,7) para as ordens de parto 1, 2, 3, 4, 5 e ≥ 6 respectivamente ($\log_2 X$ em parênteses). Curiosamente, verificando a correlação entre o resultado da nested-PCR e o título de HI (Anexo 1) se observou que nenhuma amostra com título ≤ 32 foi positiva na nested-PCR. As amostras positivas na nested-PCR possuíam títulos mais elevados, em sua maioria ≥ 512 .

Os achados sorológicos obtidos no teste de HI são similares a algumas mensurações encontradas na literatura¹⁹. Os dados obtidos em outros países variam de 44% de fêmeas positivas (ORAVAINEN et al., 2005), 64,5% (STAFFORD et al.,

¹⁹ Amostras consideradas positivas, com título superior a 80.

1992), 73,1% (FONI et al., 1989) a 84,6% (ORAVAINEN et al., 2006). No Brasil, inquéritos sorológicos realizados na Região Sul demonstraram grande homogeneidade em criações comerciais, variando de 80,0% (MARTINS et al., 1984) a 80,5% de suínos positivos (DAMBROS et al., 1995). Por outro lado, o mesmo não foi evidenciado em criações extensivas ou de subsistência no Brasil, que apresentaram de 14,6% (BARTHASSON et al., 2006) a 51,5% de animais positivos (RODRIGUEZ et al., 2003). Possivelmente, a homogeneidade encontrada em criações comerciais seja resultado de práticas de vacinação, além das granjas possuírem um maior número de animais, propiciando a manutenção da circulação de agentes infecciosos entre os animais.

Em experimento realizado em condições de campo, foi verificado que os títulos provenientes de vacinas inativadas não excediam 512 (ORAVAINEN et al., 2006). No presente trabalho, 54,8% das fêmeas analisadas tinham títulos que excediam estes valores e 8,1% foram consideradas negativas (≤ 32). A realização da nested-PCR a partir dos soros possibilitou confirmar que realmente havia vírus de campo circulando nas criações e, possivelmente, gerando os altos títulos observados nos soros.

Tradicionalmente, a detecção direta do PPV é realizada a partir de tecidos ou envoltórios fetais (JOO et al., 1976c; ORAVEERAKUL et al., 1990; SOARES et al., 1998; WOLF et al., 2008). Não foram encontrados trabalhos que relatem a detecção do vírus no soro de leitões ou animais adultos a campo para podermos comparar com os presentes resultados. O relato mais aproximado analisou órgãos linfáticos de leitões refugos (apresentando PMWS), onde 35,0% foram positivos para PPV através de PCR (CAO et al., 2005), número maior do que os 18,2% encontrados para leitões refugos no presente estudo. Outro trabalho realizou a detecção do vírus no soro de suínos experimentalmente infectados através da PCR em tempo real, detectando a presença de fraca positividade em quatro amostras (MCKILLEN et al., 2007). A nested-PCR realizada do soro representa uma alternativa prática para verificar se há vírus circulando nas criações suinícolas, tendo em vista que ainda não há um sistema comercial que possibilite discernir entre anticorpos originados da vacina ou do desafio de campo. Como perspectiva, uma PCR em tempo real está sendo padronizada a fim de verificar a carga viral presente nestas amostras de soro para comparar com os resultados da titulação obtida por HI e da nested-PCR.

É importante ressaltar que o objetivo das vacinas não é impedir a circulação de cepas de campo, mas sim evitar perdas reprodutivas ocasionadas pelo PPV. O presente

trabalho não foi elaborado para avaliar estes parâmetros, desta forma não avalia a eficácia das vacinas.

No segundo artigo, foram estudadas seqüências da porção VP1/VP2 de PPV obtidas do GenBank juntamente com cinco amostras seqüenciadas no presente estudo. A análise foi realizada para verificar a presença de determinados aminoácidos relacionados a virulência e através de filogenia.

Originalmente, o objetivo deste artigo era conseguir seqüenciar a porção referente ao gene VP1/VP2 de uma amostragem maior (entre 30 a 35 amostras). Para isto, a amostragem proveniente do primeiro artigo foi utilizada, mas buscando-se amplificar um fragmento maior (aproximadamente 1000 pb) da região VP, abordagem que se mostrou menos sensível do que a utilizada para diagnóstico. Neste contexto, a amplificação e o seqüenciamento das amostras foram embasados em um trabalho prévio, que conseguiu uma amostragem de 29 seqüências desta região (SOARES et al., 2003). Entretanto, foi possível amplificar o fragmento de DNA para tipificação somente de cinco amostras. Na literatura, existem outros dois trabalhos que realizaram trabalho similar com o PPV, onde foram analisadas sete novas amostras (ZIMMERMANN et al., 2006) e duas novas amostras (SHANGJIN et al., 2009). Curiosamente, nestes artigos, não foram relatadas quaisquer dificuldades na obtenção de amostras ou seqüenciamento, mas, devido ao pequeno número de amostras, isto pode ter ocorrido também.

Como resultados, o seqüenciamento revelou que duas das novas amostras (S30 e S31) apresentavam modificações em regiões consideradas importantes para a virulência do PPV. Entre estas, destaca-se a modificação no sítio 586²⁰, com a presença do aminoácido Thr. A análise filogenética demonstrou que as seqüências de PPV se dividem em dois grupamentos, porém com apenas um grupamento, composto por oito amostras chinesas, bem definido. Por último, o relógio molecular revelou que a separação dos dois principais grupos ocorreu há 2890 anos. Por sua vez, as derivações mais recentes ocorreram nos últimos três séculos.

A variante contendo o aminoácido Thr no sítio 586 ainda não havia sido descrita na suinocultura brasileira. Conforme Zeeuw et al. (2007), esta substituição poderia acarretar em um vírus com maior capacidade de resistência em porcas vacinadas. Curiosamente, a categoria animal de onde foram coletadas as amostras era de creche ou

²⁰ Numeração dos aminoácidos da proteína VP1 de acordo Bergeron et al. (1996).

terminação, mais especificamente em animais refugos. Infelizmente, não foi possível avaliar se esta variante de PPV estava envolvida na refugagem destes animais.

Por outro lado, a análise filogenética revelou a existência de grupamentos com baixa definição para a maioria das seqüências. Os trabalhos prévios não relatam este achado em suas análises filogenéticas (SOARES et al., 2003; ZIMMERMANN et al., 2006; SHANGJIN et al., 2009), embora suas árvores filogenéticas demonstrem grupos com baixa confiança. Possivelmente, a baixa definição de grupos encontrada nas diferentes análises seja decorrente da estabilidade do vírus, com poucas substituições entre cada variante. Em decorrência disto, os parâmetros utilizados para a calibração do relógio molecular, optando por um modelo mais conservador, são plenamente justificáveis.

No Brasil, este foi o segundo estudo deste gênero, dando continuidade ao trabalho desenvolvido por Soares et al. (2003). Ao todo, o Brasil apresenta 34 amostras seqüenciadas em sua porção VP1/VP2 e, nestas, foram encontradas 25 distintas variantes virais, cada uma com um perfil diferente de aminoácidos no capsídeo. A presença deste número alto de variantes indica que as práticas utilizadas na suinocultura brasileira não exercem pressão seletiva para o predomínio de uma variante bem estabelecida. Por outro lado, corrobora a hipótese levantada por Soares et al. (2003), de que duas ou mais variantes possam circular em uma mesma granja.

Por fim, este trabalho levantou aspectos sobre a epidemiologia do PPV. Contudo, questões ainda continuam sem respostas, como: qual a importância do vírus nos animais de creche e terminação; através de qual mecanismo as variantes de PPV interferem nos parâmetros reprodutivos; se a imunidade gerada pelas cepas utilizadas nas vacinas protege contra estas variantes; se a imunidade ativa nos plantéis comerciais brasileiros é originada devido a vacina ou devido às próprias cepas circulantes; se os vírus presentes no soro de reprodutoras HI positivas causam problemas reprodutivos; e qual seria o mecanismo de manutenção do DNA do PPV na presença de altos títulos de anticorpos.

4 CONCLUSÕES

1. A nested-PCR para PPV demonstrou positividade de 15,7% em leitões saudáveis, 18,2% em leitões refugos e 17,8% em fêmeas gestantes, demonstrando ser uma metodologia viável para a detecção do PPV e estudos epidemiológicos. Quase todas as granjas (a exceção de uma) apresentavam amostras positivas na nested-PCR para o PPV.
2. Os índices de reprodutoras positivas na nested-PCR para as distintas ordens de parto foram de 20,8%, 8,7%, 12,5%, 27,3%, 20,8% e 15,0% para as ordens de parto 1, 2, 3, 4, 5 e ≥ 6 , respectivamente, números que não foram estatisticamente diferentes.
3. Através da Inibição da Hemaglutinação (HI), 84,7% dos soros das fêmeas possuíam anticorpos para PPV. Os títulos nas distintas ordens de parto foram de 2142,7 (8,7), 2403,1 (9,8), 2250,0 (9,9), 2952,2 (10,6), 2600,3 (9,8) e 2154,7 (9,7) para as ordens de parto 1, 2, 3, 4, 5 e ≥ 6 respectivamente ($\log_2 X$ entre parênteses). Todas as granjas estudadas apresentavam reprodutoras com títulos de anticorpos anti-PPV inibidores da hemaglutinação altos (> 512), excedendo o esperado por uma resposta vacinal.
4. A maioria das fêmeas positivas na nested-PCR (76,2%) apresentavam títulos de anticorpos iguais ou maiores que 512 na HI.
5. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os resultados da nested-PCR e os títulos de HI. Ao contrário do que era esperado, fêmeas com altos títulos de anticorpos possuíam DNA do vírus na circulação.
6. Foi evidenciado que amostras brasileiras recentes apresentavam determinados aminoácidos no capsídeo, já relacionados a alta virulência em outros trabalhos.
7. A caracterização genética de 34 amostras brasileiras demonstrou que existiam 25 variantes de PPV distintas.
8. A análise filogenética revelou a existência de dois grupamentos, porém apenas um apresentou confiabilidade aceitável.

9. O relógio molecular revelou que a separação entre os maiores grupamentos ocorreu há, aproximadamente, 3 mil anos e, entre os mais recentes sub-grupamentos, nos últimos 300 anos.

REFERÊNCIAS

ABIEPCS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em <<http://www.abiepcs.org.br>>. Acesso em: 15 outubro 2008.

ALLAN, G.M.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; FOSTER, J.C.; ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.J.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 1-11, 1999.

ALBINA, E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. **Veterinary Microbiology**, v. 55, n. 1-4, p. 309-316, 1997.

AMAND, S.T.; BEARD, J.C.; HUMPHRIES, K.; ASTELL, C.R. Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. **Virology**, v. 183, p. 133-142, 1991.

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

APPEL, M.J.; SCOTT, F.W.; CARMICHAEL, L.E. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis. **Veterinary Record**, v. 105, p. 156-159, 1979.

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

BADGETT, M.R.; AUER, A.; CARMICHAEL, L.E.; PARRISH, C.R.; BULL, J.J. Evolutionary dynamics of viral attenuation. **Virology**, v. 76, p. 10524-10529, 2002.

BAN, N.; MCPHERSON, A. The structure of satellite panicum mosaic virus at 1.9 Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 2, p. 882-890, 1995.

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. Detecção de infecção por parvovírus suíno e gastroenterite transmissível em suínos criados de forma extensiva do Estado de Goiás. In: 3º Congresso Latino-Americano de Suinocultura, Foz do Iguaçu, 2006. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2006.

