

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

**DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS E ESTUDO DE CO-INFECÇÕES POR VÍRUS DE
SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado

CARINE KUNZLER SOUZA

Porto Alegre

2011

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

**DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS E ESTUDO DE CO-INFECÇÕES POR VÍRUS DE
SUÍNOS**

Carine Kunzler Souza

Carine Kunzler Souza

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestre em
Ciências Veterinárias, especialidade Virologia.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Co-orientador: Prof. Dr. Nilo Ikuta**

Porto Alegre

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARINE KUNZLER SOUZA

**DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS E ESTUDO DE CO-INFECÇÕES POR VÍRUS DE
SUÍNOS**

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

Dra. Janice Reis Ciacci Zanella
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Porto Alegre
2011

Carine Kunzler Souza

DIAGNÓSTICO DE PARVOVIRUS POR PCR EM TEMPO REAL E ESTUDO DE CO-
INFECCÕES POR VÍRUS DE SUÍNOS

25 MAR 2011

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Dra. Janice Reis Ciacci Zanella
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio, paciência, compreensão e palavras de incentivos que ajudaram a completar mais esta etapa da minha vida, sem vocês não sou ninguém.

À Bárbara, minha irmã e colega de profissão, que sempre esteve presente em todos os momentos durante o mestrado me incentivando e ajudando, muito obrigada por tudo. Também agradeço ao Diego, o meu “irmão emprestado” que sempre esteve presente me incentivando, muito obrigado!

Ao Prof. Cláudio Wageck Canal, pela oportunidade, orientação, correções, auxílio com seu conhecimento.

Ao Prof. Nilo Ikuta, pela oportunidade de trabalhamos juntos, orientação, correções e todos os ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento na pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Virologia que me apoiaram e me acompanharam no mestrado, em especial a Danielle, a Ângela, a Luciane, a Kaká, a Renata, o Matheus e o André pelas correções, ajuda, paciência, amizade e pelos ensinamentos oferecidos.

Às colegas do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, a Eliana e a Eloiza pela amizade e companheirismo, em especial à Helena que sempre esteve disponível me ensinando e ajudando nas filogenias e clonagens.

Às técnicas, Yara e Fabrícia e as pesquisadoras, Ana Paula, Beatriz e Fernanda, da Simbios Biotecnologia, que me ensinaram e sempre me ajudaram muito nos experimentos.

À Simbios Biotecnologia por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular para realização dos experimentos com a PCR em tempo real.

Ao Rodrigo, por estar presente nos momentos em que mais precisei, pela paciência que teve comigo nesta etapa, não sabe o quanto você é importante para mim.

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

A todos os amigos que estiveram comigo durante o mestrado, muito obrigado a todos!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação tridimensional da estrutura do capsídeo do PPV1.....	15
FIGURA 2 - Microscopia eletrônica do FPLV.....	16
FIGURA 3 - Esquema representativo da organização gênica do PPV1.....	19
FIGURA 4 - Leitegada com natimortos e fetos mumificados de diferentes tamanhos.....	22
FIGURA 5 - Seis camadas da barreira transplacentária que separam a circulação fetal e maternal.....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Histórico.....	13
2.2 Caracterização do vírus	14
2.3 Organização gênica e replicação.....	16
2.4 Epidemiologia	19
2.5 Patogenia	21
2.6 Imunidade.....	24
2.7 Diagnóstico	26
2.8 Controle.....	29
2.9 Relação do PPV1 com outros vírus.....	30
3. ARTIGO 1	35
4. ARTIGO 2	51
5. DISCUSSÃO GERAL.....	74
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	80
ANEXO 1	101

RESUMO

A parvovirose suína está mundialmente distribuída tornando-se responsável por expressivas perdas econômicas devido aos problemas reprodutivos. O presente trabalho teve como objetivo realizar a padronização da PCR em tempo real (qPCR) utilizando sonda TaqMan para detecção e quantificação de parvovirus suíno 1 (PPV1) em amostras de soro, baseado na região do gene NS1. A especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade e quantificação da qPCR foram avaliadas e a casuística foi comparada com a nested PCR (nPCR). A curva padrão da qPCR apresentou linearidade de 6×10^6 cópias genômicas/mL (gce/mL) a 2×10^3 gce/mL, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,98. No teste de especificidade, a qPCR não apresentou valores de Cycle threshold (Ct) nos patógenos do grupo de exclusão (circovirus suíno tipo 2, parvovirus canino, vírus da panleucopenia felina, Erisipela e Leptospirose). Todas as cepas de PPV1 testadas apresentaram fluorescência, demonstrando uma especificidade de 100%. Comparando as duas técnicas, 11 amostras foram positivas em ambos os testes e a nPCR detectou quatro amostras a mais do que a qPCR. A concordância, sensibilidade e especificidade entre as técnicas foi de 98%, 73% e 100%, respectivamente. Portanto, a nPCR apresentou maior sensibilidade, no entanto, a qPCR poderá ser utilizada no diagnóstico e quantificação de PPV1, podendo auxiliar em estudos de viremia, epidemiologia e monitoramento do vírus nas granjas. No segundo estudo, foi realizada a detecção por PCR de circovírus suíno tipo 2 (PCV2), PPV1, parvovírus suíno tipo 2, torque teno vírus suíno 1 e 2 (TTV1 e TTV2) e hokovirus suíno (PHoV) em *pools* de órgãos (linfonodos, pulmões, fígado, baço e rim) de leitões apresentando a Síndrome Multissistêmica do Definhamento Suíno (PMWS). Todas as amostras foram PCR positivas para PCV2 e os outros vírus foram detectados em todos os rebanhos, com exceção do TTV1. As amostras também foram positivas na PCR para PPV1 (81,6%), PPV2 (73,7%), TTV1 (5,3%), TTV2 (86,8%) e PHoV (55,3%). Os resultados indicam que leitões com PMWS e infectados com PCV2 apresentaram co-infecções com outras espécies de parvovirus e anelovirus, que podem estar envolvidos na apresentação da PMWS. Devido às poucas informações sobre a variabilidade genética do PHoV, oito fragmentos sobrepostos da região VP1/VP2 de quatro amostras foram amplificados e sequenciados. Na análise filogenética, as amostras brasileiras de PHoV apresentaram-se mais estreitamente relacionadas às amostras européias. O presente trabalho relata a

primeira detecção de PPV2 e PHoV em co-infecções com PCV2 e a primeira caracterização genética de amostras de PHoV no Brasil.

ABSTRACT

Porcine parvovirus 1 (PPV1) has worldwide distribution and causes an important reproductive losses. The present dissertation was performed to develop a real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) using a TaqMan probe based on NS1 gene to detect and quantify PPV1 in serum samples. The specificity, sensitivity, reproducibility and quantitative range of the real time PCR were evaluated and compared with conventional nested PCR (nPCR). The standard curve of real-time PCR was linear ranging from 6×10^6 genome copies equivalent/mL (gce/mL) to 2×10^3 gce/mL with a square of the correlation coefficient (R^2 value) of 0.98. No cross-reactivity was detected with closely related parvovirus or with viruses that causes similar symptoms and all PPV1 strains showed fluorescence in the assay. Comparing these techniques, 11 samples were positive in both tests and nPCR detected four additional samples. The concordance, sensitivity and specificity between the techniques were 98%, 73% and 100%, respectively. In conclusion, nPCR showed more sensitivity, however, real-time PCR could be a useful tool for diagnosis and quantification of PPV1 in serum samples and can be used for viremia studies, epidemiology and monitoring PPV1 infection in swine herds. The second study was performed in order to detect porcine circovirus 2 (PCV2), PPV1, porcine parvovirus 2, torque teno virus 1 and 2 (TTV1 and TTV2) and porcine hokovirus (PHoV) in different pooled tissues (lymph nodes, lungs, liver, spleen and kidneys) of piglets displaying Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by PCR. All the samples were PCR positive for PCV2 and the other viruses were detected in all herds, with the exception of TTV1. The samples were positive for TTV2 (86.8%), PPV1 (81.6%), PPV2 (73.7%), PHoV (55.3%) and TTV1 (5.3%). These results showed that piglets displaying PMWS and infected with PCV2 presented co-infections with other virus, which could be involved in the syndrome. Since there are few data about genetic variability of PHoV, eight overlapping fragments of VP1/VP2 region of PHoV were amplified and. In phylogenetic analysis, Brazilian PHoV sequences were more closely related to European sequences. The results indicate that piglets displaying PMWS are PCV2 infected and can be co-infected with different parvovirus and circovirus species.

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura mundial vem crescendo a cada ano em vários países, representando uma importante atividade econômica. Os Estados Unidos, a União Européia, o Canadá, o Brasil e a China são responsáveis por 96% das exportações mundiais e o nosso País é o quarto maior produtor e exportador de carne suína. Em 2010, o Brasil totalizou com a exportação de 504.889 mil toneladas de carne suína obtendo uma receita de US\$ 1,25 bilhão de dólares (ABIPECS, 2010). Neste contexto, o cuidado com a sanidade e medidas de manejo nas criações comerciais são fatores fundamentais para manter a competitividade no mercado mundial. Atualmente, as principais doenças que acometem os rebanhos suínos são problemas frequentes que afetam o desempenho dos animais e causam prejuízos na produção (ROEHE et al., 2007). Assim, é importante realizar o diagnóstico eficiente e controle das doenças causadas por viroses ou por outros agentes patogênicos que atuam concomitantemente, pois representam um elevado risco para a produção de suínos.

A parvovirose suína tem ocorrência mundial e é uma das principais doenças que causam perdas reprodutivas ocasionando altos índices de retorno ao cio, atraso na data de parição, fetos mumificados, natimortos e leitegadas fracas (MENGELING e CUTLIP, 1976). O parvovírus suíno 1 (PPV1) infecta todas as categorias de suínos, no entanto, as reprodutoras suínas nulíparas, não imunes, apresentam maior suscetibilidade à infecção pelo vírus. Além disso, o PPV1 vem ganhando importância, pois está relacionado com outros vírus imunodepressores emergentes na suinocultura mundial, como o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Como o PCV2 afeta o sistema imune, pode facilitar a co-infecção com outros patógenos, como o PPV1, que em infecções concomitantes com PCV2 aumentam a severidade das lesões (KENNEDY et al., 2000; ELLIS et al., 2004).

O diagnóstico de PPV1 tem um papel importante para o monitoramento e controle da doença, podendo ser realizado a partir de amostras de fetos mumificados, restos fetais, tecidos necróticos, soro das fêmeas e dos leitões natimortos (MURPHY, 1999). Com os avanços da biologia molecular, a PCR é um método bastante utilizado para detecção de ácidos nucleicos do vírus (MOLITOR et al., 1991), a partir de amostras de tecidos e soros de animais infectados com PPV1 (SOARES et al., 1999). Já a PCR em tempo real (qPCR) é uma eficiente ferramenta para a quantificação de PPV1 em diversos materiais biológicos apresentando resultados rápidos e precisos. A

utilização da sonda TaqMan[®] para detecção e quantificação de PPV1 em tecidos e soro, apresenta melhores resultados em relação a PCR convencional (CHEN et al., 2009; SONG et al., 2010). Uma vez que a carga viral pode estar relacionada com os problemas associados ao PPV1, a utilização da qPCR torna-se uma ferramenta rápida e precisa para o melhor entendimento da doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

No final dos anos 60, os problemas reprodutivos começaram a ser relacionados aos agentes virais, como o vírus da peste suína clássica (CSFV), o enterovírus suíno e o vírus da Doença de Aujeszky (GORDON e LUKE, 1955; DUNNE et al., 1970; YOUNG et al., 1995). O PPV1 foi isolado pela primeira vez por Cartwright e Huck (1967) a partir de abortamentos e associado a falhas reprodutivas. Após este primeiro achado, o PPV1 foi encontrado em diversos países, observando sua disseminação mundial e tornando-se um dos principais agentes responsáveis por expressivas perdas econômicas resultantes dos problemas reprodutivos (JOHNSON e COLLINGS, 1969; GENOV et al., 1971; COACKEY e SMITH, 1972; MENGELING, 1972; MORIMOTO et al., 1972; JOHNSON, 1973; BACHMANN et al., 1975; THACKER e GONZALEZ, 1988; MENGELING et al., 2000; ORAVAINEN et al., 2005).