BARTLETT, J.S.; WILCHER, R.; SAMULSKI, R.J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. **Journal of Virology**, v. 74, p. 2777-2785, 2000.

BATES, R.C.; SNYDER, C.E.; BANERJEE, P.R.; MITRA, S. Autonomous parvovirus LuIII encapsidates equal amounts of plus and minus DNA strands. **Journal of Virology**, v. 49, p. 319-324, 1984.

BAUER, H.J.; MONREAL, G. Herpesviruses provide helper functions for avian adeno-associated parvovirus. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 181-185, 1986.

BERGERON, J.; HÉRBERT, B.; TIJSSEN, P. 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**, v. 70, n. 4, p. 2508-2515, 1996.

- BERGERON, J.; MENEZES, J.; TIJSSSEN, P. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. **Virology**, v. 197, p. 86–98, 1993.
- BERNHARD, W.; KASTEN, F.H.; CHANG, C. Étude cytochimique et ultrastructurale de cellules infectées par le virus K du rat et le virus H-I. **Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 2, s. 7, p. 1566-1569, 1963.
- BERNS, K.I.; HAUSWIRTH, W.W. Adeno-associated virus DNA structure and replication. In BERNS, K.I. **The Parvoviruses**. New York: Plenum Press, 1983. p. 1-31.
- BERNS, K.I.; LABOW, M.A. Parvovirus Gene Regulation. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 601-614, 1987.
- BERSANO, J.G.; BASTOS, G.M.; SOARES, R.M.; KROEFF, S.S.; CATROXO, M.H.B.; SIMONI, I.C. Isolamento e identificação do parvovírus suíno (PVS) no Estado de São Paulo. In: VII Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1995. **Anais...** São Paulo, 1995. v. 30, p. 37.
- BERSANO, J.G.; SCHOTTEN, M.H.S.; KROEFF, S.S.; BASTOS, G.M. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o parvovírus suíno no Estado de São Paulo. In: VI Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, 1993, **Anais...** São Paulo, 1993, v. 30, p. 17.
- BLEKER, S.; SONNTAG, F.; KLEINSCHMIDT, J.A. Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. **Journal of Virology**, v. 79, p. 2528–2540, 2005.
- BOLT, D.M.; HÄNI, H.; MÜLLER, E.; WALDVOGEL, A.S. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. **Journal of Comparative Pathology**, v. 117, n. 2, p. 107-118, 1997.
- BRAILOVSKY C. Research on the rat K virus (*Parvovirus ratti*). I. A method of titration by plaques and its application to the study of the multiplication cycle of the virus. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 110, n. 1, p. 49-59, 1966.
- BROLL, S.; WALDVOGEL, A.S.; ROSSKOPF, M.; CORBOZ, L.; POSPISCHIL, A. The infectious causes of abortion and stillbirth in swine in Switzerland. **Zentralblatt Veterinärmedizin B**, v. 40, n. 9-10, p. 641-653, 1993.
- BROWN Jr, T.T. Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies virus, and transmissible gastroenteritis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 1033-1036, 1981.
- BULIER, R.M.L.; JANIK, J.E.; SEBRING, E.D.; ROSE, J.A. Herpes simplex virus types 1 and 2 help adeno-associated virus replication. **Journal of Virology**, v. 40, p. 241-247, 1981.
- BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BUONAVOGLIA D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 3021-3025, 2001.

- BURGER, D.; GORHAM, J.R.; OTT, R.L. Protection of cats against feline panleukopenia following mink virus enteritis vaccination. **Small Animal Clinician**, v. 3, p. 611-614, 1963.
- CAO, S.; CHEN, H.; ZHAO, J.; LÜ, J.; XIAO, S.; JIN, M.; GUO, A.; WU, B.; HE, Q. 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, p. 263-269, 2005.
- CARMICHAEL, L.E.; SCHLAFER, D.H.; HASHIMOTO, A. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 165-174, 1994.
- CARTWRIGHT, S.F.; HUCK, R.A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. **Veterinary Record**, v. 81, p. 196-197, 1967.
- CARTWRIGHT, S.F.; LUCAS, M.; HUCK, R.A. A small haemagglutinating porcine DNA virus. I. Isolation and properties. **Journal of Comparative Pathology**, v. 79, p. 371-377, 1969.
- CARTWRIGHT, S.F.; LUCAS, M.; HUCK, R.A. A small haemagglutinating porcine DNA virus. II. Biological and serological studies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 81, p. 145-155, 1971.
- CASTO, B.C.; ARMSTRONG, J.A.; ATCHISON, R.W.; HAMMON, W.M. Studies on the relationship between adenoassociated virus type 1 (AAV-1) and adenoviruses. I. Inhibition of adenovirus plaques by AAV, its nature and specificity. **Virology**, v. 33, p. 452-458, 1967.
- CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; BRANDÃO, L.J.; RICHTZENHAIN, L.J. Circovirus suíno tipo 2 (PCV-2). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 281-291, 2007.
- CHAPMAN, M.S.; ROSSMANN M.G. Structure, sequence and function correlations among parvoviruses. **Virology**, v. 194, p. 491-508, 1993.
- CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; GUNTHER, R. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. **Veterinary Microbiology**, v. 15, n. 1-2, p. 19-29, 1987.
- CHRISTIANSON, W.T.; CHOI, C.S.; COLLINS, J.E.; MOLITOR, T.W.; MORRISON, R.B.; JOO, H.S. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 4, p. 262-268, 1993.
- COACKLEY, W.; SMITH, V.W. Porcine parvovirus in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 9, p. 536, 1972.
- COTMORE, S.F.; TATTERSALL, P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. **Science**, v. 226, p. 1161-1165, 1984.
- COHEN, S.; PANTE, N. Pushing the envelope: microinjection of minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 3243-3252, 2005.
- CRAWFORD, L.V.; FOLLET, E.A.C.; BURDON, M.G.; MCGEOCH, D.J. The DNA of a minute virus of mice. **Journal of General Virology**, v. 4, p. 37, 1969.

- DAEFFLER, L.; HORLEIN, R.; ROMMELAERE, J.; NUESCH, J.P. Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. **Journal of Virology**, v. 77, p. 12466–12478, 2003.
- DAMBROS, R.M.F.; MARQUES, J.L.L.; JAENISCH, F.R.F. Demonstrativo sorológico para o parvovírus suíno no Estado de Santa Catarina, no ano de 1994. In: VII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, São Paulo, 1995. **Anais...** São Paulo, 1995. p. 151.
- DARBYSHIRE, J.R.; ROBERTS, D.H. Some respiratory virus and mycoplasma infections of animals. **Journal of Clinical Pathology**, v. 21, s. 2, p. 61-87, 1968.
- DEA, S.; ELAZHARY, M.A.S.Y.; MARTINEAU, G.P.; VAILLANCOURT, J. Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 343-345, 1985.
- DEA, S.; BILODEAU, R.; ATHANASSIOUS, R.; SAUVAGEAU, R.; MARTINEAU, G.P. Swine reproductive and respiratory syndrome in Québec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. **Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 12, p. 801-808, 1992.
- DELEU, L.; PUJOL, A.; FAISST, S.; ROMMELAERE, J. Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 3877–3885, 1999.
- DING, W.; ZHANG, L.; YAN, F.; ENGELHARDT, J.F. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. **Gene Therapy**, v. 12, p. 873–880, 2005.
- DONALDSON-WOOD, C.R.; JOO, H.S.; JOHNSON, R.H. The effect on reproductive performance of porcine parvovirus infection in a susceptible herd. **Veterinary Record**, v. 100, p. 237-239, 1976.
- DONE, S.H.; PATON, D.J. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. **Veterinary Record**, v. 136, n. 2, p. 32-35, 1995.
- DORR, P.M.; BAKER, R.B.; ALMOND, G.W.; WAYNE, S.R.; GEBREYES, W.A. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 co-infection with other pathogens in swine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 2, p. 244-250, 2007.
- DRAKE, J.W. A constant rate of spontaneous mutations in DNA-based microbes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 7160–7164, 1991.
- DRAKE, J.W. Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 4171–4175, 1993.
- DREW, T.W. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Research**, v. 31, n. 1, p. 27-39, 2000.
- DUFFY, S.; SHACKELTON, L.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Review, Genetics**, v. 9, p. 267-276, 2008.
- DUNNE, H.W. Abortion, stillbirth, fetal death, and infectious infertility. In: Dunne, H.W. **Disease of Swine**. 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 1970, p. 836-868.
- DUNNE, H.W.; GOBBLE, J.L.; HOKANSON, J.F.; KRADEL, D.C.; BUBASH, G.R. Porcine reproductive failure associated with a newly identified “SMEDI” group of

- picorna viruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, p. 1284-1297, 1965.
- DUHAMEL, G.E.; BARGAR, T.W.; SCHMITT, B.J.; MOLITOR, T.W.; LU, W. Identification of parvovirus-like virus particles in intestinal crypt epithelial cells of pigs with diarrhea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, p. 96-98, 1991.
- ECHOLS, H.; GOODMAN, M.F. Fidelity mechanisms in DNA replication. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 477-511, 1991.
- ETINGOV, I.; ITAH, R.; MINCBERG, M.; KEREN-NAUS, A.; NAM, H.J.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; DAVIS, C. An extension of the minute virus of mice tissue tropism. **Virology**, v. 379, n. 2, p. 245-255, 2008.
- FARR, G.A.; ZHANG, L.; TATTERSALL, P. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 17148-17153, 2005.
- FENATI, M.; ARMAROLI, E.; CORRAIN, R.; GUBERTI, V. Indirect estimation of porcine parvovirus maternal immunity decay in free-living wild boar (*Sus scrofa*) piglets by capture-recapture data. **The Veterinary Journal**, 2009. In press.
- FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M.; (Org.). **Principles of virology**. Washington DC: ASM press, 2000.
- FONI, E.; GUALANDI, G.L. A serological survey of swine parvovirus infection in Italy. **Microbiologica**, v. 12, n. 3, p. 241-245, 1989.
- FREDERICO, L.A.; KUNKEL, T.A.; SHAW, B.R. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination – determination of rate constants and the activation energy. **Biochemistry**, v. 29, p. 2532-2537, 1990.
- FUJISAKI, Y. Haemagglutination-inhibition test for porcine parvovirus. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v. 28, n. 3, p. 135-138, 1975.
- FUJISAKI, Y.; MURAKAMI, Y.; SUZUKI, H. Establishment of an attenuated strain of porcine parvovirus by serial passage at low temperature. **National Institute of Animal Health**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1982.
- GARDINER, E.M.; TATTERSALL, P. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. **Journal of Virology**, v. 62, p. 2605-2613, 1988.
- GENOV, I.; SURTMADZHIEV, K.; FODOROV, V.; MERMERSKY, K. Parvoviruses isolated from pigs in Bulgaria. **Veterinaria Sbirka**, v. 68, n. 6, p. 3-6, 1971.
- GESTIN, G.; GUILLOU, L.; POMMIER, P.; BAUDIN, P. Choice of the injection site in sows: comparison of safety and activity of an inactivated PPV vaccine (SUVAXYN PARVO) when inoculated either into the croup or into the loin. In: 15th IPVS Congress, Birmingham, 1998. **Proceedings of the...** Birmingham, 1998. p. 368.
- GILLICK, J.C. An outbreak of swine fetal mummification associated with porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, p. 105-106, 1970.
- GIPSON, P.S.; VEATCH, J.K.; MATLACK, R.S.; JONES, D.P. Health status of a recently discovered population of feral swine in Kansas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 35, n. 3, p. 624-627, 1999.

- GIROD, A.; WOBUS, C.E.; ZÁDORI, Z.; RIED, M.; LEIKE, K.; TIJSSSEN, P.; KLEINSCHMIDT, J.A.; HALLEK, M. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 973-978, 2002.
- GORDON, W.A.M.; LUKE, D. An outbreak of Aujeszky's disease in swine with heavy mortality in piglets, illness in sows and death in utero. **Veterinary Record**, v. 67, p. 591-597, 1955.
- GOUVEIA, A.M.G.; GOMEZ, M.C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, p. 17-22, 1984.
- GRADIL, C.; MOLITOR, T.; HARDING, M.; CRABO, B. Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 3, p. 359-362, 1990.
- GRIEGER, J.C.; JOHNSON, J.S.; GURDA-WHITAKER, B.; AGBANDJE-McKENNA, M.; SAMULSKY, R.J. Surface exposed adeno-associated virus Vp1-NLS capsid fusion protein rescues infectivity of non-infectious wildtype Vp2/Vp3 and Vp3-only capsids, but not 5-fold pore mutant virions. **Journal of Virology**, v. 81, p. 7833-7843, 2007.
- HALLAUER, C.; KRONAUER, G. Nachweis von Gelbfieberevirus-Haemagglutinin in menschlichen Explantaten. **Archiv für die Gesamte Virusforschung**, p. 267-286, 1960.
- HAMPTON, E. G. Viral antigen in rat embryo in culture infected with the H-I virus isolated from transplantable human tumours: cytochemical studies. **Cancer Research**, v. 24, p. 1534-1543, 1964.
- HARBINSON, C.E.; CHIORINI, J.A.; PARRISH, C. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 208-214, 2008.
- HARDING, J.C. Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. **Swine Health and Production**, v. 6, p. 249-254, 1996.
- HIJISAKA, M.; ABE, K.; WIN, K.M.; SHIMIZU, Y.K.; KEICHO, N.; YOSHIKURA, H. Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. **Japanese Journal of Infection and Disease**, v. 54, p. 244-245, 2001.
- HIROSUE, S.; SENN, K.; CLEMENT, N.; NONNENMACHEN, M.; GIGOUT, L.; LINDEN, R.M.; WEBER, T. Effect of inhibition of dynein function and microtubule-altering drugs on AAV2 transduction. **Virology**, v. 367, p. 10-18, 2007.
- HOGGAN, M.D. Small DNA viruses. In: MARAMOROSCH, K.; KURSTAK, E. **Comparative Virology**. New York: Academic Press. 1971.
- HOGG, G.G.; LENGHAUS, C.; FORMAN, A.J. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, p. 539-549, 1977.
- HOHDATSU, T.; BABA, K.; IDE, S.; TSUCHIMOTO, M.; NAGANO, H.; YAMAGAMI, T.; YAMAGISHI, H.; FUJISAKI, Y.; MATUMOTO, M. Detection of antibodies against porcine parvovirus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 11-19, 1988.

HOKYNAR, K.; DERLUND-VENERMO, M.; PESONEN, M.; RANKI, A.; KIVILUOTO, O.; PARTIO, E.K.; HEDMAN, K. A new parvovirus genotype persistent in human skin. **Virology**, v. 302, p. 224–228, 2002.

HONG, Q.; QIAN, P.; LI XM, YU, X.L.; CHEN, H.C. A recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid proteins precursor P1-2A of FMDV and VP2 protein of porcine parvovirus: a trivalent vaccine candidate. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 11, p. 1677-1683, 2007.

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

HUEFFER, K.; PARRISH, C.R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 392-398, 2003.

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

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

ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>> Acesso em: 05 julho 2008.

JACK, P.J.; AMOS-RITCHIE, R.N.; REVERTER, A.; PALACIOS, G.; QUAN, P.L.; JABADO, O.; BRIESE, T.; IAN LIPKIN, W.; BOYLE D.B. Microarray-based detection of viruses causing vesicular or vesicular-like lesions in livestock animals. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 145-153, 2009.

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

JOHNSON, R.H.; COLLINGS, D.F. Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus. **Veterinary Record**, v. 85, p. 446, 1969.

JOHNSON, R.H.; DONALDSON-WOOD, C.R.; ALLENDER, U. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, p. 80-84, 1976.

JONES, M.S.; KAPOOR, A.; LUKASHOV, V.V.; SIMMONDS, P.; HECHT, F.; DELWART, E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8230–8236, 2005.

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. A microneutralization test for the assay of porcine parvovirus antibody. **Archives of Virology**, v. 47, n. 4, p. 337-341, 1975.

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

JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H.; CAMPBELL, R.S.F. Pathogenesis of porcine parvovirus infection: pathology and immunofluorescence in the foetus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, p. 383-391, 1977.

- JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. **Archives of Virology**, v. 51, p. 123–129, 1976b.
- JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOHNSON, R.H. Rapid diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified fetuses. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, n. 1, p. 51-52, 1976c.
- JOO, H.S.; JOHNSON, R.H. Serological response in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. **Australian Veterinarian Journal**, v. 53, p. 550-553, 1977.
- KARASAKI, S. Size and ultrastructure of the H-viruses as determined with the specific antibodies. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 16, p. 109-122, 1966.
- KEKARAINEN, T.; SIBILA, M.; SEGALÉS, J. Prevalence of swine torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 833-837, 2006.
- KELKAR, S.; DE, B.P.; GAO, G; WILSON, J.M.; CRYSTAL, R.G.; LEOPOLD, P.L. A common mechanism for cytoplasmic dyne independent microtubule binding shared among adeno-associated virus and adenovirus serotypes. **Journal of Virology**, v. 80, p. 7781–7785, 2006.
- KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN, G.M. Reproduction of lesions of Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 9-24, 2000.
- KILHAM, L.; OLIVIER, L.J. A latent virus of rats isolated in tissue culture. **Virology**, v. 7, p. 428-437, 1959.
- KIM, J.; LYOO, Y.S. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. **Journal of Veterinary Science**, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2002.
- KNUUTTILA, A.; UZCÁTEGUI, N.; KANKKUNEN, J.; VAPALAHTI, O.; KINNUNEN, P. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 229-238, 2009.
- KOLLECK, R.; TSENG, B.Y.; GOULIAN, M. DNA polymerase requirements for parvovirus H1 DNA replication *in vitro*. **Journal of Virology**, v. 41, p. 982, 1982.
- KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.A.; MEEHAN, B.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 254–263, 2000.
- KRESSE, J.I.; TAYLOR, W.D.; STEWART, W.W.; EEMISSE, K.A. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 10, p. 525-531, 1985.
- LADEKJÆR-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J. A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with porcine parvovirus. **Viral Immunology**, v. 15, n. 2, p. 373–384, 2002.

- LAGER, K.M.; MENGELING, W.L. Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 357-359, 1994.
- LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; D'ALLAIRE, S. Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 2, p. 114-120, 2003.
- LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y.; TSE, H.; FU, C.T.Y.; AU, W.; CHEN, X.; TSOI, H.; TSANG, T.H.F.; CHAN, J.S.Y.; TSANG, D.N.C.; LI, K.S.M.; TSE, C.W.S.; NG, T.; TSANG, O.T.Y.; ZHENG, B.; TAM, S.; CHAN, K.; ZHOU, B.; YUEN, K. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1840-1848, 2008.
- LAWSON, J.R. Infectious infertility of swine. In: Meeting of the Expert Panel of Livestock Infertility, Rome, 1961. **Reports...** Rome, 1961. p. 67.
- LEBLANC, N.; GANTELIUS, J.; SCHWENK, J.M.; STAHL, K.; BLOMBERG, J.; ANDERSSON-SVAHN, H.; BELÁK, S. Development of a magnetic bead microarray for simultaneous and simple detection of four pestiviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 155, n. 1, p. 1-9, 2009.
- LENGHAUS, C.; FORMAN, A.J.; HALE, C.J. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig foetuses with porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, p. 418-422, 1978.
- LESLIE-STEEN, P.; KIRKBRIDE, C. Comparison of diagnostic methods for in utero parvovirus infection of swine fetuses. In: 3th International Symposium of World Assistance of Veterinary Laboratory, Ames, 1983, **Proceedings of the...**, Ames, 1983. n. 3, p. 111-118.
- LILJAS, L. Structure of spherical viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p. 273-280, 1991.
- LOBATO, Z.I.P. 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**, v. 44, n. 2, p. 155-156, 1992.
- LOBATO, Z.I.P.; REIS, R.; BALSAMAO, S.L.F.; FERRAZ, I.B.F.; PIVA, J.H. Serological response of sows and primiparous gilts to an inactivated vaccine to porcine parvovirus. In: IV Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, Itapema, 1989. **Anais...** Itapema, 1989. p. 51.
- LÓPEZ-BUENO, A.; SEGOVIA, J.C.; BUEREN, J.A.; O'SULLIVAN, M.G.; WANG, F.; TATTERSALL, P.; ALMENDRAL, J.M. Evolution to pathogenicity of the parvovirus minute virus of mice in immunodeficient mice involves genetic heterogeneity at the capsid domain that determines tropism. **Journal of Virology**, v. 82, n. 3, p. 1195-1203, 2008.
- LOPEZ-BUENO, A.; VILLARREAL, L.P.; ALMENDRAL, J.M. Parvovirus variation for disease: a difference with RNA viruses? **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, p. 349-370, 2006.