A família *Parvoviridae* é composta por duas subfamílias: *Parvovirinae* que agrupa os parvovírus que infectam vertebrados e *Densovirinae* que infectam insetos. A subfamília *Parvovirinae* é composta por cinco gêneros: *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus*. Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV, 2009*), o nome parvovírus origina-se do latim e *parvus* significa pequeno (ANDREWS, 1970). O gênero *Parvovirus* foi primeiramente descrito por Kilham e Olivier (1959). Esse gênero está representado por 12 espécies que estão associadas a doenças de animais vertebrados como: parvovírus de galinha (ChPV), parvovírus de camundongos 1, parvovírus H-1, parvovírus HB, parvovírus Kilham de ratos, parvovírus lapino X, parvovírus RT, vírus LuIII, vírus da panleucopenia felina (FPLV), vírus minuto dos camundongos, vírus tumoral X e parvovírus suíno (PPV), (ICTV, 2009). O parvovírus canino 2 (CPV-2) surgiu nos anos 1970 a partir do FLPV e disseminou-se rapidamente e hoje em dia é um dos principais agentes infecciosos em cães (APPEL et al., 1979). O gênero *Bocavirus* é composto por duas espécies: vírus minuto canino (CnMV) e parvovírus bovino. O gênero *Erythrovirus* possui quatro espécies, sendo que o parvovírus humano B19 tem importância na medicina. O gênero *Amdovirus* compõe somente uma espécie, a *Aleutian*

mink disease virus. E o gênero *Dependovirus* é composto de 12 espécies, sendo que a maioria deles é de vírus adeno-associados.

Em 2001, Hijisaka et al. identificaram acidentalmente uma nova sequência de parvovírus no soro de suínos em Myanmar, na tentativa de amplificar o vírus da hepatite E. Esta nova sequência está filogeneticamente distante do PPV1 e propuseram uma nova espécie, o parvovírus suíno 2 (PPV2). Em 2005, um novo parvovírus humano (bocavirus humano), pertencente ao gênero *Bocavirus* foi identificado e encontrado em crianças em várias partes do mundo, relacionado com doenças respiratórias e gastroenterites (ALLANDER et al., 2005; SLOOTS et al., 2006; LAU et al., 2007a). Recentemente, foi identificado um novo parvovírus em suínos (*porcine boca-like virus*), estritamente relacionado aos *Bocavirus* (BLOMSTRÖM et al., 2009; CHEUNG et al., 2010; CHENG et al., 2010;) sendo detectado recentemente em granjas suinícolas chinesas (HUANG et al., 2010). Jones et al. (2005), identificaram um novo vírus, o parvovírus humano 4 (PARV4) no plasma de pacientes que apresentavam infecção viral aguda e usuários de drogas injetáveis. Em 2008, Lau et al., propôs um novo gênero de parvovírus, denominado *hokovirus*, do qual dois novos vírus, hokovírus suíno (PHoV) e hokovírus bovino (BHoV) demonstraram estrita relação genética com o PARV4 de humanos e filogeneticamente distantes do PPV1. No entanto, são necessários mais estudos para que o papel epidemiológico e patogênico desses novos parvovírus seja mais claramente elucidado.

2.2 Caracterização do vírus

Os parvovírus são considerados um dos menores vírus DNA de animais (18 a 26nm de diâmetro), com peso molecular de 5,5 a 6,2 x10⁶ daltons com aproximadamente metade do peso dividido em sua massa protéica e outra composta por seu genoma, possui simetria icosaédrica, morfologia esférica, é desprovido de envelope e possui uma densidade entre 1,39 e 1,42 g/cm³ em gradiente de cloreto de cério (FIGURAS 1 e 2) (TINSLEY e LONGWORTH, 1973; HORWITZ, 1996; MUZYCZKA e BERNS, 2001). Os parvovírus possuem propriedade hemaglutinante, já que têm a capacidade de ligar-se a receptores específicos das hemácias de determinadas espécies (MENGELING, 1972; HORWITZ, 1996). Devido à sua estrutura simples, são vírus extremamente resistentes à inativação, resistindo a grandes alterações de pH, entre 3,0 e 9,0, e de temperatura, como 56°C por 60 minutos, (HORWITZ, 1996). Para a

inativação do vírus, pode ser utilizado hipoclorito, formalina, B-propiolactona, hidroxilamina e agentes oxidantes (BROWN, 1981). Em um estudo recente, foi analisada a eficácia de desinfecção de PPV1 comparando com outros vírus de referência, como: vírus minuto de camundongo, poliovírus, adenovírus tipo 5 e vírus da vaccinia, sendo que o PPV1 demonstrou-se o vírus mais resistente à desinfecção, requerendo a exposição de até 25000 ppm de hipoclorito de sódio por 10 minutos para sua completa inativação e uma alta resistência a temperaturas de 70 - 90°C. O etanol 70% teve pouco efeito de inativação sobre o PPV1 (ETERPI et al., 2009).

Esta alta capacidade de resistência e presença ubíqua no ambiente torna o PPV1 um importante contaminante em laboratórios, em produtos farmacêuticos derivados de suínos, em transplantes e um resistente vírus de animais e humanos (MENGELING, 1999; SOUCIE et al., 2000).

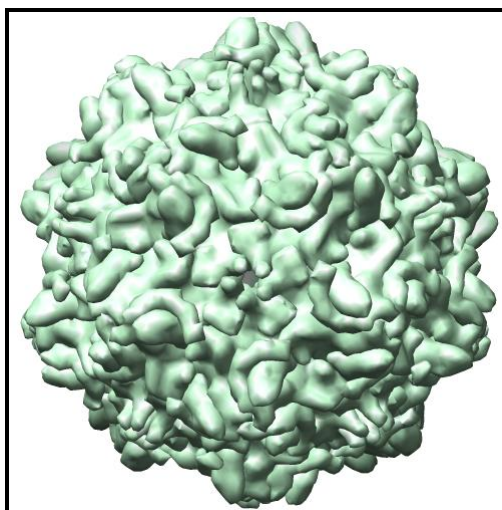


Figura 1. Representação da estrutura do capsídeo do PPV1 em 3D. Fonte: (Simpson et al., 2002)

Protein Data Base. (<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1K3V>).

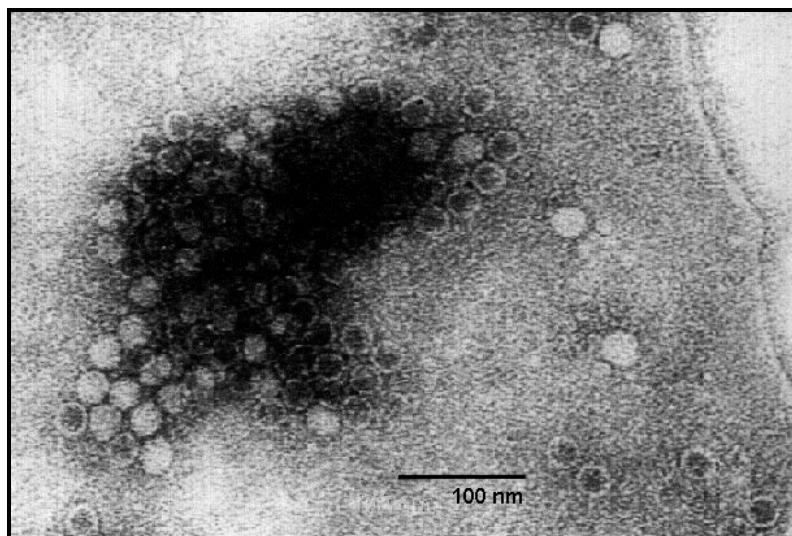


Figura 2. Microscopia eletrônica do FPLV. Disponível em: http://www.ictvdb.org/WIntkey/Images/em_parvo.htm

2.3 Organização gênica e replicação

O genoma do PPV1 é composto por uma fita simples de DNA de aproximadamente 5,0 Kb (Kilobases), com duas grandes fases abertas de leitura (ORF). A ORF1 está localizada na metade esquerda do genoma (5') e codifica as três proteínas não-estruturais (*non structural – NS*), NS-1, NS-2 e NS-3, as quais estão relacionadas à replicação viral e controle da expressão gênica. Os genes NS-1 e NS-2 são altamente conservados na família dos parvovírus e possui atividade de helicase, importante na replicação e empacotamento viral, podendo ainda induzir lise celular e apoptose (NUESCH et al., 1995; RAYET et al., 1998; MUZYCZKA e BERNS, 2001; DAEFFLER et al., 2003). A função da proteína NS-3 ainda não é conhecida, mas, acredita-se que pode estar envolvida na replicação viral. A ORF2 está na metade direita do genoma (3') e codifica três proteínas estruturais do capsídeo (*viral protein – VP*), VP-1, VP-2 e VP-3, responsáveis pela estrutura do capsídeo e adsorção do vírus na célula hospedeira (RÁNZ et al., 1989; BERGERON et al., 1993) (FIGURA 3). As proteínas VP1 e VP2 apresentam uma mesma região genômica, assim possuem uma seqüência compartilhada de aminoácidos, à exceção de alguns aminoácidos adicionais na extremidade N-terminal da VP1 (PARADISO, 1981). A proteína VP3 não apresenta região codificante própria no genoma e, aparentemente, é composta por clivagem proteolítica da VP2 (HORWITZ, 1996; MURPHY et al., 1999). As partículas virais consistem de um total de 60 cópias das três proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3

(TSAO et al., 1991). O capsídeo icosaédrico é configurado pelas proteínas VP, das quais conferem alta estabilidade, determinam as características imunogênicas e possuem funções importantes no reconhecimento e ligação a receptores celulares (BLOOM et al., 2001; LANGEVELD et al., 1993). A substituição de poucos aminoácidos na proteína VP2 do capsídeo viral pode ser responsável pela diferença na patogenicidade entre as cepas (BERGERON et al., 1993; TIJSEN et al., 1995; BERGERON et al. 1996; SIMPSON et al., 2002). Além disso, foi comparada a estrutura da cepa viral NADL-2 com outros parvovírus relacionados (CPV, FPLV e MVM), demonstrando que os capsídeos virais do PPV1, CPV, FPLV e MVM são estreitamente similares (SIMPSON et al., 2002).

Nos parvovírus autônomos, o genoma é organizado dentro de duas unidades de transcrição sobrepostas (CLEMENS e PINTEL, 1988). Estes vírus são considerados hospedeiro-específicos. Inicialmente, o ciclo de replicação dos parvovírus ocorre devido ao reconhecimento e ligação dos vírions a receptores celulares. Os receptores celulares variam de acordo com cada parvovírus, pois são específicos de cada hospedeiro, isso determina o tropismo tecidual e pode influenciar a via endocítica da replicação. Dentre os receptores celulares dos parvovírus, destacam-se uma variedade de glicoproteínas, glicanos e glicolipídeos (HARBISON et al., 2008). O receptor utilizado pelos FPLV e CPV é o receptor da transferrina (TfR), que é expresso em células em divisão e são dependentes de transferrina para a sua replicação (PALERMO et al., 2003; HARBISON et al., 2009) Já o BPV e alguns AAVs utilizam sialoglicoproteínas como receptores, ligando-se ao ácido siálico. Um estudo recente realizado por Boisvert et al. (2010) demonstrou que após a ligação do vírus ao ácido siálico na glicoproteína de superfície da célula, o PPV1 utiliza tanto a via endocítica mediada por clatrina como a via macropinocitose para obter acesso à célula. No entanto, ainda existem poucos estudos sobre os receptores envolvidos na entrada do PPV1 na célula. Após a ligação do vírus com o receptor, os vírions são transportados rapidamente até as proximidades do núcleo, onde ocorre uma redução de pH no interior dos endossomos (SEISENBERGER et al., 2001; DING et al., 2005). Com isso, ocorre a alteração da conformação das proteínas do capsídeo expondo a região amino-terminal da VP1, clivagem da região amino-terminal da VP2 (VIHINEN-RANTA et al., 2002; FARR et al., 2005; MANI et al., 2006). Em alguns vírus como o CPV-2, foi observado que o vírus consegue escapar do endossomo sem haver acidificação (HARBISON et al., 2008). O mecanismo de escape é realizado pela região VP1, que expressa uma enzima lipolítica, a fosfolipase A2 (PLA2) que está

envolvida no escape endossomal, favorecendo alterações na curvatura da membrana dos endossomos e a formação de poros (ZADORI et al., 2001; GIROD et al., 2002; BLEKER et al., 2005; GRIEGER et al., 2007). O transporte dos vírus até o núcleo é mediado por microtúbulos celulares em direção ao centro de organização de microtúbulos, localizado na região perinuclear (VIHINEN-RANTA et al., 2000; HIROSUE et al., 2007). Teoricamente, os capsídeos dos parvovírus com diâmetro de 26 nm conseguem passar através do complexo de poros do núcleo (NPC) de forma passiva e mantendo o vírus intacto (HARBISON et al., 2008). Entretanto, um estudo realizado com o bloqueio dos poros nucleares sugere que pode haver uma via alternativa da entrada dos vírus no núcleo (COHEN et al., 2006). O mecanismo dos parvovírus para desnudamento e entrega do genoma ainda não foi claramente descrito. Entre as teorias, está o estacionamento do capsídeo nos NPCs, seguida de uma simples extrusão do DNA viral do capsídeo dentro do núcleo (VIHINEN-RANTA et al., 2000; MANI et al., 2006). Após a entrada dos ácidos nucléicos no núcleo, a replicação viral é altamente dependente da “maquinaria” da célula, por isso ocorre durante a fase “S” celular. (RHODE, 1973; SIEGL, 1990; MURPHY, 1999), o que explica o tropismo dos parvovirus por tecidos em altas taxas de mitose. O processo de replicação dos parvovírus está baseado nas extremidades palindrômicas de genoma, que formam um “*grampo de cabelo*”, denominado *Rolling Hairpin Model* (TATTERSALL e WARD, 1976). A primeira etapa de replicação é a síntese da fita de DNA complementar para formar o DNA fita dupla. Esta molécula fita dupla pode ser utilizada como molde pela RNA polimerase II para a produção dos mRNAs, na transcrição. Os transcritos gerados por *splicing* serão traduzidos nas proteínas não-estruturais NS1 e NS2. Assim como outros transcritos codificarão as VP1 e VP2/VP3. A polimerização produz uma cópia linear dupla que corresponderia a quatro cópias do genoma viral (duas de polaridade positiva e duas negativas). Essa macromolécula composta por múltiplas cópias do genoma é clivada pela atividade de endonuclease da NS1. Desta forma, as moléculas são encapsidadas e liberados os virions (MURPHY, 1999).

A replicação do gênero *Dependovirus* (adeno-associados - AAV) não será abordada devido a esses vírus geralmente necessitarem de uma associação com adenovírus ou herpesvírus para poderem replicar (CASTO et al., 1967; BAUER e MONREAL, 1986). Então, será abordada somente a replicação dos parvovírus autônomos, os quais possuem grande importância médica e veterinária.

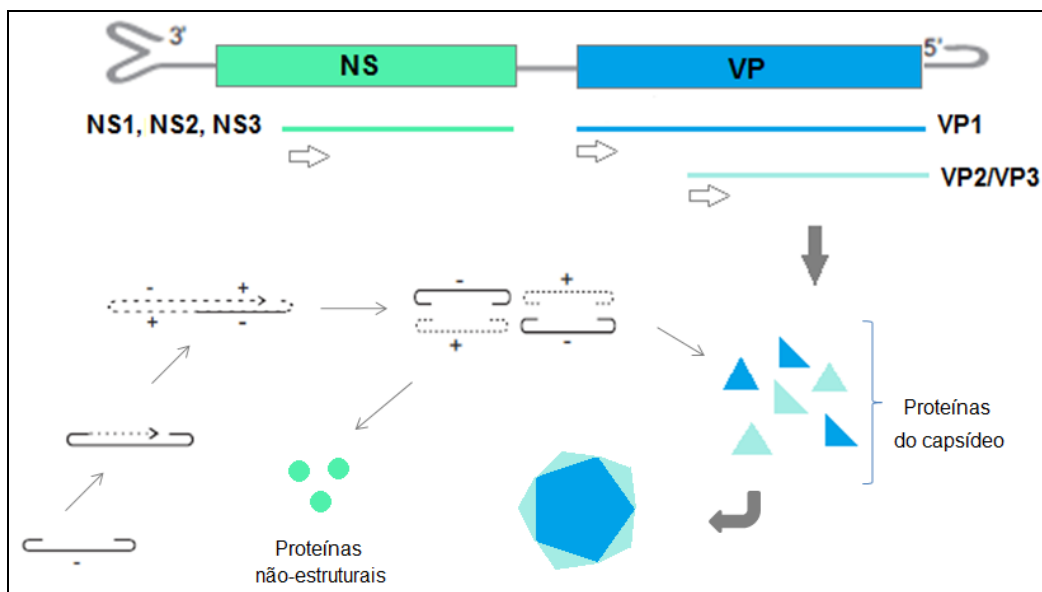


Figura 3. Representação da organização gênica do PPV1 demonstrando as duas grandes ORFs. À esquerda, a NS que codifica as proteínas não-estruturais (NS1, NS2 e NS3) e, à direita, a VP que codifica as proteínas estruturais do capsídeo viral (VP1, VP2/VP3).

2.4 Epidemiologia

A parvovirose suína está amplamente distribuída tanto na população suína doméstica como na silvestre, as granjas raramente apresentam-se livres do PPV1 (RÓIC, et al., 2005; RUIZ-FONS et al., 2006; MONTAGNARO et al., 2010). Inquéritos sorológicos indicam que, no Brasil, o PPV1 apresenta alta soroprevalência em granjas comerciais, demonstrando que o vírus está presente no plantel de suínos há pelo menos duas décadas causando perdas reprodutivas (MARTINS et al., 1984; BERSANO et al., 1993; RODRIGUEZ et al., 2003). O PPV1 tem a capacidade de resistir no ambiente em condições adversas contribuindo para uma ampla distribuição tornando-se um problema para desinfecção das instalações das granjas (BROWN, 1981; MORAES e COSTA, 2007).

A transmissão do PPV1 no plantel pode ocorrer através de contato oronasal direto com animais infectados ou indireto através de suas secreções e excreções, assim sendo importantes fontes de disseminação: o sêmen, fetos e envoltórios fetais (GRADIL et al., 1990; MENGELING, 1999). Acredita-se que a transmissão horizontal ocorre diretamente pelo contato entre os animais agudamente infectados e os que nunca tiveram contato com o vírus, através da ingestão ou inalação de vírus do ambiente. Um estudo demonstrou que instalações anteriormente habitadas por animais com infecção

aguda de PPV1, contaminaram animais sem contato prévio com o vírus, pois o PPV1 permaneceu nas instalações por até quatro meses fora do seu hospedeiro (MENGELING, 1999).

O PPV1 pode infectar todas as categorias de suínos, no entanto, as fêmeas nulíparas são a categoria mais suscetível à infecção pelo vírus seguida de problemas reprodutivos devido aos baixos títulos de anticorpos contra o vírus (ORAVAINEN et al., 2005). Com isso, as fêmeas nulíparas podem ficar desprotegidas tanto pela ausência de anticorpos maternos quanto pela neutralização do antígeno vacinal ocasionada pelos anticorpos maternos. Já as fêmeas multíparas desenvolvem imunidade ativa à medida que o número de partos aumenta e o contato com o agente viral também é maior, conseqüentemente, ficam mais protegidas e apresentam menos problemas reprodutivos relacionados com o PPV1 (TOO e LOVE, 1986; MENGELING, 2000; ROEHE et al., 2007).

Os machos reprodutores podem ser considerados importantes transmissores de vírus durante infecções agudas, pois o patógeno é excretado por várias vias, inclusive através do sêmen, tanto na forma experimental quanto natural (MCADARAGH e ANDERSON, 1975; GRADIL et al., 1990). Inoculações experimentais de PPV1 em machos reprodutores e posterior isolamento viral a partir de órgãos (testículos e linfonodos escrotais) demonstraram que os machos são fontes de disseminação do vírus (LUCAS et al., 1974; MENGELING et al., 2000; GUÉRIN e POZZI, 2005). Muitos vírus têm sido detectados no sêmen e o PPV1 é um dos importantes patógenos que pode ser disseminado através da inseminação artificial, no entanto ainda não está claro o papel da transmissão de PPV1 através do sêmen e as desordens reprodutivas (KIM et al., 2003a; GUÉRIN e POZZI, 2005).

O PPV1 também pode ser encontrado em outras espécies, como em javalis (*Sus scrofa*). Em estudos sorológicos foram detectados anticorpos contra o PPV1, demonstrando que esses animais já tiveram contato com o vírus (NEW et al., 1994; VICENTE et al., 2002; VENGUST et al., 2006; FENATI et al., 2009; MONTAGNARO et al., 2010). Recentemente, foi confirmada a presença do PPV1 em um surto de abortamentos em javalis pelas técnicas: isolamento viral, sorologia, microscopia eletrônica e PCR. Com o vírus isolado, foram realizadas inoculações experimentais em fêmeas, das quais apresentaram abortamento, no entanto, ainda não se sabem os mecanismos que envolvem PPV1 em abortamentos (ZHANG et al., 2010).

2.5 Patogenia

A cepa de PPV1 de baixa patogenicidade (NADL-2) causa uma viremia limitada, não ultrapassa a barreira transplacentária e é amplamente utilizada para produção de vacinas (MENGELING et al., 1979; PAUL e MENGELING., 1984). Ao contrário, a cepa Kresse é altamente patogênica, tem a capacidade de matar, até mesmo fetos imunocompetentes e também pode estar associada a dermatites em leitões. Esta cepa foi isolada por Kresse et al. (1985), a partir de um caso clínico com lesões graves, nas quais o vírus foi detectado em vários órgãos viscerais e também do cérebro, pele e soro. Assim, a patogenia do PPV1 varia conforme as cepas, ou seja, as mutações de aminoácidos na proteína VP2 do capsídeo viral podem gerar cepas com diferenças na patogenicidade (BERGERON et al., 1993; BERGERON et al., 1996; SIMPSON et al., 2002).

A patogenia está principalmente relacionada com a infecção transplacentária, mas ainda não se sabe certamente como o PPV1 ultrapassa a barreira placentária composta por seis camadas de tecido que separa a circulação materna da circulação fetal (Figura 4) (RUDEK e KWIATKOWSKA, 1983) Como os anticorpos não ultrapassam essa barreira e não há evidências de que o vírus consiga replicar em todas essas seis camadas de tecidos, existe a possibilidade de que o PPV1 passe da mãe para o feto 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).

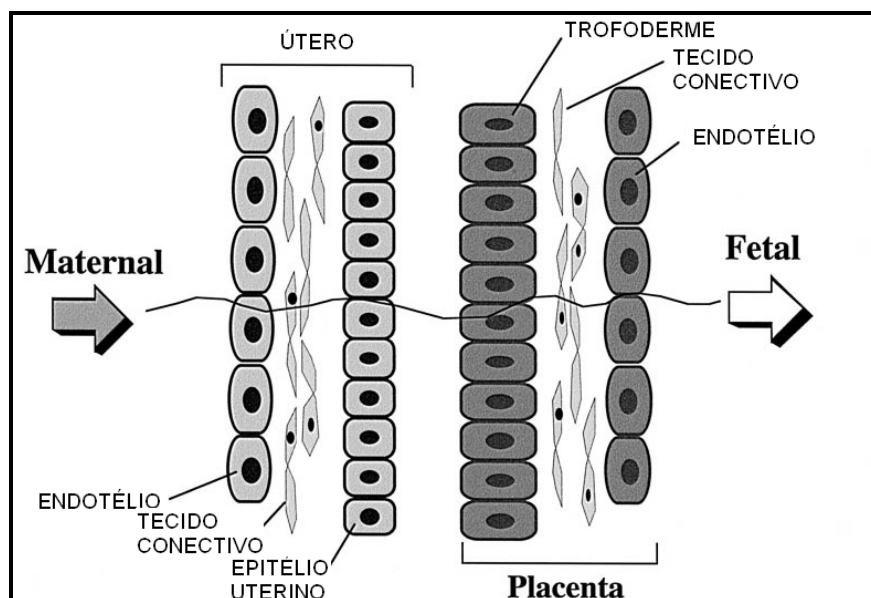


Figura 4 – Seis camadas da barreira transplacentária que separam a circulação fetal e maternal. Fonte - (Adaptado de MENGELING et al., 2000).