- LÜ, J.; ZHAO, J.; FANG, L.; HE, Q.; CAO, S.; CHEN, H. A slide latex agglutination test for the rapid detection of antibodies in serum against porcine parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 53, p. 59-61, 2006.
- LUCAS, M.H.; CARTWRIGHT, S.F.; WRATHALL, A.E. Genital infection of pigs with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 84, p. 347-350, 1974.
- LUO, W.; ASTELL, C.R. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. **Virology**, v. 195, p. 448-455, 1993.
- MCADARAGH, J.P.; ANDERSON, G.A. Transmission of viruses through boar semen. In: 18th Annual Meeting. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Portland, 1975. **Proceedings...** Portland, 1975. p. 69-76.
- MCKILLEN, J.; HJERTNER, B.; MILLAR, A.; MCNEILLY, F.; BELÁK, S.; ADAIR, B.; ALLAN, G. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 140, n. 1-2, p. 155-165, 2007.
- MAYOR, H.D.; MELNICK, J.L. Small deoxyribonucleic-acid-containing viruses (Picodnavirus group). **Nature**, v. 210, p. 331-332, 1966.
- MANI, B.; BALTZER, C.; VALLE, N.; ALMENDRAL, J.M.; KEMPF, C.; ROS, C. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. **Journal of Virology**, v. 80, p. 1015-1024, 2006.
- MANNING, A.; WILLEY, S.J.; BELL, J.E.; SIMMONDS, P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 9, p. 1345-1352, 2007.
- MARANGA, L.; RUEDA, P.; ANTONIS, A.F.; VELA, C.; LANGEVELD, J.P.; CASAL, J.I.; CARRONDO, M.J. Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 45-50, 2002.
- MARTÍNEZ, C.; DALSGAARD, K.; LÓPEZ de TURISO, J.A.; CORTÉS, E.; VELA, C.; CASAL, J.I. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. **Vaccine**, v. 10, n. 10, p. 684-690, 1992.
- MARTINS, R.M.; ROEHE, P.M.; GUIMARÃES, I.J.; BANGEL, E.V.; GUIZZAROI, I.I.; BRUCHMAN, H.A.; VIDOR, T. Sorologia de parvovírus suíno em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: I Congresso Nacional de Veterinários Especialistas em Suínos, Curitiba, 1984. **Anais...** Curitiba, 1984. p. 39.
- MEEHAN, B.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHRST, V.A.; ELLIS, J.A.; HASSARD, L.E.; CLARK, E.G.; HAINES, D.M.; ALLAN, G.M. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2171-2179, 1998.
- MENGELING, W.L.; BROWN, T.T.; PAUL, P.S.; GUTEKUNST, D.E. Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, p. 204-207, 1979.
- MENGELING, W.L.; 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.; CUTLIP, R.C.; BARNETT, D. Porcine parvovirus: pathogenesis, prevalence, and prophylaxis. In: International Pig Veterinary Society Congress. Zagreb, 1978. **Proceeding...** Zagreb, 1978. p. 15.
- 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.1 99–210, 2000.
- MENGELING, W.L.; PAUL, P.S. The relative importance of swine and contaminated premises as reservoirs of porcine parvovirus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, p. 1293-1295, 1986.
- MENGELING, W.L. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 11, p. 2239-2248, 1972.
- MENGELING, W.L. Porcine Parvovirus. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (Org.). **Diseases of Swine**. 8.ed. Iowa State University Press: Ames, 1999. Cap.8, p.119-124.
- MIGLINO, M.A.; PEREIRA, F.T.V.; SANTOS, T.C.; CARVALHO, A.F. A morfologia placentária dos suínos domésticos: revisão. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 4, n. 1, p. 71-76, 2001.
- MIRANDA, A.C.C.; REIS, R.; LEITE, R.C.; GOUVEIA, A.M.G. Avaliação da sensibilidade de linhagens celulares ao parvovírus suíno (PVS). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 250-250, 1992.
- MISTELI, T.; CÁCERES, J.F.; SPECTOR, D.L. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. **Nature**, v. 387, p. 523-527, 1997.
- MOLITOR, T.W.; JOO, H.S.; THACKER, B.J. Potentiating effect of adjuvants on humoral immunity to porcine parvovirus vaccines in guinea pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 209-128, 1985.
- MOLITOR, T.W.; ORAVEERAKUL, K.; ZHANG, Q.Q.; CHOI, C.S.; LUDEMANN, L.R. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 32, n. 2-3, p. 201-211, 1991.
- MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. Parvoviridae. In: FLORES E. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ufsm. 2007. p. 275-296.
- MORENO, A.M.; PAIXÃO, R.; OLIVEIRA Jr., F.T.T.; GOBI, D.D.; NOVITA, S.M.; COUTINHO, T.A.; BACCARO, M.R. Agentes causadores de mumificação fetal, natimortalidade e abortamento em suínos no Brasil. In: 13º Congresso da ABRAVES. Florianópolis, 2007. **Anais...** Florianópolis, 2007. p. 249-252.
- MORIMOTO, T.; KURIGI, H.; MIURA, Y.; SUGIMORI, T.; FUJISAKI, Y. Isolation of Japanese encephalitis virus and hemagglutinating DNA virus from the brain of still born piglets. **National Institute of Animal Health**, v. 12, p. 127-136, 1972.
- MORON, G.; RUEDA, P.; CASAL, E.; LECLERC, C. CD8 α ⁻ CD11b⁺ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8 T cells and subsequently express CD8 α and CD205 molecules. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 10, p. 1233-1245, 2002.

- MORÓN, G.; RUEDA, P.; SEDLIK, C.; LECLERC, C. In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 2242–2250, 2003.
- MOROZOV, I.; SIRINARUMITR, T.; SORDEN, S.D.; HALBUR, P.G.; MORGAN, M.K.; YOON, K.J.; PAUL, P.S. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2535-2541, 1998.
- MOSCARI, E.; KUDRON, E.; SZALAY, D.; HORVATH, I.; SZABO, L.; TOPLAK, L. Isolation of porcine parvovirus (PPV) from swine herds affected by reproductive failure, and serologic evidence of infection in Hungarian large swine herds. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 31, p. 5-15, 1983.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINECK M.C.; STUDDERT M.J. **Veterinary Virology**. 3.ed. London: Academic Press, 1999.
- NASH, W.A. Porcine parvovirus survey. **Veterinary Record**, v. 126, p. 175-176, 1990.
- NEW, J.C.; DELOZIER, K.; BARTON, C.E.; MORRIS, P.J.; POTGIETER, L.N. A serologic survey of selected viral and bacterial diseases of European wild hogs, Great Smoky Mountains National Park, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 1, p. 103-106, 1994.
- NGUYEN, Q.T.; WONG, S.; HEEGAARD, E.D.; BROWN, K.E. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. **Virology**, v. 301, p. 374–380, 2002.
- NUESCH, J.P.; COTMORE, S.F.; TATTERSALL, P. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. **Virology**, v. 209, p. 122-135, 1995.
- OBALDIA, N. Outbreaks of porcine parvovirus disease in Panama. **Tropical Animal Health and Production**, v. 23, n. 3, p. 181-185, 1991.
- OJHA, S.; KOSTRZYNSKA, M. Examination of animal and zoonotic pathogens using microarrays. **Veterinary Research**, v. 39, n. 1, p. 4, 2008.
- ORAVAINEN, J.; HAKALA, M.; RAUTIAINEN, E.; VEIJALAINEN, P.; HEINONEN, M.; TAST, A.; VIROLAINEN, J.V.; PELTONIEMI, O.A.T. Parvovirus antibodies in vaccinated gilts in field conditions - results with HI and ELISA tests. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 91-93, 2006.
- ORAVAINEN, J.; HEINONEN, M.; TAST, A.; VIROLAINEN, J.V.; PELTONIEMI, O.A.T. High Porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 57-61, 2005.
- ORAVEERAKUL, K.; CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 85-91, 1990.
- ORAVEERAKUL, K.; CHOI, C.S.; MOLITOR, T.W. Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. **Archives of Virology**, v. 130, p. 377–389, 1993.
- PALLARES, F.J.; HALBUR, P.G.; OPRIESSNIG, T.; SORDEN, S.D.; VILLAR, D.; JANKE, B.H.; YAEGER, M.J.; LARSON, D.J.; SCHWARTZ, K.J.; YOON, K.J.; HOMAN, L.J. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) co infections in US held cases of post

weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 515-519, 2002.

PAN, Q.; HE, K.; HUANG, K. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. **Vaccine**, v. 26, n. 17, p. 2119-2126, 2008.

PAYNE, J.E.; HEALS, T.F.; PRESTON, R.E. Morphology of a small DNA virus. **Virology**, v. 23, p. 109-113, 1964.

PARADISO, P.R. Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. **Journal of Virology**, v. 39, p. 800-807, 1981.

PARRISH, C.R.; CARMICHAEL L.E. Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus. **Virology**, v. 148, p. 121-132, 1986.

PARRISH, C.R.; HAVE, P.; FOREYT, W.J.; EVERMANN, J.F.; SENDA, M.; CARMICHAEL, L.E. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1111-1116, 1988.

PARRISH, C.R. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. **Virology**, v. 183, p. 195-205, 1991.

PARRISH, C.R.; O'CONNELL, P.H.; EVERMANN, J.F.; CARMICHAEL, L.E. Natural variation of canine parvovirus. **Science**, v. 230, p. 1046-1048, 1985.

PARSYAN, A.; SZMARAGD, C.; ALLAIN, J.P.; CANDOTTI, D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 428-431, 2007.

PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; BROWN, T.T. Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. **Infection and Immunity**, v. 25, p. 1003-1007, 1979.

PAUL, P.S.; MENGELING, W.L. Oronasal and intramuscular vaccination of swine with a modified live porcine parvovirus vaccine: multiplication and transmission of the vaccine virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 12, p. 2481-2485, 1984.

PAUL, P.S.; MENGELING, W.L.; PIRTLE, E.C. Duration and biological half-life of passively-acquired colostral antibodies to porcine parvovirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 1376-1379, 1982.

PESCADOR, C.A.; BANDARRA, P.M.; CASTRO, L.A.; ANTONIASSI, N.A.B.; RAVAZZOLO, A.P.; SONNE, L.; CRUZ, C.E.F.; DRIEMEIER, D. Co-infection by porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in aborted fetuses and stillborn piglets in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 425-429, 2007.

PIMENTEL, R.C.S.; SARDI, S.I.; PIMENTEL, S.S.; TRINDADE, I.M.C.; SANTOS Jr., A.C.A. Resposta humoral, para parvovírus suíno, no leite e no sangue de fêmeas vacinadas. In: 3º Congresso Latino-Americano de Suinocultura, Foz do Iguaçu, 2006. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2006.

- QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; CHIANINI, F.; FOLCH, J.M.; MALDONADO, J.; CANAL, M.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Clinical and pathological observations on pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Veterinary Record**, v. 149, n. 12, p. 357-361, 2001.
- RAAB, U.; BECKENLEHNER, K.; LOWIN, T.; NILLER, H.H.; DOYLE, S.; MODROW, S. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. **Virology**, v. 293, p. 86-93, 2002.
- RANEY, L.R.; DELONGCHAMP, R.R.; VALENTINE, C.R. Spontaneous mutant frequency and mutation spectrum for gene A of Fx174 grown in *E. coli*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 119-127, 2004.
- RAYET, B.; LOPEZ-GUERRERO, J.A.; ROMMELAERE, J.; DINSART, C. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. **Journal of Virology**, v. 72, p. 8893-8903, 1998.
- RASBECH, N.O. A review of the causes of reproductive failure in swines. **British Veterinary Journal**, v. 125, p. 599-616, 1969.
- RHODE, S.L. Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous system. **Journal of Virology**, v. 4, p. 856-861, 1973.
- RITZMANN, M.; WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; ETSCHMANN, B.; BOGNER, K.H.; SELBITZ, H.J.; HEINRITZI, K.; TRUYEN, U. 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.
- RIVERA, E.; SJÖLAND, L.; KARLSSON, K.A. A solid phase fluorescent immunoassay for the rapid detection of virus antigen or antibodies in fetuses infected with porcine parvovirus. **Archives of Virology**, v. 88, n. 1-2, p. 19-26, 1986.
- RIVERA, E.; CONCHA, C.; BRAGANÇA, M.; GUNNARSSON, A.; KARLSSON, K.A. Acute outbreak of porcine parvovirus infection in Mozambique. **Tropical Animal Health and Production**, v. 27, n. 4, p. 217-220, 1995.
- ROBINSON, B.T.; CARTWRIGHT, S.F.; DANSON, D.L. Porcine parvovirus: a serological survey in the United Kingdom January 1984 to January 1985. **Veterinary Record**, v. 117, p. 611-612, 1985.
- RODRIGUEZ, C.A.R.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, Estado do Pará. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 4, p. 501-503, 2003.
- ROEHE, P.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. Parvovirose. In: SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. (Org.). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cânone editorial. 2007. p. 286-293.
- ROIC, B.; CAJAVEC, S.; ERGOTIC, N.; LIPEJ, Z.; MADIC, J.; LOJKIC, M.; POKRIC, B. Immune complex-based vaccine for pig protection against parvovirus.

Journal of Veterinary Medicine, Infectious Disease and Veterinary Public Health B, v. 53, n. 1, p. 17-23, 2006.

ROS, C.; GERBER, M.; KEMPF, C. Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. **Journal of Virology**, v. 80, p. 12017-12024, 2006.

ROSE, J.A.; BERNS, K.I.; HOGGAN, M.D.; KOCZOT, F.J. Evidence for a single-stranded adenovirus associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 64, p. 863-869, 1969.

ROSSMANN, M.G.; JOHNSON, J.E. Icosahedral RNA virus structure. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 533-573, 1989.