Figura 5 - Leitegada com natimortos e fetos mumificados de diferentes tamanhos. A figura demonstra as falhas reprodutivas causadas por PPV1, à esquerda os leitões natimortos e com autólise e à direita os fetos mumificados. Fonte - Danielle Gava (2008).

Como os suínos possuem placenta epitélio-corial, o trofoderma fetal encontra-se em contato direto com o epitélio uterino formando microvilos interdigitados e resultando em uma área para a difusão de substâncias (MIGLINO et al., 2001). As camadas placentárias são formadas por células que não permitem a passagem de pequenas moléculas, como anticorpos, devido as suas junções celulares (WILHELM et al., 2005). Desta forma, o PPV1 não conseguiria ultrapassar esta barreira transplacentária sem algum fator que propiciasse essa passagem. Segundo Vallet e Freking (2007), a placenta pode sofrer um alargamento nas junções celulares em fetos no início de seu desenvolvimento, aumentando o fluxo de nutrientes e moléculas, o que poderia facilitar a passagem do vírus. Estudos relatam que o vírus fagocitado por monócitos periféricos pode permanecer por longos períodos nessas células (PAUL et al., 1979; KRAKOWKA et al., 2000). Assim, os tecidos fetais ou embrionários tornam-se um ambiente favorável para a replicação do PPV1 devido a sua alta taxa de mitose.

Se as fêmeas são expostas pela primeira vez ao PPV1 até os 30 dias de gestação, têm uma grande possibilidade de ocorrer infecção transplacentária acarretando morte embrionária, reabsorção dos embriões e retorno ao cio. Se, neste período, alguns embriões sobreviverem à infecção, haverá redução do tamanho da leitegada, leitões fracos e com peso baixo (MENGELING e CUTLIP, 1976; SORENSEN e ASKAA, 1981a; NIELSEN et al., 1991).

Se a infecção ocorrer após os 30 dias de gestação, já haverá deposição de cálcio nos ossos fetais. Nesta etapa, a infecção pelo PPV1 igualmente ocasiona a morte do feto, mas a reabsorção é impedida devido à formação do esqueleto, resultando na mumificação fetal (JOHNSON e COLLINGS, 1971; BACHMANN et al., 1975). A partir dos 70 dias de gestação, o feto torna-se imunocompetente (MENGELING e CUTLIP, 1976; LENGHAUS et al., 1978). Assim, os leitões podem proteger-se do vírus durante, pelo menos, o início do período pós-natal. No entanto, o número médio de fetos com infecção transplacentária por ninhada pode ser maior quando a infecção é mais tardia na gestação, devido ao aumento da área de contato entre a placenta materna e fetal e o aumento do fluxo sanguíneo para o útero (MENGELING e CUTLIP, 1976).

As principais manifestações clínicas observadas pela infecção pelo PPV1 caracterizam-se por morte embrionária com reabsorção, retorno ao estro, baixo número de leitões ao parto, fetos mumificados e natimortos (GILLICK, 1970; DONALDSON-WOOD et al., 1976, MENGELING et al. 1991; MENGELING, 1999) (Figura 5). Apesar da parvovirose se apresentar de forma subclínica em animais não-prenhes, o

PPV1 têm sido relacionado a lesões cutâneas em leitões, (KRESSE et al., 1985; LAGER e MENGELING, 1994), nefrite intersticial em animais de terminação (DROLET et al., 2002) e miocardite não-supurativa em leitões em lactação (BOLT et al., 1997). As lesões macroscópicas em embriões são a morte embrionária seguida da reabsorção de fluídos e tecidos moles. As lesões microscópicas apresentam-se na forma de necrose e dano vascular. No feto, as lesões macroscópicas apresentam-se como perda de condição corporal, edema, hemorragia, acúmulo de líquido sanguinolento em cavidades corpóreas e desidratação dos tecidos levando à mumificação (MENGELING, 1999). Já suas lesões microscópicas consistem em necrose celular em diversos tecidos, inflamação e infiltração de células mononucleares (JOO et al., 1977; LENGHAUS, 1978).

Uma análise da distribuição de PPV1 em diferentes tecidos fetais demonstrou que o vírus está presente no intestino, fígado, timo, gônadas, cérebro, coração, rim, baço e pulmão. Também foi observado que as cepas de PPV1 mais virulentas apresentam maior concentração e maior difusão entre os tecidos, porém sem maiores predileções definidas por determinados tecidos (ORAVEERAKUL et al., 1993; WILHELM et al., 2005). No Brasil, um estudo realizado demonstrou uma maior incidência de PPV1 no pulmão e coração de fetos mumificados, através da detecção por PCR (WOLF et al., 2008). Em uma análise da carga viral por PCR em tempo real e distribuição do PPV1 em órgãos de fêmeas e fetos artificialmente inoculados, o vírus foi encontrado principalmente no coração, pulmão, baço, rim e endométrio das fêmeas e nos fetos principalmente no coração, baço, pulmão e gônadas (MIAO et al., 2009).

2.6 Imunidade

Em uma visão geral, o sistema imune é constituído de mecanismos de defesa específicos e inespecíficos que geram uma resposta imunológica para combater agentes “estranhos” ao indivíduo. Na imunidade inata (resposta inespecífica) existem as barreiras físicas, químicas e microbiológicas para combater estes agentes. Essa interação ocorre através de suas células de defesa (macrófagos, células dendríticas e *Natural Killers* – NK) quando entram em contato com o antígeno (TIZARD, 1985). Após o reconhecimento do antígeno, a imunidade adquirida gera uma resposta imune para neutralizar e destruir esses antígenos. A imunidade adquirida (resposta específica) é constituída pela resposta imune humoral e celular. A resposta imune humoral, mediada por plasmócitos derivados de linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos,

atuam de forma eficiente na neutralização dos antígenos e defesa do organismo. Em suínos, foram descritas quatro classes de imunoglobulinas IgM, IgG, IgA e IgE - sendo as três primeiras mais conhecidas e importantes (BOURNE, 1976; BUTLER et al. 2009). A forma mais conhecida de defesa do sistema imune contra o PPV1 é através do desenvolvimento de anticorpos específicos para o vírus, a qual está associada a altos títulos de anticorpos contra PPV1, 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.

A resposta imune celular é mediada por linfócitos T auxiliares (T *helper* ou Th), ou linfócitos T citotóxicos (T *cytotoxic* ou Tc). Os linfócitos T auxiliares, fenotipicamente CD4+, auxiliam na produção de citocinas para influenciar a diferenciação de células como linfócitos B específicos para a ação contra os antígenos. Nesta resposta com linfócitos T auxiliares, o antígeno é processado e apresentado com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC de classe II) acoplados na sua superfície. Os linfócitos T auxiliares podem apresentar-se como Th1 que facilitam uma resposta predominantemente celular, ou Th2, que facilitam uma resposta predominantemente humoral (HIRSH e ZEE, 2003, TIZARD, 1985).

Os linfócitos T citotóxicos, fenotipicamente CD8+, causam uma resposta citotóxica ao antígeno acoplado com moléculas do MHC de classe I. Esses mecanismos imunológicos específicos contra as infecções víricas ocorrem após a estimulação direta ou indireta dos linfócitos T e B pelos antígenos virais e possuem como características principais: *especificidade* (cada célula reconhece apenas um determinante antigênico); *diversidade* (capacidade de reconhecer uma grande variedade de antígenos) e *memória imunológica* (capacidade de produzir uma resposta qualitativa e quantitativamente diferente em exposições subseqüentes a um determinado antígeno). Esses mecanismos envolvidos na imunidade específica (*humoral e celular*) são complementares e atuam conjuntamente no combate às infecções víricas. A importância relativa desses mecanismos, no entanto, varia entre os diferentes vírus, de acordo com a sua biologia (HIRSH e ZEE, 2003; FLORES, 2007).

A capacidade do vírus de gerar lesões está intimamente ligada ao sistema imunológico do hospedeiro (ROTH, 1999, TIZARD, 2002). Como o PPV1 possui uma estrutura simples (CHAPMANN e ROSSMANN, 1993) capaz de suportar alterações extremas no meio ambiente (CARTWRIGHT et al., 1969; MENGELING, 1972; MORIMOTO et al., 1972), possivelmente, o vírus consiga escapar facilmente e

sobrepujar o sistema imunológico do hospedeiro. Quando já ocorreu uma prévia exposição ao vírus, o sistema imunológico já possui uma resposta específica para o vírus, na qual se houverem re-infecções, o hospedeiro já terá uma defesa contra o vírus (LADEKJÆR-MIKKELSEN e NIELSEN, 2002). Essa resposta é estimulada por epítomos do antígeno que ligam-se a receptores específicos nos linfócitos T, através da apresentação do antígeno pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC de classe I) (MORÓN et al., 2003). As células T citotóxicas (CD8+) reconhecem os antígenos associados às moléculas de MHC de classe I e realizam a liberação de fatores citotóxicos atuando no controle da infecção viral (RUEDA et al., 2004). A infecção por PPV1 também pode direcionar uma resposta com linfócitos T auxiliares, como foi descrito anteriormente. Entre as células mais eficientes para processamento do PPV1 estão as células B, macrófagos e, por fim, as células dendríticas (MORÓN et al., 2002).

Devido à barreira transplacentária nas suínas, não ocorre a passagem de imunoglobulinas para o feto. Com isso, os leitões nascem sem proteção e necessitam adquirir imunidade passiva através do colostro da mãe (SALMON, 1984; TIZARD, 1985). O colostro materno é constituído por imunoglobulinas, além de células de defesa, como neutrófilos e macrófagos, que contribuem para a aquisição de imunidade pelos leitões recém-nascidos após as primeiras mamadas (GASKINS e KELLEY, 1995; SALMON, 1999).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial tem grande importância na investigação e detecção de doenças que afetam os plantéis. As perdas reprodutivas podem ocorrer por causas variadas, sendo que, se a granja apresentar altos índices de retorno ao cio, atraso na data de parição, fetos mumificados ou leitegadas com número reduzido de leitões, são indícios de que pode ter ocorrido infecção por PPV1 (MURPHY, 1999). O diagnóstico de PPV1 pode ser realizado a partir de amostras de fetos mumificados, restos fetais, tecidos necróticos, soro pareado das fêmeas e soro de leitões natimortos.

O isolamento viral é uma técnica clássica de diagnóstico que consiste na replicação do vírus em células permissíveis. Além de auxiliar na identificação, o isolamento do vírus a partir de material clínico permite que se obtenha o agente viável em maiores quantidades para ser utilizado em estudos posteriores. No entanto, é uma técnica laboriosa e demanda bastante tempo de cultivo. O cultivo celular primário

apresenta maior risco de contaminação não apresentando divisão celular indefinida como as linhagens celulares. As linhagens celulares provenientes de rim suíno (PK15, SK6 e ESK) e testículo suíno (ST e STE) vêm sendo amplamente utilizadas com boa sensibilidade para a replicação do PPV1 (MENGELING, 1972; MIRANDA et al., 1992; ZIMMERMANN et al., 2006). Entretanto, muitas vezes as linhagens celulares não são permissíveis aos vírus, dificultando o isolamento viral (ROEHE et al., 2007). A identificação do PPV1 no isolamento viral pode ser evidenciada nos efeitos citopáticos (ECP) que o vírus causa em determinadas células, como as inclusões intranucleares, núcleo picnótico, irregularidade nos contornos, granulações, vacúolos citoplasmáticos, diminuição na velocidade de replicação e morte celular (CARTWRIGHT e HUCK, 1967; MENGELING, 1972; MIRANDA et al., 1992).

Como os parvovírus têm a capacidade de hemaglutinar os eritrócitos de várias espécies, técnicas baseadas nessa propriedade têm sido utilizadas desde a década de 70 (BRAILOVSKY, 1966). O teste de Hemaglutinação (HA) mensura a quantidade de partículas virais hemaglutinantes e o teste de Inibição de Hemaglutinação (HI) mede o título de anticorpos que o animal apresenta, sendo este, o teste sorológico mais utilizado para o diagnóstico da parvovirose suína (JOO et al., 1976b; MENGELING et al., 2000). Estas técnicas de diagnóstico (HA e HI) apresentam um baixo custo, no entanto, quando utilizado como ferramenta para avaliação do perfil sorológico do plantel, torna-se uma prova laboriosa, pois, para realização do teste é necessário obter hemácias de cobaias, galinhas, humanos ou ratos (CARTWRIGHT et al., 1969; FUJISAKI, 1975; JOO et al., 1976b). Além disso, não existe padronização internacional dos parâmetros como temperatura de incubação, espécie, idade do doador de hemácias e tratamento prévio da amostra, o que pode interferir na diversidade de resultados.