ROSSOW, K.D.; BAUTISTA, E.M.; GOYAL, S.M.; MOLITOR, T.W.; MURTAUGH, M.P.; MORRISON, R.B.; BENFIELD, D.A.; COLLINS, J.E. Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 1, p. 3-12, 1994.

ROTH, J.A. Immune system. In: STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. **Diseases of Swine**. 8.ed. Iowa State University Press: Ames, 1999. p.799-820.

RUEDA, P.; MORÓN, G.; SARRASECA, J.; LECLERC, C.; CASAL, J.I. Influence of flanking sequences on presentation efficiency of a CD8⁺ cytotoxic T-cell epitope delivered by parvovirus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 563-572, 2004.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; CHIANINI, F.; MAJÓ, N.; DOMÍNGUEZ, J.; DARWICH, L.; MATEU, E. Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 151-158, 2004.

SEISENBERGER, G.; RIED, M.U.; ENDRESS, T.; BÜNING, H.; HALLEK, M.; BRÄUCHLE, C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. **Science**, v. 294, p. 1929-1932, 2001.

SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 379-384, 2005.

SHADE, R.O.; BLUNDELL, M.C.; COTMORE, S.R.; TATTERSALL, P.; ASTELL, C.R. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. **Journal of Virology**, v. 58, p. 921-936, 1986.

SHANGJIN, C.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. **Virus Research**, 2009. In press.

SIEGL, G.; BATES, R.C.; BERNS, K.I.; CARTER, B.J.; KELLY, D.C.; KURSTAK, E.; TATTERSALL, P. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. **Intervirology**, v. 23, p. 61-73, 1985.

- SIMPSON, A.A.; HÉBERT, B.; SULLIVAN, G.M.; PARRISH, C.R.; ZÁDORI, Z.; TIJSSEN, P.; ROSSMANN, M. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, p. 1189-1198, 2002.
- SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; MARTINS, V.G.; BACCI, M.; de CAMPOS, F.M.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1505-1515, 2003.
- SOARES, R.M.; DURIGON, E.L.; BERSANO, J.G.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of Virological Methods**, v. 78, n. 1-2, p. 191-198, 1999.
- STAFFORD, K.; STAFFORD, Y.; PATON, D.; GAMBLE, P. Antibodies to some swine diseases in commercial piggeries in Central Zambia. **Revue d Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux**, v. 45, n. 3-4, p. 229-230, 1992.
- STEITZ, T.A. Structural studies of protein-nucleic acid interaction: the sources of sequence-specific binding, **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 23, n. 3, p. 205-280, 1990.
- SUZUKI, H.; FUJISAKI, Y. Immunizing effects of inactivated porcine parvovirus vaccine on piglets. **Bulletin of the National Institute of Animal Health**, v. 72, p. 17-23, 1976.
- TATTERSALL, P.; WARD, D.C. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. **Nature**, v. 263, p. 106-109, 1976.
- THOMSON, G.R.; PEENZE, I. Antibody to porcine parvovirus in warthog (*Phacochoerus aethiopicus*). **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 45-46, 1980.
- THOMSON, G.R.; PROZESKY, L. Porcine parvovirus infection. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Org.). **Infectious Diseases of Livestock**, South Africa: Oxford University Press, 1994, p. 888-894.
- TINSLEY, T.W.; LONGWOTH, J.F. Parvoviruses. **Journal of General Virology**, v. 20, p. 71-76, 1976.
- TIZARD I.R. **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. 6.ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.
- TOMÁS, A.; FERNANDES, L.T.; VALERO, O.; SEGALÉS, J. A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 260-273, 2008.
- TOO, H.L.; SEAMAN, J.T.; LITTLEJOHNS, I.R.; LOVE, R.J. Evaluation of a gel diffusion precipitin test for porcine parvovirus. **Australian Veterinay Journal**, v. 60, n. 6, p. 161-165, 1983.
- TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H.; LAU, M.; SMITH T.J.; ROSSMANN, M.G.; COMPANS, R.W.; PARRISH, C.R. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, v. 251, p. 1456-1464, 1991.
- VALLET, J.L.; FREKING, B.A. Differences in placental structure during gestation associated with large and small pig fetuses. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 12, p. 3267-3275, 2007.

- VENGUST, G.; VALENCAK, Z.; BIDOVEC, A. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia, **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 24-27, 2006.
- VICENTE, J.; LEON-VIZCAINO, L.; GORTAZAR, C.; CUBERO, M.J.; GONZALEZ, M.; MARTIN-ATANCE, P. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, p. 649-652, 2002.
- VIHINEN-RANTA, M.; WANG, D.; WEICHERT, W.S.; PARRISH, C.R. The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. **Journal of Virology**, v. 76, p. 1884–1891, 2002.
- VIHINEN-RANTA, M.; YUAN, W.; PARRISH, C.R. Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. **Journal of Virology**, v. 74, p. 4853-4859, 2000.
- VILLARREAL, L.P.; DE FILIPPIS, V.R. Virus evolution. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Org.). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001, p. 353-370.
- WESTENBRINK, F.; VELDHUIS, M.A.; BRINKHOF, J.M.A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine parvovirus. **Journal Virological Methods**, v. 23, p. 169-178, 1989.
- WHITAKER, H.K.; NEU, S.M.; PACE, L.W. Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p. 244-246, 1990.
- WILHELM, S.; ZEEUW, E.J.L.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Tissue distribution of two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 52, p. 323–326, 2005.
- WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. **Journal of Virological Methods**, v. 134, n. 1-2, p. 257-260, 2006.
- WILLWAND, K.; HIRT, B. The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting. **Journal of Virology**, v. 65, n. 9, p. 4629-4635, 1991.
- WOLF, V.H.G.; MENOSSI, M.; MOURÃO, G.B.; GATTI, M.S.V. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 509-517, 2008.
- WRATHALL, A.E.; WELLS, D.E.; CARTWRIGHT, S.F.; FRERICHS, G.N. An inactivated, oil emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. **Research in Veterinary Science**, v. 36, n. 2, p. 136-143, 1984.
- WU, F.S.; LI, W.G.; FAN, S.H.; WANG, Y.; TANG, G.F. Construction of the pseudorabies virus transfer vector to express porcine parvovirus VP2 gene. **Chinese Henan Agricultural Sciences**, v. 2, p. 102-104, 2006.
- XIA, X.; YUEN, K.Y. Differential selection and mutation between dsDNA and ssDNA phages shape the evolution of their genomic AT percentage. **BioMed Central Genetics**, v. 6, p. 20, 2005.

XIE, Q.; CHAPMAN, M.S. Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 264, p. 497-520, 1996.

YASUHARA, H.; MATSUI, O.; HIRAHARA, T.; OHGTANI, T.; TANAKA, M.L.; KODAMA, K.; NAKAI, M.; SASAKI, N. Characterization of parvovirus isolated from diarrheic feces of a pig. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, p. 337-344, 1989.

YIGANG, X.U.; YIJING, L.I. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. **Immunology**, v. 124, n. 1, p. 68-75, 2008.

YOUNG, G.A.; KITCHELL, R.L.; LUEDKE, A.J.; SAUTTER, J.H. The effect of viral and other infections of the dam on fetal development in swine. I. Modified live hog cholera viruses - immunological, virological, and gross pathological studies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 126, p. 165-171, 1955.

ZÁDORI, Z.; SZELEI, J.; TIJSSSEN, P. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. **Journal of Virology**, v. 79, n. 20, p. 13129–13138, 2005.

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

ZEEUW, E.J.L. **Untersuchung der virulenz und Kreuzneutralisation aktueller Porziner Parvovirus-Isolate**. 2006. 95 f. Tese (Doutorado em Virologia Veterinária) - Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig, 2006.

ZIMMERMANN, P.; RITZMANN, M.; SELBITZ, H. J.; HEINRITZI, K.; TRUYEN, U. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 295-301, 2006.

ZHELEZNAYA, L.A.; PEREVYAZOVA, T.A.; ZHELEZNYAKOVA, E.N.; MATVIENKO, N.I. Some properties of site specific nickase BspD6I and the possibility of its use in hybridization analysis of DNA. **Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 498-502, 2002.

ANEXO 1

Artigo aceito para publicação no periódico *Brazilian Journal of Microbiology*. Este trabalho foi realizado durante o mestrado em paralelo com os de parvovírus suíno, de modo que não compõe o corpo da dissertação.

Title

Detection of canine parvovirus type 2c in Brazil

Authors

André F. Streck; Carine K. Souza; Karla R. Gonçalves; Luciana Zang; Luciane D. Pinto; Cláudio W. Canal

Abstract

The presence of canine parvovirus type 2 (CPV-2), 2a and 2b has been described in Brazil, however, the type 2c had not been reported until now. In the current study, seven out of nine samples from dogs with diarrhea were characterized as CPV-2c, indicating that this virus is already circulating in the Brazilian canine population. The importance of this finding is that a lower protection against CPV by the current vaccines can occur.

Key words

canine parvovirus, CPV-2c, characterization, genetic variability, Brazil.

Título

Detecção de parvovírus canino tipo 2c no Brasil

Resumo

No Brasil, a presença do parvovírus canino do tipo 2 (CPV-2), 2a e 2b já havia sido descrita, contudo, ainda não havia sido verificada a presença do tipo 2c. No presente trabalho, sete de nove amostras de cães com diarreia foram caracterizadas como CPV-2c, indicando que este vírus já está circulando na população canina no Brasil. Este achado é importante na medida em que pode haver uma menor proteção ao CPV pelas vacinas atualmente disponíveis.

Palavras-chave

parvovírus canino, CPV-2c, caracterização, variabilidade genética, Brasil.

Text

The canine parvovirus type 2 (CPV-2) emerged as a novel pathogen in the late 70`s (1) and rapidly spread worldwide. Within few years, the virus underwent a rapid evolution and, new antigenic types, termed CPV-2a and CPV-2b (16, 17), completely replaced the original type 2 (4, 9, 12, 15, 22, 23, 26). In 2001, an antigenic variant was reported in Italy (3). That mutant virus has an amino acid substitution (Asp-426 to Glu-426) in a residue of the capsid protein that is considered antigenically important. This mutant has also been detected in several countries and, recently, it was detected in Uruguay (20). In the last years, serological studies performed in Brazil indicated that CPV frequently infects the canine population (10, 27). However, until now, the CPV-2c has not been reported in Brazil yet.

The emergency and spread of CPV-2c is considered a sanitary threat worldwide. The monitoring of CPV field isolates has been fundamental to understand the virus epidemiology and to develop preventive measures (20). The present communication describes the first record of the CPV-2c detection in Brazil.

Twenty faecal samples from vaccinated and unvaccinated dogs with diarrhea were collected from January to July 2008 in Porto Alegre, Brazil (Table 1). Samples were homogenized (20%, w/v) in PBS (pH 7.4) frozen and defrozen three times and subsequently clarified by centrifuging at 1000 x g for 10 min. DNA was extracted from the supernatants using a protocol based on silica (2). PCR was carried out using primer pair 555for/555rev (3) that amplifies a 583 base pairs (bp) fragment of the VP2 gene (position 4003 to 4585). The positive PCR products were purified with GFX DNA and

Gel Band Purification (Amersham Bioscience, USA) and sequenced by using an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Nucleotide sequences were submitted to GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and their accession numbers are displayed in Table 1. Alignments and sequence analysis were performed using Bioedit software package, version 7.0.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). For sequence comparison, the nucleotide sequence of CPV-2a (DQ340434 and EF375482), CPV-2b (DQ340409) and CPV-2c (EF375479, EF375480, EF375481, AY742942 and AY380577) were retrieved from GenBank. Nucleotide and amino acid positions in this study are referred to strain CPV-2b (accession number M38245).