O diagnóstico sorológico de PPV1 com o emprego do *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) vem sendo utilizado em vários países, pois, além de dispensar o tratamento prévio das amostras, pode ser padronizado e automatizado, resultando em alta reprodutibilidade e possibilidade de desenvolvimento de kits comerciais. O teste de ELISA também pode ser utilizado para medir os títulos de anticorpos obtendo um perfil sorológico dos animais da granja, porém, como o vírus está amplamente disseminado no ambiente, torna-se um diagnóstico com resultados limitados (HOHDATSU, et al., 1988; WESTENBRINK et al., 1989).

Com os avanços da biologia molecular, a PCR pode ser utilizada para detecção de ácidos nucleicos do vírus (MOLITOR et al., 1991), a partir de amostras de tecidos e

soros de animais infectados com PPV1. Estudos de detecção por PCR de amostras fetais e de fêmeas com perdas reprodutivas realizados com amostras provenientes dos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Goiás demonstraram que a PCR é 10^6 vezes mais sensível do que o teste HA na detecção do PPV1 (SOARES et al., 1999; SOARES et al., 2003). Técnicas como Multiplex PCR, para detecção simultânea de mais de um patógeno, podem ser utilizadas para diagnóstico de PPV1 e patógenos associados (KIM et al., 2003a). Uma nova técnica, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), foi desenvolvida para detecção rápida e específica de patógenos como PPV1 (CHEN et al., 2009). Outra técnica molecular é a qPCR, a qual possibilita realizar a quantificação de fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). Uma das vantagens desta técnica, além da quantificação precisa de cópias de DNA, é que não necessita do pós-processamento da PCR (HOLLAND et al., 1991; WARRILOW et al., 2002). O desenvolvimento de uma qPCR com SYBR Green I para detecção de amostras de campo de PPV1 com o gene alvo VP2 demonstrou boa sensibilidade e especificidade (WILHELM et al., 2006). No entanto, como o SYBR Green I é um intercalante de DNA, pode ser menos específico do que outras técnicas de qPCR que utilizam sondas. Além disso, com a melhoria e otimização dos métodos de ensaio e avaliação, a qPCR agilizará muito o diagnóstico clínico (LEMMON e GARDNER, 2008). A técnica de qPCR utilizando *molecular beacons* como sonda para detecção de vírus suínos, inclusive PPV1, apresentou alta especificidade para as diferentes vírus em amostras clínicas como sangue total, soro e tecidos, e uma boa sensibilidade comparada com a PCR convencional (MCKILLEN et al., 2007). Recentemente, estudos realizados para a detecção e quantificação de PPV1, utilizando esta técnica com o método com sonda TaqMan[®], demonstrou rapidez no diagnóstico e uma alta sensibilidade e especificidade (CHEN et al., 2009; SONG et al., 2010). Essas técnicas que utilizam sondas específicas são ferramentas excelentes e importantes para detecção e quantificação de PPV1 e outros patógenos relacionados, em amostras de campo de suínos, possibilitando um diagnóstico rápido e eficiente para o estudo de doenças.

2.8 Controle

Como não existe um tratamento para a doença, a vacinação é um método de controle específico, seguro e eficaz que proporciona imunidade aos suínos frente à parvovirose. Vacinas atenuadas têm sido desenvolvidas desde a década de 70, para a prevenção da doença, evitando a ocorrência de problemas clínicos (JOO e JOHNSON, 1977; MENGELING et al., 1979). No Brasil, as vacinas atenuadas não são disponíveis comercialmente. As primeiras vacinas inativadas contra PPV1 foram desenvolvidas na década de 70 e 80 (SUZUKI e FUJISAKI, 1976; MENGELING et al., 1979; WRATHALL et al., 1984; MOLITOR et al., 1985), as quais são eficazes e seguras prevenindo a infecção intrauterina, sendo estas as mais utilizadas em todo o mundo (THOMSON e PROZESKY, 1994). Posteriormente, a cepa NADL-2 passou a ser amplamente utilizada para a elaboração da vacina inativada contra PPV1, (MENGELING et al., 1980; PAUL e MENGELING, 1984; ZEEUW et al., 2007). No entanto, estudos demonstraram elevadas taxas de mutação em parvovírus de carnívoros, apresentando uma taxa de substituição de $7,1 \times 10^{-3}$ nucleotídeos por sítio por ano, podendo ser comparados as taxas de mutação de vírus de RNA, surgindo controvérsias se as vacinas utilizadas estavam protegendo contra as cepas circulantes (SIMPSON et al., 2002; SHACKELTON et al., 2005; SHACKELTON et al., 2007; DUFFY et al., 2008). Dessa forma, torna-se importante a caracterização de cepas circulantes no plantel, visando identificar os perfis genéticos do PPV1 e suas regiões imunogênicas (SOARES et al., 2003; ZIMMERMANN et al., 2006; SHANGJIN et al., 2009). Em um estudo realizado por Józwik et al., (2009), em isolados de campo de PPV1 diferentes geneticamente e antigenicamente das cepas vacinais, foi levantada a questão de se as vacinas inativadas protegiam contra novas cepas de PPV1 altamente virulentas. Este estudo revelou que os suínos vacinados ainda eliminavam o vírus após a infecção, sugerindo que o vírus pode continuar a disseminar, mesmo em rebanhos imunizados com a vacina.

Também é importante estudar a relação entre a carga viral de PPV1 e os títulos de anticorpos no soro de suínas nulíparas antes e após a vacinação para PPV1, para avaliar se o título de anticorpos está protegendo contra o PPV1 e qual a carga viral presente no plantel. Isso contribuiria para avaliar se o rebanho está protegido contra o vírus e se existiria a necessidade de revacinação ou o desenvolvimento de novas vacinas.

Com os avanços da engenharia genética, vacinas recombinantes têm sido desenvolvidas, podendo ser expressas em sistema baculovírus (MARANGA et al., 2002; ANTONIS et al., 2006), em *Lactobacillus casei* (YIGANG e YIJING, 2008) ou utilizando sistema *virus-like particles* (VLP) e também podem ser feitas vacina híbridas como PPV1 e PCV2 (LO-MAN et al., 1998; PAN et al., 2008). Além disso, foi realizado um estudo da expressão da proteína do gene VP2 em células de *E. coli*, o qual demonstrou que a purificação desta proteína fornecia recursos para estudos de diagnóstico e produção de vacinas (QI e CUI, 2009). Apesar da tecnologia avançada empregada nestes estudos, as vacinas inativadas continuam sendo largamente utilizadas em razão da sua maior margem de segurança. No Brasil, somente as vacinas inativadas são utilizadas comercialmente, podendo ser monovalentes ou polivalentes (combinada com antígenos de outros vírus e bactérias).

A vacinação contra parvovirose suína é recomendada para nulíparas pelo menos 30 dias antes da cobertura, em média aos 170-180 dias de idade, seguida de uma segunda dose 15 dias após. A revacinação das fêmeas deve ser feita em torno de 10 a 15 dias após o parto. Os machos devem ser vacinados com a primeira dose cinco a seis semanas antes de entrar para a reprodução, com aplicação da segunda dose 15 a 20 dias depois e revacinação a cada seis meses (MENGELING, 1999; ROEHE et al., 2007).

2.9 Relação do PPV1 com outros vírus

O PPV1 está relacionado com outros vírus emergentes na suinocultura mundial, como o circovírus suíno tipo 2 (PCV2) e o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína (PRRSV) (LYOO, et al., 2001; ELLIS et al., 2004). O PCV2 é considerado o principal patógeno que afeta o sistema imune em suínos que ocasiona grandes prejuízos à suinocultura mundial (USDA, 2000).

O PCV pertence à família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*, é um vírus não envelopado, com simetria icosaédrica, genoma composto de DNA fita simples circular com tamanho de aproximadamente 1,7 kb e é classificado em 2 tipos: PCV tipo 1 e PCV tipo 2, sendo este dividido em dois genótipos, PCV2 grupo 1 (ou PCV2b - isolados europeus) e PCV2 grupo 2 (ou PCV2a - isolados americanos) (TODD et al., 1991; HAMEL et al., 1998; CHEUNG et al., 2007). Também já foi descrito o genótipo PCV2c (SEGALÈS et al., 2008; CORTEY e OLVERA, 2010), porém ainda é pouco prevalente e estudado. Recentemente, foi realizada uma análise sobre a variabilidade genética das

cepas chinesas de PCV2 isoladas entre 2004 e 2008, sendo proposta a existência de dois novos genótipos de PCV2 (PCV2d e PCV2e) (WANG et al., 2009, GUO et al., 2010). O PCV1 foi descoberto por Tischer et al. em 1974, como contaminante de cultivo celular em linhagens de PK-15 (células de rim suíno), não causando patologia em suínos. Já o PCV2 foi descrito em 1991, no Canadá, em animais que apresentavam a Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Suíno (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome - PMWS) (TODD et al., 1991; HARDING e CLARK, 1997; ALLAN et al., 1998; ALLAN e ELLIS, 2000). O risco de suínos desenvolverem PMWS pode aumentar quando ocorrer co-infecção com PPV1 ou PRRSV (POGRANICHNIY et al., 2002). O PCV2 encontra-se mundialmente distribuído (MORI et al., 2000; MAGAR et al., 2000; SEGALÉS e DOMINGO, 2002; KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA et al., 2002; RODRÍGUEZ-ARRIOJA et al., 2003; STAEBLER et al., 2005; GRIERSON et al., 2004). No Brasil, a PMWS foi diagnosticada primeiramente em 2000 em Santa Catarina (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2000; CIACCI-ZANELLA et al., 2001), mas estudos retrospectivos demonstraram que o PCV2 estava presente nos suínos desde 1988 (CIACCI-ZANELLA et al., 2006). A doença foi descrita em outros estados do País como: Rio Grande do Sul (PESCADOR et al., 2003), Rio de Janeiro (FRANÇA et al., 2005a), Paraná, São Paulo (CASTRO et al., 2003), Minas Gerais (BARBOSA, 2005) e Espírito Santo (CHIARELLI et al., 2005), afetando significativamente suínos de vários locais e gerando grandes prejuízos à suinocultura brasileira (CIACCI-ZANELLA e MORÉS, 2003; CIACCI-ZANELLA et al., 2006). A principal rota de transmissão do vírus é a oro-nasal através do contato direto com fezes, urina e secreções contaminadas, assim como o sêmen contaminado (LAROCHELLE et al., 2000; KIM et al., 2001; ROSE et al., 2003). Além disso, pode ser transmitido verticalmente da fêmea suína para o feto (PENSAERT et al., 2004; MALDONADO et al., 2005). Como o PCV2 pode estar associado a outras doenças, atualmente, tem sido utilizado o termo, Porcine Circovirus-Associated Diseases - PCVAD (Doenças associadas à circovirose suína) (OPRIESSNIG et al., 2007; GILLESPIE et al., 2009). A manifestação do PCV2 associado a outros patógenos pode ocasionar diferentes síndromes, como: a PMWS, a Síndrome de Dermatite e Nefropatia suína (SDNS), o PCV2 associado à problemas reprodutivos, o PCV2 associado ao tremor congênito, associado à enterites e associado a doenças respiratórias. O PCV2 gera manifestações clínicas como palidez corporal, atraso no crescimento, emagrecimento progressivo, algumas vezes com icterícia, aumento dos linfonodos inguinais, sintomas respiratórios

(taquipnéia, dispnéia e tosse) e digestivos (diarréia), os quais não regredem com tratamentos antimicrobianos de uso comum na suinocultura (HARDING, 2004; OPRIESSNIG et al., 2007).