A single band of the expected size (583 pb) was observed in nine out of the 20 field samples. Sequencing of the amplification products revealed that all had the same nucleotide identity, with exception of two nucleotide sites (Table 1). Seven samples had the presence of a GAA codon at position 426 of the VP protein. This GAA codes for Glutamate, what characterizes the type 2c. The sequence alignment of the Brazilian 2c strains displayed high homology with the 2a strains (99.2% to 99.4%), 2b (99.4%) and 2c (99.6% to 99.8%). One distinct nucleotide in the position 4424 (codon 546) was displayed in the seven 2c strains from Brazil but not in the strains from other countries. This mutation (T to C) corresponds to a transition in the third position of the codon that did not change the amino acid sequence. The other two strains were identified as type 2b and exhibited 100% nucleotide identity with one 2b strain previously described in Brazil (18, 19).

In the present study, seven out of the nine samples were type 2c, indicating that this type was already introduced in Brazil. In the last years, authors from many countries analyzed CPV samples to determine the circulating types, finding a high

frequency of the type 2c (13, 14, 28). One study performed in Uruguay found that 24 out of the 25 CPV strains were type 2c (20). Probably, this new viral type could have some adaptative advantage that leads it to replace the types 2a and 2b (11, 24).

Previously, the canine parvovirus types 2a and 2b had completely replaced the type 2 worldwide. CPV appeared in Brazil around the 80's and this type change was also observed in previous studies (6, 18, 19). The 2c samples analyzed in the present study presented the nucleotide C instead of T in the codon 526. This single nucleotide polymorphism was not displayed in previously reported strains and indicates that, probably, the Brazilian CPV-2c had an independent origin. However, more samples from other geographic regions of the country are necessary to have a more representative figure of the situation.

All the puppies sampled had clinical signs of gastro-enteritis. Differences in clinical signs induced by distinct viral types have been reported (5, 20). The efficiency of the current CPV-2 vaccines against this mutant is another question that must be addressed. There is only one report showing a complete protection by an attenuated vaccine based in other CPV type against challenge by the 2c type (25). On the other hand, there are several works reporting vaccine failures when the challenge virus is from the type 2c (7, 8, 20). Also, in the present study at least three puppies with complete or incomplete vaccination programs presented symptoms of the disease and the CPV found was from type 2c.

This is the first report of the presence of CPV-2c in Brazil. The present study aims to warn the veterinarians about these new threat and possible changes among parvovirus pathology and protection afforded by the current vaccines.

Acknowledgments

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Pró-reitoria de Pesquisa (Propesq/UFRGS). We are also thankful to Simbios Biotecnologia Ltda that kindly supplied de DNA extraction reagents.

References

1. Appel, M.J.; Scott, F.W.; Carmichael, L.E. (1979). Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105, 156-159.
2. Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-van Dillen, P.M.E.; Van der Doordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28 (3), 495-503.
3. Buonavoglia, C.; Martella, V.; Pratelli, A.; Tempesta, M.; Cavalli, A.; Buonavoglia D.; Bozzo, G.; Elia, G.; Decaro, N.; Carmichael, L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021-3025.
4. Buonavoglia, D.; Cavalli, A.; Pratelli, A.; Martella, V.; Greco, G.; Tempesta, M.; Buonavoglia, C. (2000). Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol.* 23, 93-96.
5. Carmichael, L.E. (2005). An annotated historical account of canine parvovirus. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52 (7-8), 303-311.
6. Costa, A.P.; Leite, J.P.G.; Labarthe, N.V.; Cubel Garcia, R.C.N. (2005). Genomic typing of canine parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using Polimerase Chain Reaction assay. *Vet. Res.* 29, 735-743.

7. Decaro, N.; Desario, C.; Elia, G.; Martella, V.; Mari, V.; Lavazza, A.; Nardi, M.; Buonavoglia, C. (2008). Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31 (1), 125-130.
8. Decaro, N.; Desario, C.; Elia, G.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Mari, V.; Martella, V.; Buonavoglia, C. (2007). Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25 (7), 1161-1166.
9. De Ybanez, R.R.; Vela, C.; Cortés, E.; Simarro, I.; Casal, J.I. (1995). Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet. Rec.* 136, 174-175.
10. Dezengrini, R.; Weiblen, R.; Flores, E.F. (2007). Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 37, 183-189.
11. Duffy, S.; Shackelton, L.A.; Holmes, E.C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 9 (4), 267-276.
12. Greenwood, N.M.; Chalmers, W.S.K.; Baxendale, W.; Thompson, H. (1996). Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Vet. Rec.* 138, 495-496.
13. Kapil, S.; Cooper, E.; Lamm, C.; Murray, B.; Rezabek, G.; Johnston, L.; Campbell, G.; Johnson, J. (2007). Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45 (12), 4044-4047.
14. Martella, V.; Decaro, N.; Elia, G.; Buonavoglia, C. (2005). Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 312-315.
15. Mochizuki, M.; Harasawa, R.; Nakatani, H. (1993). Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet. Microbiol.* 38, 1-10.

16. Parrish, C.R.; Have, P.; Foreyt, W.J.; Evermann, J.F.; Senda, M.; Carmichael, L.E. (1988). The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69, 1111-1116.
17. Parrish, C.R.; O'Connell, P.H.; Evermann, J.F.; Carmichael, L.E. (1985). Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230, 1046-1048.
18. Pereira, C.A.; Leal, E.S.; Durigon, E.L. (2007). Selective regimenshift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus. *Infect. Genet. Evol.* 7 (3), 399-409.
19. Pereira, C.A.; Monezi, T.A.; Mehnert, D.U.; D'Angelo, M.; Durigon, E.L. (2000). Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet. Microbiol.* 75, 127-133.
20. Pérez, R.; Francia, L.; Romero, V.; Maya, L.; López, I.; Hernández, M. (2007). First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 124, 147-152.
21. Truyen, U. (2006). Evolution of canine parvovirus: a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9-13.
22. Sagazio, P.; Tempesta, M.; Buonavoglia, D.; Cirone, F; Buonavoglia, C. (1998). Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J. Virol. Methods* 73, 197-200.
23. Senda, M.; Parrish, C.R.; Harasawa, R.; Gamoh, K.; Muramatsu, M.; Hirayama, N.; Itoh, O. (1995). Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 33, 110-113.
24. Shackelton, L.A.; Parrish, C.R.; Truyen, U.; Holmes, E.C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *PNAS* 102, 379-384.

25. Spibey, N.; Greenwood, N.M.; Sutton, D.; Chalmers, W.S.; Tarpey, I. (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* 128 (1-2), 48-55.
26. Steinel, A.; Venter, E.H.; Van Vuuren, M.; Parrish, C.R.; Truyen, U. (1998). Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa. *Vet. Res.* 65, 239-242.
27. Strottmann, D.M.; Scortegagna, G.; Kreutz, L.C.; Barcellos, L.J.G.; Frandoloso, R.; Anziliero, D. (2008). Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 38, 400-405.
28. Vieira, M.J.; Silva, E.; Oliveira, J.; Vieira, A.L.; Decaro, N.; Desario, C.; Muller, A.; Carvalheira, J.; Buonavoglia, C.; Thompson, G. (2008). Canine parvovirus 2c infection in central Portugal. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 488-491.

Table 1. CPV strains analyzed in the present study with the respective nucleotide and amino acid differences in the VP2 sequence and characteristics of their hosts

| Accession number | Breed | Sex | Age | Vaccination program ^a | CPV Type | Codon position and amino acid | | | | | |
|------------------|-----------------|-----|-----|----------------------------------|----------|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | | | | 426 | 430 (Leu) | 452 (Gly) | 491 (Gln) | 546 (Asn) | 555 (Val) |
| EU797726 | Undefined | ♂ | 5 m | None | 2c | GAA (Glu) | TTG | GGT | CAA | AAC | GTA |
| EU797727 | German shepherd | ♀ | 4 m | Complete | 2c | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| EU797728 | Undefined | ♀ | ND | None | 2c | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| FJ236063 | German shepherd | ♀ | 3 m | Incomplete | 2c | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| FJ236064 | Pinscher | ♀ | 2 m | Incomplete | 2c | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| FJ236065 | NA | NA | 2 m | NA | 2c | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| FJ236066 | NA | NA | 2 m | NA | 2c | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| FJ236067 | NA | NA | 6 m | NA | 2b | GAT (Asp) | ... | ... | ... | ..T | ... |
| FJ236068 | NA | ♀ | NA | NA | 2b | GAT (Asp) | ... | ... | ... | ..T | ... |

^a Complete vaccination program was considered at least three doses of CPV vaccine.

ANEXO 2

Tabela contendo a identificação da origem das amostras de soro de leitão (saudável ou refugo) e resultado da nested-PCR.