A PMWS é uma síndrome emergente associada com altas taxas de mortalidade de suínos nas fases de creche e terminação (ALLAN et al., 1998). Assim, o PCV2 afeta o sistema imune ocasionando lesões no tecido linfóide e podendo facilitar a co-infecção com outros patógenos, como o PPV1 (ROEHE et al., 2007). Em infecções concomitantes com PCV2, o PPV1 pode atuar de forma sinérgica, aumentando a severidade das lesões (ALLAN et al., 2000; KENNEDY et al., 2000; ELLIS et al., 2004). Foi demonstrado que o PCV2 é essencial, mas não é suficiente para expressão da PMWS em suínos gnotobióticos, demonstrando que é necessário outro co-fator infeccioso, como o PPV1 para causar a síndrome (KRAKOWKA et al., 2000). A comparação de subpopulações de linfócitos em suínos experimentalmente infectados com PCV2 e/ou parvovirus por citometria de fluxo mostrou que, quando ocorre co-infecção com PPV1 e PCV2, a resposta imunológica é maior do que quando os vírus atuam sozinhos na infecção (KIM e CHAE, 2003). Assim, observa-se que são necessários mais estudos para entender a resposta imunitária dos suínos frente à infecções de PPV1 e co-infecções com outros vírus que desencadeiam síndromes reprodutivas. A emergência do PCV2, associado à co-infecção com PPV1, pode ter interferido na apresentação da infecção, tornando a parvovirose suína uma virose importante relacionada aos problemas reprodutivos em fêmeas suínas no Brasil (FERNANDES et al., 2006).

Além disso, existe a co-infecção com outras viroses. Estudos apontam a maior prevalência de Torque teno sus virus (TTV) em animais com PMWS do que em animais sem PMWS (KEKARAINEN et al., 2006; ELLIS et al., 2008). Outro estudo de prevalência de TTV1 e TTV2 em populações de suínos com PMWS e doença respiratória suína no Japão demonstrou que não existe relação significativa na prevalência entre os genótipos de TTVs e que estes vírus estão presentes na população de suínos com PMWS (TAIRA et al., 2009). O TTV é um vírus amplamente distribuído e pertence à família *Anelloviridae* (ICTV, 2009). O primeiro isolado de TTV foi realizado a partir de um humano com hepatite (NISHIZAWA et al., 1997). Em humanos, o vírus é ubíquo e ainda não se conhece a relação com uma doença específica (JELCIC et al., 2004). Após, foi detectado em animais domésticos, incluindo suínos, galinhas, vacas, ovelhas, gatos e cachorros (LEARY et al., 1999; OKAMOTO et al.,

2002). Um estudo recente realizado por Lee et al. (2010), quantificou TTV no soro de suínos afetados com PCVAD e animais negativos para PCV2. Os resultados indicaram que não existem diferenças significativas nas cargas virais de TTV entre os dois grupos de animais, concluindo que apesar do TTV estar presente em animais com PCVAD, pode não estar envolvido na doença. Além da detecção do TTV1 e TTV2 em suínos infectados por PCV2 apresentando a PMWS, também foi detectado um novo vírus, o *porcine boca-like virus*, do qual pertence ao gênero *Bocavirus* (BLOMSTROM et al., 2009).

Outros agentes que podem estar associados ao PCV2, como o PRRSV, 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; HANSEN et al., 2010). O PRRSV causa anorexia, abortos (no terço final da gestação), natimortos e neonatos fracos, gerando perdas reprodutivas, como o PPV1 (CHRISTIANSON et al., 1993; MENGELING et al., 2000). Em decorrência da imunodepressão causada pela síndrome, pode facilitar a infecção por agentes secundários, como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* e *Streptococcus suis* (DONE e PATON, 1995). Entretanto, o PRRSV é capaz de produzir a síndrome mesmo sem a presença de outros agentes infecciosos (DEA et al., 1992; CHRISTIANSON et al., 1993; ROSSOW et al., 1994). Um estudo retrospectivo analisou o número de casos de PCVAD e suas co-infecções em amostras de campo nos Estados Unidos, demonstrando que mais de 98% dos suínos tiveram co-infecções, sendo que 52% tiveram co-infecção com PRRSV, 36% com *M. hyopneumoniae*, 15% com PPV, 14% com bactérias que causam septicemia, 7,6% com bactérias que causam pneumonia e 5,4% com vírus da influenza suína. Infecções somente com o PCV2 ocorreram em 1,9% dos casos (PALLARES et al., 2002). Recentemente, no Brasil, foi detectada a presença de PCV2 e co-infecções com PPV1 e com novos parvovírus, (PPV2 e PPV3 – hokovirus suíno) em tecidos de leitões com PMWS adquirida naturalmente, além da detecção de TTV1 e TTV2 (SOUZA et al., 2010). Como existem muitos agentes patogênicos envolvidos na PCVAD, o principal agente associado ao PCV2 causador destas síndromes ainda não está claramente elucidado e são necessários mais estudos para saber qual o papel de cada patógeno envolvido na doença.

Os objetivos do presente trabalho foram os seguintes: no primeiro artigo foi estabelecer a PCR em tempo real TaqMan[®] para quantificação de PPV1 em amostras de soro utilizando a região gênica NS1. No segundo artigo, foi estudar co-infecções de PCV2 com parvovirus (PPV1, PPV2 e PHoV) e anelovirus (TTV1 e TTV2) em diferentes *pools* de órgãos de leitões naturalmente apresentando a PMWS e a caracterizar filogeneticamente o PHoV.

ARTIGO 1**TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of porcine parvovirus**

Artigo a ser submetido à publicação no periódico Journal of Virological Methods.

Artigo formatado conforme as normas do periódico.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of porcine parvovirus

Carine Kunzler Souza¹
Nilo Ikuta²
Danielle Gava³
André Felipe Streck¹
Ângela Oliveira Corbellini¹
Luciane Dubina Pinto¹
Cláudio Wageck Canal¹

Complete postal addresses:

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

² Simbios Biotecnologia, Universidade Luterana do Brasil – Ulbra (Av. Farroupilha, 8001, Prédio 22, 3º andar, CEP 92425-900, Canoas, Brazil).

³ Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090 Prédio 42.602 CEP 91540-000, Porto Alegre, Brazil).

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

33

34

35

36

37 **Abstract**

38

39 A real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) using a TaqMan probe based on
40 NS1 gene was developed to detect and quantify porcine parvovirus (PPV) in serum
41 samples. The specificity, sensitivity, reproducibility and quantitative range of the real
42 time PCR were evaluated and compared with conventional nested PCR (nPCR). The
43 standard curve of real-time PCR was linear ranging from 6×10^6 genome copies
44 equivalent/mL (gce/mL) to 2×10^3 gce/mL with a square of the correlation coefficient
45 (R^2 value) of 0.98. No cross-reactivity was detected with closely related parvovirus or
46 with viruses that causes similar symptoms and all PPV strains showed fluorescence in
47 the assay. Comparing these techniques, 11 samples were positive in both tests and
48 nPCR detected four additional samples. The concordance, sensitivity and specificity
49 between the techniques were 98%, 73% and 100%, respectively. In conclusion, nPCR
50 showed more sensitivity, however, real-time PCR has several advantages such as
51 rapidly, high reproducibility, precision, not requires post-PCR analysis and viral load
52 quantification that cannot be provided by conventional PCR. Therefore, real-time PCR
53 is a useful tool for diagnosis and quantification of PPV in serum samples and can be
54 used for viremia studies, epidemiology and monitoring PPV infection in swine herds.

55

56 **Keywords:** Porcine parvovirus, detection, real-time PCR, diagnosis, swine

57

58

59

60

61

62

63

64

65 1. Introduction

66 Porcine parvovirus (PPV) belongs to the family *Parvoviridae*, genus *Parvovirus*,
67 which is a small non-enveloped virus and highly stable in extreme temperature, pH
68 conditions (Horwitz et al., 1996) and disinfectants (Eterpi et al., 2009). PPV has been
69 reported worldwide and is an important causative agent of reproductive failure
70 generating a lot of economic losses in swine herds. Gilts are the most susceptible class
71 that the infection causes stillbirth, mummified fetuses, small litters, abortion and
72 infertility (Cartwright and Huck, 1967; Thacker and Gonzalez, 1988; Mengeling et al.,
73 2000). Although the disease is subclinical in non-pregnant pigs, PPV infection has been
74 associated with skin lesions in piglets (Kresse et al., 1985; Lager and Mengeling, 1994),
75 interstitial nephritis in slaughter pigs (Drolet et al., 2002) and non-suppurative
76 myocarditis in lactating piglets (Bolt et al., 1997). In addition, PPV has gained
77 importance as a infectious cofactor in postweaning multisystemic wasting syndrome
78 (PMWS) and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) considering that
79 PPV enhances the clinical effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) (Allan et al.,
80 1999; Krakowa et al., 2000) and PRRS virus (Lyo et al., 2001; Ellis et al., 2004) due to
81 the immunedepression caused by these syndromes.

82 PPV genome consists of a negative oriented, single stranded DNA molecule of
83 approximately 5 kb in size (Bergeron et al., 1996). PPV genome has two large open
84 reading frames (ORFs). The non-structural proteins (NS1, NS2 and NS3) are encoded
85 by ORF1 and ORF3, which their function are related on virus replication and present a
86 highly conserved region. The viral capsid proteins are encoded (VP1, VP2 and VP3) by
87 ORF2, which presents antigenic variability (Shackelton et al., 2007). Virus isolation is a
88 classical diagnostic method, but PPV isolation in cell culture is laborious and cannot be
89 achieved for all PPV strains (Kim and Chae, 2004). The hemagglutination assay (HA)
90 and hemagglutination-inhibiting assay (HIA) has been reported (Joo et al., 1976b; Hogg
91 et al., 1977), however are laborious diagnosis and have the necessity to obtain fresh
92 erythrocytes to carry out the assay.

93 Molecular diagnosis is being increasingly used to detect virus nucleic acids, as in
94 situ hybridization, conventional polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR
95 (nPCR) (Molitor et al., 1991; Soares et al., 1999; Kim and Chae, 2003). Comparing
96 these techniques, nPCR has shown more sensitivity than conventional PCR and HA

97 tests (Soares et al., 1999). Nevertheless, nPCR has higher contamination risk and is a
98 labor-intensive assay. Recently, real-time PCR has been developed as a diagnostic tool
99 to determine the viral load in clinical samples for an increasing number of targets and
100 made it possible eliminate post-PCR processing such as electrophoresis (Niesters,
101 2001).

102 The SYBR Green I based real-time PCR has been used to detect VP2 gene of
103 PPV in field samples and presented more sensitivity than conventional PCR (Wilhelm
104 et al., 2006). Moreover, SYBR Green I has been used in studies which quantify PPV
105 viral load in tissues (Wilhelm et al., 2005; Miao et al., 2009). However, as SYBR Green
106 I dye is a DNA intercalant could be less specific than assay based on probes. The
107 development of fluorogenic PCR utilizing the 5'– 3' nuclease activity of *Taq* DNA
108 polymerase has shown higher specificity and sensitivity to detect viruses (Holland et al.,
109 1991; Warrilow et al., 2002). Real-time PCR using molecular beacons have shown high
110 specificity and sensitivity for swine viruses in clinical samples (blood, serum and
111 tissues), even for PPV (McKillen et al., 2007). Furthermore, recent studies have shown
112 higher sensitivity and specificity for PPV using TaqMan[®] probe for real-time PCR
113 when compared with conventional PCR (Chen et al., 2009; Song et al., 2010). Then, the
114 detection and quantification of PPV by real time PCR could be a useful tool for viremia
115 studies, epidemiology and herd monitoring.

116 The aim of this study was to develop a real-time PCR TaqMan-based for the
117 detection and quantification of PPV using primers for NS1 gene.

118

119 **2. Material and Methods**

120

121 2.1 Viruses and samples preparation

122 The PPV strain N30 was kindly provided by Embrapa Suínos e Aves,
123 Concórdia, Brazil, and was propagated in the ST1 cell line (Swine Testis lineage) and
124 used as a standard virus for the detection of PPV by real-time PCR. The symptomatic
125 and phylogenetically related pathogens as porcine circovirus (PCV-2), canine
126 parvovirus (CPV), feline panleukopenia virus (FPV), Leptospirosis and Erisipela were
127 used as exclusion group for the real-time PCR specificity. A total of one hundred
128 seventy seven field serum samples were collected to evaluate casuistic of PPV in the

129 real-time PCR. The clinical samples were collected from different herds and were
130 divided in five groups according with clinical signs (healthy or wasting) and class (gilt,
131 sow or piglet): Group 1 (G1): 27 serum samples from healthy gilts unvaccinated; Group
132 2 (G2): 40 serum samples from healthy gilts vaccinated to PPV; Group 3 (G3): 24
133 serum samples from healthy sows (different order of parity); Group 4 (G4): 41 serum
134 samples from healthy piglets; Group 5 (G5): 45 samples from wasting piglets.