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| I97 | a | A | 1 | saudável | + |
| I98 | a | A | 1 | saudável | + |
| I99 | a | A | 1 | saudável | + |
| I100 | a | A | 1 | saudável | - |
| I101 | a | A | 1 | saudável | - |
| I102 | a | A | 1 | saudável | - |
| I103 | a | A | 1 | saudável | - |
| I104 | a | A | 1 | saudável | - |
| I105 | a | A | 1 | saudável | + |
| I106 | a | A | 1 | saudável | - |
| I107 | a | A | 1 | saudável | + |
| I108 | a | A | 1 | saudável | - |
| I109 | a | A | 1 | saudável | - |
| I110 | a | A | 1 | saudável | - |
| I111 | a | A | 1 | saudável | - |
| I112 | a | A | 1 | saudável | - |
| I113 | a | A | 1 | saudável | - |
| I114 | a | A | 1 | saudável | - |
| I115 | a | A | 1 | saudável | - |
| I116 | a | A | 1 | saudável | - |
| I117 | a | A | 1 | saudável | - |
| I118 | a | A | 1 | saudável | - |
| I119 | a | A | 1 | saudável | - |
| I120 | a | A | 1 | saudável | - |
| I121 | a | A | 1 | saudável | - |
| I122 | a | A | 1 | saudável | - |
| I123 | a | A | 1 | saudável | - |
| I124 | a | A | 1 | saudável | - |
| I125 | a | A | 1 | saudável | + |
| I126 | a | A | 1 | saudável | - |
| I127 | a | A | 1 | saudável | - |
| I128 | a | A | 1 | saudável | - |
| I129 | a | A | 1 | saudável | - |
| I130 | a | A | 1 | saudável | - |
| I131 | a | A | 1 | saudável | - |
| I132 | a | A | 1 | saudável | - |
| I133 | a | A | 1 | saudável | - |
| I134 | a | A | 1 | saudável | + |
| I135 | a | A | 1 | saudável | - |
| I136 | a | A | 1 | saudável | - |
| I137 | a | A | 1 | saudável | - |
| I138 | a | A | 1 | saudável | - |
| I139 | a | A | 1 | saudável | - |
| I140 | a | A | 1 | saudável | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| I141 | a | A | 1 | saudável | - |
| I142 | a | A | 1 | saudável | + |
| I143 | a | A | 1 | saudável | - |
| I144 | a | A | 1 | saudável | - |
| I145 | a | A | 1 | saudável | - |
| I146 | a | A | 1 | saudável | - |
| I147 | a | A | 1 | saudável | - |
| I148 | a | A | 1 | saudável | + |
| I149 | a | A | 1 | saudável | - |
| I150 | a | A | 1 | saudável | - |
| I151 | a | A | 1 | saudável | - |
| I152 | a | A | 1 | saudável | - |
| I153 | a | A | 1 | saudável | - |
| I154 | a | A | 1 | saudável | + |
| I155 | a | A | 1 | saudável | - |
| I156 | a | A | 1 | saudável | - |
| I157 | a | A | 1 | saudável | + |
| I158 | a | A | 1 | saudável | - |
| I159 | a | A | 1 | saudável | + |
| I160 | a | A | 1 | saudável | - |
| I161 | a | A | 1 | saudável | - |
| I162 | a | A | 1 | saudável | - |
| I163 | a | A | 1 | saudável | - |
| I164 | a | A | 1 | saudável | - |
| I165 | a | A | 1 | saudável | - |
| I166 | a | A | 1 | saudável | - |
| I167 | a | A | 1 | saudável | + |
| I168 | a | A | 1 | saudável | - |
| I169 | a | A | 1 | saudável | - |
| I170 | a | A | 1 | saudável | - |
| I171 | a | A | 1 | saudável | - |
| I172 | a | A | 1 | saudável | - |
| I173 | a | A | 1 | saudável | - |
| I174 | a | A | 1 | saudável | - |
| I175 | a | A | 1 | saudável | - |
| I176 | a | A | 1 | saudável | - |
| I177 | a | A | 1 | saudável | - |
| I178 | a | A | 1 | saudável | - |
| I179 | a | A | 1 | saudável | - |
| I180 | a | A | 1 | saudável | - |
| I181 | a | A | 1 | saudável | + |
| I182 | a | A | 1 | saudável | - |
| I183 | a | A | 1 | saudável | - |
| I184 | a | A | 1 | saudável | - |
| I185 | a | A | 1 | saudável | - |
| I186 | a | A | 1 | saudável | - |
| I187 | a | A | 1 | saudável | - |
| I188 | a | A | 1 | saudável | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| I189 | a | A | 1 | saudável | - |
| I190 | a | A | 1 | saudável | - |
| I191 | a | A | 1 | saudável | - |
| I192 | a | A | 1 | saudável | - |
| I193 | a | A | 1 | saudável | - |
| I194 | a | A | 1 | saudável | - |
| I195 | a | A | 1 | saudável | - |
| I196 | a | A | 1 | saudável | - |
| I197 | a | A | 1 | saudável | - |
| I198 | a | A | 1 | saudável | - |
| I199 | a | A | 1 | saudável | - |
| I200 | a | A | 1 | saudável | - |
| I201 | a | A | 1 | saudável | - |
| A1 | b | B | 2 | saudável | - |
| A2 | b | B | 2 | saudável | + |
| A3 | b | B | 2 | saudável | + |
| A4 | b | B | 2 | saudável | + |
| A5 | b | B | 2 | saudável | - |
| A6 | b | B | 2 | saudável | - |
| A7 | b | B | 2 | saudável | + |
| A8 | b | B | 2 | saudável | - |
| A9 | b | B | 2 | saudável | - |
| A10 | b | B | 2 | saudável | - |
| A11 | b | B | 2 | saudável | - |
| A12 | b | B | 2 | saudável | - |
| A13 | b | B | 2 | saudável | - |
| A14 | b | B | 2 | saudável | - |
| A15 | b | B | 2 | saudável | - |
| A16 | b | B | 2 | saudável | - |
| A17 | b | B | 2 | saudável | - |
| A18 | b | B | 2 | saudável | - |
| A19 | b | B | 2 | saudável | + |
| A20 | b | B | 2 | saudável | + |
| A21 | b | B | 2 | saudável | - |
| A22 | b | B | 2 | saudável | + |
| A23 | B | B | 2 | saudável | + |
| A24 | B | B | 2 | saudável | + |
| A25 | B | B | 2 | saudável | - |
| A26 | B | B | 2 | saudável | - |
| A27 | B | B | 2 | saudável | - |
| A28 | B | B | 2 | saudável | - |
| A29 | B | B | 2 | saudável | + |
| A30 | B | B | 2 | saudável | - |
| A31 | B | B | 2 | saudável | - |
| A32 | B | B | 2 | saudável | - |
| A33 | B | B | 2 | saudável | - |
| A34 | B | B | 2 | saudável | - |
| A35 | B | B | 2 | saudável | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| A36 | B | B | 2 | saudável | - |
| A37 | B | B | 2 | saudável | - |
| A39 | B | B | 2 | saudável | - |
| A41 | B | B | 2 | saudável | - |
| A43 | B | B | 2 | saudável | - |
| A45 | b | B | 2 | saudável | + |
| A47 | b | B | 2 | saudável | - |
| A49 | b | B | 2 | saudável | - |
| A51 | b | B | 3 | saudável | + |
| A52 | b | B | 3 | saudável | - |
| A54 | b | B | 3 | saudável | - |
| A55 | b | B | 3 | saudável | - |
| A56 | b | B | 3 | saudável | - |
| A58 | b | B | 3 | saudável | - |
| A59 | b | B | 3 | saudável | - |
| A60 | b | B | 3 | saudável | - |
| A62 | b | B | 3 | saudável | + |
| A63 | b | B | 3 | saudável | - |
| A67 | b | B | 3 | saudável | - |
| A69 | b | B | 3 | saudável | - |
| A71 | b | B | 3 | saudável | - |
| A74 | b | B | 3 | saudável | - |
| A76 | b | B | 3 | saudável | - |
| A78 | b | B | 3 | saudável | - |
| A84 | b | B | 3 | saudável | ND |
| A85 | b | B | 3 | saudável | - |
| A86 | b | B | 3 | saudável | - |
| A87 | b | B | 3 | saudável | - |
| A89 | b | B | 3 | saudável | ND |
| A93 | b | B | 3 | saudável | - |
| A96 | b | B | 3 | saudável | - |
| A121 | b | B | 3 | saudável | - |
| A122 | b | B | 3 | saudável | - |
| A123 | b | B | 3 | saudável | - |
| A127 | b | B | 3 | saudável | - |
| A129 | b | B | 3 | saudável | - |
| A130 | b | B | 3 | saudável | - |
| A131 | b | B | 3 | saudável | - |
| A134 | b | B | 3 | saudável | - |
| A136 | b | B | 3 | saudável | - |
| A140 | b | B | 3 | saudável | ND |
| A142 | b | B | 3 | saudável | - |
| A144 | b | B | 3 | saudável | - |
| A146 | b | B | 3 | saudável | ND |
| A147 | b | B | 3 | saudável | - |
| A150 | b | B | 3 | saudável | - |
| A155 | b | B | 3 | saudável | - |
| A156 | b | B | 3 | saudável | ND |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| A160 | b | B | 3 | saudável | - |
| A164 | b | B | 3 | saudável | + |
| A165 | b | B | 3 | saudável | - |
| A97 | b | B | 4 | refugo | - |
| A98 | b | B | 4 | refugo | - |
| A99 | b | B | 4 | refugo | - |
| A101 | b | B | 4 | refugo | + |
| A102 | b | B | 4 | refugo | - |
| A103 | b | B | 4 | refugo | - |
| A104 | b | B | 4 | refugo | - |
| A105 | b | B | 4 | refugo | + |
| A106 | b | B | 4 | refugo | - |
| A107 | b | B | 4 | refugo | - |
| A108 | b | B | 4 | refugo | - |
| A109 | b | B | 4 | refugo | - |
| A110 | b | B | 4 | refugo | - |
| A111 | b | B | 4 | refugo | + |
| A112 | b | B | 4 | refugo | - |
| A113 | b | B | 4 | refugo | - |
| A114 | b | B | 4 | refugo | - |
| A115 | b | B | 4 | refugo | + |
| A116 | b | B | 4 | refugo | - |
| A118 | b | B | 4 | refugo | - |
| A119 | b | B | 4 | refugo | - |
| A120 | b | B | 4 | refugo | - |
| A200 | b | B | 4 | refugo | - |
| A201 | b | B | 4 | refugo | - |
| A203 | b | B | 4 | refugo | - |
| A204 | b | B | 4 | refugo | - |
| A205 | b | B | 4 | refugo | + |
| A206 | b | B | 4 | refugo | - |
| A207 | b | B | 4 | refugo | - |
| A209 | b | B | 4 | refugo | - |
| A210 | b | B | 4 | refugo | + |
| A211 | b | B | 4 | refugo | - |
| A212 | b | B | 4 | refugo | - |
| A213 | b | B | 4 | refugo | - |
| A220 | b | B | 4 | refugo | - |
| A221 | b | B | 4 | refugo | - |
| A222 | b | B | 4 | refugo | - |
| A223 | b | B | 4 | refugo | - |
| A225 | b | B | 4 | refugo | - |
| A226 | b | B | 4 | refugo | - |
| A227 | b | B | 4 | refugo | - |
| A228 | b | B | 4 | refugo | - |
| A229 | b | B | 4 | refugo | + |
| D01 | c | C | 5 | refugo | - |
| D02 | c | C | 5 | refugo | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| D03 | c | C | 5 | refugo | - |
| D04 | c | C | 5 | refugo | - |
| D05 | c | C | 5 | refugo | - |
| D06 | c | C | 5 | refugo | - |
| D07 | c | C | 5 | refugo | - |
| D08 | c | C | 5 | refugo | - |
| D09 | c | D | 6 | refugo | + |
| D10 | c | D | 6 | refugo | - |
| D11 | c | D | 6 | refugo | - |
| D12 | c | D | 6 | refugo | + |
| D13 | c | D | 6 | refugo | - |
| D14 | c | D | 6 | refugo | - |
| D15 | c | D | 6 | refugo | - |
| D16 | c | E | 7 | refugo | - |
| D17 | c | E | 7 | refugo | - |
| D18 | c | E | 7 | refugo | - |
| D19 | c | E | 7 | refugo | - |
| D20 | c | E | 7 | refugo | + |
| D21 | c | E | 7 | refugo | - |
| D22 | c | E | 7 | refugo | - |
| D23 | c | E | 7 | refugo | - |
| D24 | c | F | 8 | refugo | - |
| D25 | c | F | 8 | refugo | - |
| D26 | c | F | 8 | refugo | + |
| D27 | c | F | 8 | refugo | - |
| D28 | c | F | 8 | refugo | - |
| D29 | c | F | 8 | refugo | - |
| D32 | c | G | 9 | refugo | - |
| D33 | c | G | 9 | refugo | - |
| D34 | c | G | 9 | refugo | - |
| D35 | c | G | 9 | refugo | - |
| D36 | c | G | 9 | refugo | - |
| D37 | c | G | 9 | refugo | + |
| D38 | c | H | 10 | refugo | - |
| D39 | c | H | 10 | refugo | + |
| D40 | c | H | 10 | refugo | - |
| D41 | c | H | 10 | refugo | - |
| D42 | c | H | 10 | refugo | + |
| D43 | c | H | 10 | refugo | - |
| D44 | c | H | 10 | refugo | - |
| D45 | c | H | 10 | refugo | - |
| S01 | d | I | 11 | refugos | + |
| S02 | d | I | 11 | refugos | - |
| S03 | d | I | 11 | refugos | - |
| S04 | d | I | 11 | refugos | - |
| S05 | d | I | 11 | refugos | - |
| S06 | d | I | 11 | refugos | - |
| S07 | d | I | 11 | refugos | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | Condição de saúde | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|-------------------|-------------------------|
| S08 | d | I | 11 | refugos | - |
| S09 | d | I | 11 | refugos | - |
| S10 | d | I | 11 | refugos | - |
| S11 | d | I | 11 | refugos | + |
| S12 | d | I | 11 | refugos | + |
| S13 | d | I | 11 | refugos | - |
| S14 | d | I | 11 | refugos | - |
| S15 | d | I | 11 | refugos | - |
| S16 | d | I | 11 | refugos | - |
| S17 | d | J | 12 | refugos | - |
| S18 | d | J | 12 | refugos | - |
| S19 | d | J | 12 | refugos | - |
| S20 | d | J | 12 | refugos | - |
| S21 | d | J | 12 | refugos | - |
| S22 | d | J | 12 | refugos | - |
| S23 | d | J | 12 | refugos | - |
| S24 | d | J | 12 | refugos | + |
| S25 | d | J | 12 | refugos | - |
| S26 | d | J | 12 | refugos | - |
| S27 | d | K | 13 | refugos | - |
| S28 | d | K | 13 | refugos | + |
| S29 | d | K | 13 | refugos | + |
| S30 | d | K | 13 | refugos | + |
| S31 | d | K | 13 | refugos | + |
| S32 | d | K | 13 | refugos | - |
| S33 | d | K | 13 | refugos | - |
| S34 | d | K | 13 | refugos | + |
| S35 | d | K | 13 | refugos | - |
| S36 | d | K | 13 | refugos | + |
| S37 | d | L | 14 | refugos | - |
| S38 | d | L | 14 | refugos | - |
| S39 | d | L | 14 | refugos | - |
| S40 | d | L | 14 | refugos | - |
| S41 | d | L | 14 | refugos | - |
| S42 | d | L | 14 | refugos | - |
| S43 | d | L | 14 | refugos | - |
| S44 | d | L | 14 | refugos | - |
| S45 | d | L | 14 | refugos | - |
| S46 | d | L | 14 | refugos | - |