135 The DNA extraction from serum (100 μ L) was carried out using a silica Kit
136 (NewGene, Simbios Biotecnologia, Brazil). After added 900 μ L of Lysis solution,
137 mixed thoroughly vortex and incubated at room temperature for 10 minutes. The silica
138 solution (4mg/ 20 μ L) was added 20 μ L in each sample and incubated for 10 minutes
139 mixing by inversion each 2 minutes. Then, samples were centrifuged at 10.000 rpm, and
140 the supernatants were dumped. After that were performed five washings with 150 μ L
141 each (Wash solution A – 2 times, Wash solution B – 2 times and Wash solution C – 1
142 time). In each washing, samples were mixed thoroughly vortexing, centrifuged at
143 10.000 rpm, and the supernatants were dumped. The silica pellet was dried at 60°C for
144 10 minutes; DNA was eluted with 50 μ L of elution buffer and stored at -20°C.

145

146 2.2 Primers and probe for real time-PCR

147 Nucleotide sequences of PPV strains/isolates based on NS1 gene were retrieved
148 from Genbank and aligned using MEGA (version 4.0) software (Tamura et al., 2007).
149 The primers and probe set were selected using the Primer Express (version 2.0) software
150 and were based on a highly conserved sequence within the NS1 region of the PPV
151 genome. The primers were selected to detect PPV sequences in NS1 region (sense - 5'-
152 ATT TCA TGG GCC AGC ATC AA -3', genome position: 1476-1495); (antisense 5'-
153 TGC ATT GTA GCA ACC AAC ATT ACC -3', genome position: 1537-1560) and
154 (TaqMan[®] probe – 5'- [VIC] TGC TCA ACA CAT TGC AAA CTT GGT [TAMRA] -
155 3', genome position 1512-1535). The genome position was based on Kresse Strain
156 sequence (accession number: U44978).

157

158

159

160

161 2.3 Construction of standard plasmids for real-time PCR

162 To produce a PPV standard curve for real-time PCR was made a semi-nested
163 PCR to amplify a product containing 205 bp covering a part of the NS1 gene. The first
164 round PCR were used two oligonucleotides (P1 - sense: 5'- ATA CAA TTC TAT TTC
165 ATG GGC CAG C -3'; P6 - antisense: 5'- TAT GTT CTG GTC TTT CCT CGC ATC -
166 3'), and the second round PCR were repeated the sense oligonucleotides (P1) of the first
167 round PCR and were used antisense oligonucleotides (P5 antisense: 5'- ACC TGA
168 ACA TAT GGC TTT GAA TTG G- 3') (Soares et al., 1999). This PCR product was
169 cloned into the vector pCR 2.1 - T. A. Cloning Kit[®] according to the instructions of the
170 manufacturer (Invitrogen, USA). The resulting PPV plasmid (pPPV), was used to
171 transform in *Escherichia coli JM109 lineage* cells following instructions of the
172 manufacturer (Exponencial Biotecnologia, Brazil) and was purified following as
173 described protocol (Sambrook et al., 1989). The concentration of the pPPV preparation
174 was determined by Fluorometer Qubit[®] (Invitrogen, USA), using fluorescent dye to
175 quantify biomolecules of DNA. The pPPV was confirmed by sequencing and stored at -
176 20°C for later use in the standard curve. Serial 5 fold dilution was made with
177 concentrate pPPV DNA diluted in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) to use in
178 each assay.

179

180 2.4 TaqMan[®] - based real-time PCR

181 Real-time PCR assays using the TaqMan[®] probe were carried out in a micro-
182 reaction tube (Applied Biosystems, USA). The reaction mixture for each tube consisted
183 of 1.5 U Taq DNA Polimerase and 15 µL of 2×mastermix NewGene (supplied by
184 Simbios Biotecnologia), primers and probes (final concentrations) 0.125 µM
185 fluorogenic VIC-TAMRA labeled PPV probe, 0.50 µM forward primer and reverse
186 primer, 2.0 µL of DNA solution, and distilled water to 30 µL. The thermal profile for
187 the assay was one cycle of 95°C for 3min., followed by 40 cycles of 95°C for 15s and
188 60°C for 60s. PCR amplification was performed by using the StepOne Real-time
189 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). The length of the amplified product was
190 about 87 bp. Positive and negative reference samples were tested along with the
191 unknown samples in each run.

192

193 2.5 Conventional nPCR

194 The nPCR amplification based on NS1 gene was carried out as already described
 195 (Soares et al., 1999) with the following modifications: initial heating at 95°C for 2 min.,
 196 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 45 s, extension at 72°C
 197 for 45 s, and final extension at 72°C for 5 min. for both PCR rounds. Amplification
 198 products (137 bp) were electrophoresed in 2% agarose gels with 40 mM Tris-acetate, 1
 199 mM EDTA pH 8.0 (TAE) running buffer and stained with 0.1 µg/mL of BlueGreen I
 200 (LGC, Brazil).

201

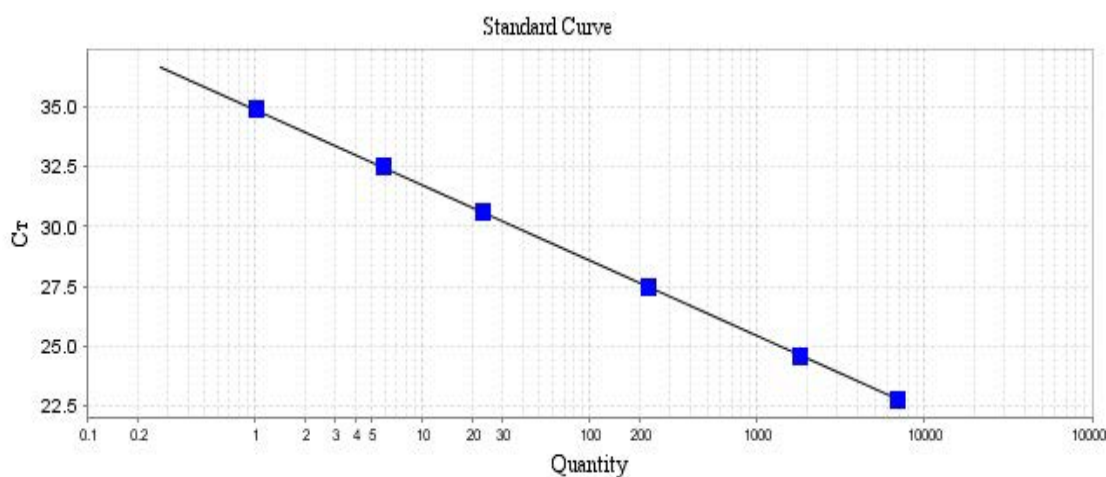
202 **3. Results**

203

204 3.1 Optimization strategies of a standard curve for real-time PCR

205 The pPPV concentration measured by Qubit Fluorimeter was 2,7 ng/µL, which is
 206 required for the standard curve calculation in quantitation assays. The pPPV DNA
 207 concentration was equivalent to 6×10^8 gce/ µL calculated with the following formula:
 208 number of copies = (amount (ng) x 6.022×10^{23}) / (length (bp) x 1×10^9 ng/g x 649 g/
 209 mole of bp). The standard curve was used with pPPV DNA 5-fold diluted in TE buffer
 210 ranging with 6.000.000 gce/mL to 2.000 gce/mL. The assays were linear over a
 211 6.000.000 gce/ mL range of template DNA with square of the correlation coefficient
 212 values (R^2) of 0.98 (Figure 1).

213



214

215 ■ VIC- probe $R^2 = 0.99$ Slope = -3.15

216 Figure 1. Real-time standard curve (based on plasmid DNA) indicates linearity of
 217 TaqMan[®] reactions for NS-1. The x-axis represents copies of plasmid DNA in 5-fold

218 dilutions, and the y-axis represents the fluorescence data used for cycle threshold (ct)
 219 determinations. The assays were linear ranging 600.000 gce/mL to 2.000 gce/mL of
 220 pPPV with R^2 values (square of the correlation coefficient) of 0.99.
 221

222 3.2 Analytic sensitivity of real-time PCR

223 In order to determine the detection limit, the pPPV DNA was diluted serially 2-
 224 fold with TE starting with 10.000 gce/mL to 78 gce/mL. This assay was made in
 225 triplicate and repeated three times. The Ct values were ranging from 32.6 to 37.4 (Table
 226 1), showing that the detection limit was until 156 gce/mL, but the results presented more
 227 Ct linearity until 1.250 gce/mL. The coefficients of variation (CVs) values ranged 0% to
 228 3% (Table 1). The statistical analysis for analytic sensitivity was made with SPSS
 229 Software version 11. 5. 0 using PROBIT model test. The PROBIT analysis showed that
 230 real-time PCR detected 5.000 gce/mL of PPV in a probability of 100%. And under
 231 1.250 gce/mL the technique presented 50% or less probability of detection.
 232

233 Table 1. Results of limit detection of real-time PCR between assays.

gce/mL	Replicates <i>n</i>	Assay 1	Assay 2	Assay3	<i>Ct</i>		CV	Positives	
		<i>Ct</i> media	<i>Ct</i> media	<i>Ct</i> media	S.D	(%)	<i>n</i>		
10.000	9	32.5	32.1	33.1	32.6	0.5	1.5	7	
5.000	9	32.3	33.6	34.1	33.3	0.9	2.7	8	
2.500	9	33.7	34.6	34.4	34.2	0.5	1.4	7	
1.250	9	36.0	36.0	36.0	36.0	0.0	0	6	
625	9	34.9	36.7	36.8	36.1	1.1	3.0	5	
313	9	36.6	36.9	38.4	37.3	1.0	2.7	5	
156	9	37.4	-	-	37.4	-	-	2	
78	9	-	-	-	-	-	-	0	

234

235

236 3.3 Reproducibility of the real-time PCR

237 The reproducibility was evaluated intra-assay, which was performed one assay
 238 with nine 5-fold dilutions repetitions of the pPPV template ranging (6.000.000 to 48.000
 239 gce/mL) and the CVs were evaluated ranging 1.3% to 1.6%. And the inter-assay
 240 evaluation was performed with three assays with triplicates each 5-fold dilution and
 241 CVs evaluated ranged 1.5% to 1.8% (Table 2).
 242

243 Table 2. Reproducibility: *Ct* intra- and inter-assay variability of real-time PCR.

gce/mL	<i>n</i>	Intra-assay		CV(%)	Inter-assay		CV(%)
		Ct	S.D.		Ct	S.D.	
6.000.000	9	22.5	0.3	1.3	22.5	0.3	1.6
1.200.000	9	25.3	0.4	1.6	25.0	0.4	1.5
240.000	9	27.5	0.5	1.6	27.4	0.5	1.8
48.000	9	30.0	0.7	2.3	29.4	0.5	1.8

244

245 3.4 Specificity of real-time PCR

246 In the specificity test in real-time PCR were evaluated 6 PPV strains as an
 247 inclusion group. All the PPV strains showed fluorescence in the assay. For the exclusion
 248 group were used pathogens symptomatic and phylogenetically related to PPV as PCV-2,
 249 CPV, FPV, Erisipela and leptospirosis. There were no cross-reactions detected with
 250 these related pathogens. The real-time PCR showed 100% of specificity.