ANEXO 3

Tabela contendo a identificação e origem das amostras de soros de fêmeas em distintas ordens de parto (OP), com os respectivos resultados do teste de HI (título e logaritmo) e da nested-PCR.

| Amostra | Companhia | Município | Granja | OP | Título do HI | Log ₂ X do HI | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|----|--------------|--------------------------|-------------------------|
| I01 | a | M | 15 | 1 | 4096 | 12 | + |
| I03 | a | M | 15 | 2 | 256 | 8 | - |
| I05 | a | M | 15 | 3 | 4096 | 12 | - |
| I06 | a | M | 15 | 3 | 2048 | 11 | - |
| I07 | a | M | 15 | 4 | 4096 | 12 | - |
| I08 | a | M | 15 | 5 | 4096 | 12 | - |
| I09 | a | M | 15 | 8 | 4096 | 12 | - |
| I10 | a | M | 15 | 9 | 2048 | 11 | + |
| I11 | a | N | 16 | 7 | 512 | 9 | - |
| I12 | a | N | 16 | 5 | 128 | 7 | - |
| I13 | a | N | 16 | 2 | 256 | 8 | - |
| I16 | a | N | 16 | 1 | 64 | 6 | - |
| I17 | a | N | 16 | 1 | 4096 | 12 | - |
| I19 | a | N | 16 | 3 | 2048 | 11 | + |
| I20 | a | N | 16 | 4 | 4096 | 12 | + |
| I21 | a | N | 17 | 1 | 128 | 7 | - |
| I22 | a | N | 17 | 1 | 64 | 6 | - |
| I23 | a | N | 17 | 3 | 512 | 9 | - |
| I24 | | N | 17 | 3 | 2048 | 11 | - |
| I25 | a | N | 17 | 4 | 4096 | 12 | - |
| I26 | a | N | 17 | 5 | 2048 | 11 | - |
| I27 | a | N | 17 | 4 | 2048 | 11 | + |
| I28 | a | N | 17 | 4 | 4096 | 12 | - |
| I29 | a | N | 17 | 5 | 8192 | 13 | - |
| I30 | a | N | 17 | 7 | 1024 | 10 | - |
| I31 | a | O | 18 | 5 | 512 | 9 | - |
| I32 | a | O | 18 | 3 | 128 | 7 | - |
| I33 | a | O | 18 | 3 | 512 | 9 | - |
| I35 | a | O | 18 | 4 | 128 | 7 | + |
| I34 | a | O | 18 | 8 | ND | ND | - |
| I36 | a | O | 18 | 1 | 32 | 5 | - |
| I37 | a | O | 18 | 1 | 32 | 5 | - |
| I38 | a | O | 18 | 1 | 512 | 9 | - |
| I39 | a | O | 18 | 8 | 128 | 7 | - |
| I40 | a | O | 18 | 3 | 32 | 5 | - |
| I41 | a | O | 19 | 1 | 32 | 5 | - |
| I42 | a | O | 19 | 1 | 64 | 6 | + |
| I43 | a | O | 19 | 2 | 512 | 9 | + |
| I44 | a | O | 19 | 3 | 2048 | 11 | + |
| I45 | a | O | 19 | 4 | 4096 | 12 | - |
| I46 | a | O | 19 | 4 | 256 | 8 | - |
| I47 | a | O | 19 | 2 | 64 | 6 | - |
| I48 | a | O | 19 | 2 | 128 | 7 | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | OP | Título do HI | Log ₂ X do HI | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|----|--------------|--------------------------|-------------------------|
| I49 | a | O | 19 | 1 | 64 | 6 | + |
| I50 | a | O | 19 | 5 | 2048 | 11 | + |
| I51 | a | O | 20 | 1 | 64 | 6 | - |
| I52 | a | O | 20 | 9 | 1024 | 10 | - |
| I53 | a | O | 20 | 4 | 256 | 8 | + |
| I54 | a | O | 20 | 5 | 256 | 8 | - |
| I55 | a | O | 20 | 8 | 256 | 8 | - |
| I56 | a | O | 20 | 7 | 4096 | 12 | - |
| I57 | a | O | 20 | 8 | 2048 | 11 | - |
| I58 | a | O | 20 | 2 | 64 | 6 | - |
| I59 | a | O | 20 | 5 | 1024 | 10 | - |
| I60 | a | O | 20 | 5 | 128 | 7 | - |
| I61 | a | O | 21 | 5 | 2048 | 11 | + |
| I62 | a | O | 21 | 2 | 4096 | 12 | - |
| I63 | a | O | 21 | 6 | 512 | 9 | - |
| I64 | a | O | 21 | 1 | 32 | 5 | - |
| I65 | a | O | 21 | 4 | 4096 | 12 | - |
| I66 | a | O | 21 | 3 | 4096 | 12 | - |
| I67 | a | O | 21 | 5 | 2048 | 11 | - |
| I68 | a | O | 21 | 7 | ND | ND | - |
| I69 | a | O | 21 | 5 | 512 | 9 | + |
| I70 | a | O | 21 | 5 | ND | ND | - |
| I71 | a | O | 22 | 1 | 128 | 7 | - |
| I72 | a | O | 22 | 1 | 2048 | 11 | - |
| I73 | a | O | 22 | 2 | 128 | 7 | - |
| I74 | a | O | 22 | 2 | 32 | 5 | - |
| I75 | a | O | 22 | 3 | 512 | 9 | - |
| I76 | a | O | 22 | 6 | 512 | 9 | - |
| I77 | a | O | 22 | 4 | 512 | 9 | - |
| I78 | a | O | 22 | 7 | 128 | 7 | - |
| I79 | a | O | 22 | 5 | 256 | 8 | + |
| I80 | a | O | 22 | 5 | 64 | 6 | - |
| I81 | a | O | 23 | 3 | 256 | 8 | - |
| I82 | a | O | 23 | 4 | 512 | 9 | + |
| I83 | a | O | 23 | 8 | 128 | 7 | - |
| I84 | a | O | 23 | 1 | 32 | 5 | - |
| I85 | a | O | 23 | 5 | 32 | 5 | - |
| I86 | a | O | 23 | 1 | ND | ND | + |
| I87 | a | O | 23 | 5 | 64 | 6 | - |
| I88 | a | O | 23 | 2 | 32 | 5 | - |
| I90 | a | O | 24 | 3 | 1024 | 10 | - |
| I91 | a | O | 24 | 5 | 2048 | 11 | - |
| I92 | a | O | 24 | 1 | 1024 | 10 | - |
| I93 | a | O | 24 | 2 | 1024 | 10 | - |
| I94 | a | O | 24 | 4 | 32 | 5 | - |
| I95 | a | O | 24 | 7 | 4096 | 12 | + |
| I96 | a | O | 24 | 5 | 512 | 9 | - |
| I203 | a | O | 26 | 2 | 8192 | 13 | - |

continua na próxima página

continuação...

| Amostra | Companhia | Município | Granja | OP | Título do HI | Log ₂ X do HI | Resultado da nested-PCR |
|---------|-----------|-----------|--------|----|--------------|--------------------------|-------------------------|
| I204 | a | O | 26 | 3 | 8192 | 13 | - |
| I205 | a | O | 26 | 7 | 256 | 8 | - |
| I206 | a | O | 26 | 6 | 16384 | 14 | + |
| I207 | a | O | 26 | 1 | 4096 | 12 | - |
| I208 | a | O | 26 | 4 | 8196 | 13 | + |
| I209 | a | O | 26 | 2 | 1024 | 10 | - |
| I210 | a | O | 26 | 2 | 512 | 9 | + |
| I211 | a | O | 26 | 5 | 16384 | 14 | + |
| I212 | a | O | 26 | 1 | 8192 | 13 | - |
| I213 | a | O | 27 | ND | ND | ND | - |
| I214 | a | O | 27 | 2 | 8192 | 13 | - |
| I215 | a | O | 27 | 5 | 1024 | 10 | - |
| I216 | a | O | 27 | ND | ND | ND | - |
| I217 | a | O | 27 | 1 | 2048 | 11 | - |
| I218 | a | O | 27 | 1 | 4096 | 12 | + |
| I219 | a | O | 27 | 4 | 2048 | 11 | - |
| I220 | a | O | 27 | 5 | 8192 | 13 | - |
| I221 | a | O | 27 | 4 | 4096 | 12 | - |
| I222 | a | O | 27 | 5 | 4096 | 12 | - |
| P1 | E | P | 25 | 6 | 1024 | 10 | - |
| P2 | E | P | 25 | 5 | 4096 | 12 | - |
| P3 | E | P | 25 | 2 | 4096 | 12 | - |
| P4 | E | P | 25 | 1 | 4096 | 12 | - |
| P5 | E | P | 25 | 2 | 8192 | 13 | - |
| P6 | e | P | 25 | 1 | 8192 | 13 | - |
| P7 | e | P | 25 | 2 | 4096 | 12 | - |
| P8 | e | P | 25 | 3 | 8192 | 13 | - |
| P9 | e | P | 25 | 3 | 256 | 8 | - |
| P10 | e | P | 25 | 2 | 4096 | 12 | - |
| P11 | e | P | 25 | 4 | 2048 | 11 | - |
| P12 | e | P | 25 | 4 | 4096 | 12 | - |
| P13 | e | P | 25 | 4 | 8192 | 13 | - |
| P14 | e | P | 25 | 2 | 16384 | 14 | - |
| P15 | e | P | 25 | 4 | 2048 | 11 | - |
| P16 | e | P | 25 | 2 | 512 | 9 | - |
| P17 | e | P | 25 | 2 | 8192 | 13 | - |
| P18 | e | P | 25 | 1 | 8192 | 13 | - |
| P19 | e | P | 25 | 2 | 8192 | 13 | - |
| P20 | e | P | 25 | 6 | 512 | 9 | - |