251

252 3.5 Comparison of field serum samples by real-time PCR and conventional nPCR

253 Comparing real-time PCR and conventional nPCR, a total of 177 field serum
 254 samples were evaluated in both tests. The results showed that 11 serum samples were
 255 positive for both techniques. Conventional nPCR detected four serum samples more
 256 than real-time PCR. None serum sample was negative for conventional nPCR and
 257 positive for real-time PCR. And a total of 162 serum samples were negative for both
 258 techniques (Table 3). Comparing these results per group, all serum samples of Group 1
 259 and 2 were negative for PPV in both techniques. Group 3 presented three positives of 24
 260 samples in conventional nPCR and none positive sample in the real-time PCR. Group 4
 261 presented three positives of 41 samples in the conventional nPCR and 2 of these
 262 samples were positive in real-time PCR. And Group 5 presented more positives than
 263 other groups (9 of 45) serum samples in both techniques. The positive serum samples
 264 for PPV in the real-time PCR presented DNA viral loads ranging 794.769 gce/mL to
 265 1.025 gce/mL (Table 4). Comparing these techniques, the results showed 98% of
 266 concordance, 73% of sensitivity and 100% of specificity.

267

268 Table 3. Comparison between conventional nPCR and real-time PCR with serum
269 samples.

Real-time PCR assay (<i>n</i>)	Conventional nPCR assay (<i>n</i>)		
	Positive	Negative	Total
Positive	11	0	11
Negative	4	162	166
Total	15	162	177

270

271

272 Table 4. Results of positive field serum samples in conventional nPCR and DNA viral
273 loads in real-time PCR. The table showed Ct value and gce/mL of each positive sample
274 in real-time PCR. Group 3 were serum samples from healthy sows in different order of
275 parity; Group 4 were serum samples from healthy piglets; Group 5 were serum samples
276 from wasting piglets.

277

Sample	Group	Ct value	gce/mL	nPCR
29s	G5	25,8	794.769	+
36s	G5	27,6	217.019	+
30s	G5	28,5	115.841	+
51	G4	29,7	80.890	+
25t	G5	31,4	17.270	+
29t	G5	32,1	10.950	+
34s	G5	32,9	10.400	+
62	G4	34,4	2.200	+
7s	G5	34,7	2.090	+
3s	G5	34,7	2.020	+
31s	G5	35,0	1.025	+
45	G4	0	< 1000-	+
53	G3	0	< 1000-	+
72	G3	0	< 1000-	+
82	G3	0	< 1000-	+

278

279 4. Discussion

280 Real-time PCR has been used widely as a sensitive, specific and rapid method
281 for detection of a range viral nucleic acid sequences (Kubista et al., 2006; Lemmon and
282 Gardner, 2008).

283 In this study, a real-time PCR was established for quantification of DNA viral
284 load of PPV in serum samples based on detection of the NS1 gene. In order to establish
285 this technique, specificity, sensitivity and quantitative range of real-time PCR were
286 evaluated. The standard curve of real-time PCR was linear ranging 6×10^6 gce/mL to 2
287 $\times 10^3$ gce/mL with a R^2 value of 0.98. Pathogens tested for specificity such as PCV-2,

288 CPV, FPV, Erisipela and Leptospirosis showed no *Ct*, and all the PPV strains tested
289 showed fluorescence in the assay. Other studies have been shown that real-time PCR
290 using TaqMan[®] probe had higher specificity in the assays (Chen et al., 2009; Song et al.,
291 2010). The analytic sensitivity of the real-time PCR presented more linearity until 5000
292 gce/mL with 100% of chance to detect PPV. Otherwise, the statistical analysis
293 (PROBIT) showed that the detection limit was 1.250 gce/mL with 50% of chance to
294 detect PPV. In these groups (1, 2 and 3), the gilts and sows were healthy and lived in a
295 herd with a high sanitary conditions, that could justify few number of positives samples,
296 which some samples were positives in nPCR, could not be detected by real time PCR.
297 In the group 4, the animals presented three positive samples in nPCR and two of these
298 were positive for real-time PCR. These piglets were healthy but lived with low sanitary
299 conditions with high risk of infections, which could explain few number of positives for
300 PPV, however, one sample showed high viral load (80.890 gce/mL). And the group 5,
301 presented the major number of positives animals for PPV. These animals were wasting
302 and presented low and high viral loads ranging 1.025 gce/mL to 79.4769 gce/mL (Table
303 3). Comparing these results, nPCR detected four serum samples more than real-time
304 PCR, demonstrating more sensitivity, due to nPCR has a couple of primers more and
305 two PCR reactions than a conventional PCR. Other studies compared real-time PCR
306 with conventional PCR showed higher sensitivity in real-time PCR assays (Warrilow et
307 al., 2002; Chen et al., 2009; Song et al., 2010). The real-time PCR has several
308 advantages than conventional PCR assays, such as is highly specific, rapid assay
309 because it is not required post-PCR analysis. Unlike, nPCR has highly risk of amplicon
310 contamination during the assay process and could produce a false positive (Molitor et
311 al., 1991; Soares et al., 1999). To avoid false positive results in nPCR some extensive
312 precautions were used as previously described by Soares et al. (1999). In each step of
313 sample handling was performed in different laboratories (DNA extraction, DNA
314 amplification, nPCR, eletrophoresis and gel analysis. Also, in each step of sampling
315 handling were used new gloves, the samples were analysed no more than ten samples
316 for each reaction and were used negative control for each ten samples.

317 The reproducibility was evaluated with intra-assay and inter-assay, which
318 showed linearity values ranging 6.000.000 to 48.000 gce/mL and CVs ranging 1.3% -
319 1.6% and 1.5% - 1.8%, respectively. The reproducibility in real-time PCR is higher than

320 other quantification methods. PPV can be quantified by real-time PCR with precision
321 that can't be provided by conventional PCR, and the viral load could be useful in
322 viremia studies, pathogenicity studies and monitoring herds (Miao et al., 2009, Fujiwara
323 et al., 2011). A competitive quantitative PCR is widely used for quantification,
324 however, it is needed an internal control competitor, which must be constructed and
325 characterized besides requires post-PCR electrophoresis (Liu et al., 2000).

326 The SYBR Green I based real-time PCR has been established for PPV detection
327 (Wilhelm et al., 2006); but is known that this method can generate false positives,
328 because SYBR Green I dye is a double-stranded DNA intercalant that could bind every
329 double-stranded DNA in the reaction, even non-specific amplicons. Therefore, TaqMan
330 probes and molecular beacons have been provided highly reproducibility, sensitivity
331 and specificity for virus diagnostic (Heid et al, 1996; Chen et al., 2009; Song et al,
332 2010). Since conventional nPCR presents more sensitivity than conventional PCR
333 (Prihod'ko et al., 2003) could be expected that real-time PCR presented less sensitivity
334 than conventional nPCR. Then, the sensitivity of real-time PCR was about 73%
335 comparing with conventional nPCR.

336 In conclusion, the TaqMan-based real-time PCR assay described in this study for
337 the detection and quantification of PPV based on highly conserved region (NS1 gene)
338 has been shown to be rapid, easy to handle, highly specific and reproducible. Despite
339 the sensitivity was less than nPCR, these features make it a useful tool for laboratory
340 quantification of PPV in field serum samples besides to contribute in molecular
341 epidemiology and diagnosis of PPV infections in swine populations.

342

343 **5. Acknowledgements**

344 Financial support was provided through the Conselho Nacional de
345 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), FAPERGS and
346 Propesq/UFRGS. We are thankful to the veterinarians who collected the serum samples
347 and to the technicians who helped in the real-time PCR assays. Also thankful to Simbios
348 Biotecnologia, Brazil, that kindly supplied the DNA extraction kits and Mastermix for
349 real-time PCR (NewGene).

350

351

352

353 **6. References**

- 354 Allan, G.M., Kennedy, S., Mcneilly, F., Foster, J.C., Ellis, J.A., Krakowka, S.J.,
355 Meehan, B.M., Adair, B.M., 1999. Experimental reproduction of severe wasting disease
356 by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Path.*
357 121, 1-11.
- 358 Bergeron, J., Hébert, B., Tijssen, P., 1996. Genome Organization of the Kresse Strain of
359 porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with
360 those of NADL-2 and field isolates. *J. Virol.* 70, 2508-2515.
- 361 Bolt, D.M., Hani, H., Mülle, E., Waldvogel, A.S., 1997. Non-suppurative myocarditis in
362 piglets associated with porcine infection. *J. Comp. Pathol.* 117, 107-118.
- 363 Cartwright, S.F., Huck, R.A., 1967. Viruses isolated in association with herd infertility,
364 abortions and still-births in pigs. *Vet. Rec.* 81, 196-197.
- 365 Chen, H.Y., Li, X.K., Cui, B.A., Wei, Z.Y., Li, X.S., Wang, Y.B., Zhao, L., Wang,
366 Z.Y., 2009. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of
367 porcine parvovirus. *J. Virol. Met.* 156, 84-88.
- 368 Drolet, R., D'allaire, S., Larochelle, R., Magar, R., Ribotta, M., Higgins, R., 2002.
369 Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. *Vet.*
370 *Rec.* 150, 139-143.
- 371 Ellis, J., Clark, E., Haines, D., West, K., Krakowka, S., Kennedy, S., Allan, G. M.,
372 2004. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. *Vet. Mic.* 98, 159-163.
- 373 Eterpi, M., McDonnell, G., Thomas, V., 2009. Disinfection efficacy against
374 parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Inf.* 73, 64-70.
- 375 Fujiwara, K., Kojima, H., Yasui, S., Okitsu, K., Yonemitsu, Y., Omata, M., Yokosuka,
376 O., 2011. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. *J Med.Virol.* 83,
377 201-7.
- 378 Heid, C.A., Stevens,J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time Quantitative PCR.
379 *Gen. Res.* 6, 986-994.
- 380 Hogg, G.G., Lenghaus, C., Forman, A.J., 1977. Experimental porcine parvovirus
381 infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody
382 formation. *J. Comp. Pathol.* 87, 539-549.
- 383 Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific
384 polymerase chain reaction product by utilizing the 5–3 exonuclease activity of *Thermus*
385 *aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88, 7276–7280.
- 386 Horwitz, M.S. 1996. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. in: Fields, B.N.;
387 Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp
388 2587.
- 389 Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., Johnson R.H., 1976b. A standartized
390 heamagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Aust. Vet. J.* 52, 422-
391 424.

- 392 Kim, J., Chae, C., 2003. Multiplex nested PCR compared with in situ hybridization for
393 the differentiation of porcine circoviruses and porcine parvovirus from pigs with
394 postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. J. Vet. Res.* 67, 133-137.
- 395 Kim, J., Chae, C., 2004. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction,
396 immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus
397 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J. Vet. Diagn.*
398 *Invest.* 16, 45-50.
- 399 Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., Allan, G., 2000. Viral
400 Wasting syndrome of swine: Experimental reproduction of postweaning multisystemic
401 wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and
402 porcine parvovirus. *Vet. Path.* 37, 254-263.
- 403 Kresse, J.I., Taylor, W.D., Stewart, W.W., Eernisse, K.A., 1985. Parvovirus infection in
404 pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Vet. Mic.* 6, 525-531.
- 405 Kubista M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonaćk, J., Lind, K., Sindelka,
406 R., Sjoćback, R., Sjoćgreen, B., Stroćmbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-
407 time polymerase chain reaction. *Mol. Asp. Med.* 27, 95-125.
- 408 Lager, K.M., Mengeling, W.L., 1994. Porcine parvovirus associated with cutaneous
409 lesions in piglets. *J. Vet. Diag. Inv.* 6, 357-359.
- 410 Lemmon, G.H., Gardner, S.N., 2008. Predicting the sensitivity and specificity of
411 published real-time PCR assays. *A. Clin. Mic. Antimic.* 7, 18, 1-10.
- 412 Liu, Q., Wang, L., Willson, P., Babiuk, L.A., 2000. Quantitative, competitive PCR
413 analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic
414 wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3474-3477.
- 415 Lyoo, K., Park, Y., Park, B., 2001. Prevalence of porcine reproductive and respiratory
416 syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses
417 and pigs with respiratory problems in Korea. *J. Vet. Sci.* 2 (3), 201-207.
- 418 McKillen, J., Hjertner, B., Millar, A., McNeilly, F., Belak, S., Adair, B., Allan., G.
419 2007. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *J. Virol. Met.* 140,
420 155-165.
- 421 Mengeling, W.L., Lager, K.M., Vorwald, A.C., 2000. The effect of porcine parvovirus
422 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive
423 performance. *Ani. Repr. Sci.* 2, 199-210.
- 424 Miao, L.F., Zhang, C.F., Chen, C.M., Cui, S.J., 2009. Real-time PCR to detect and
425 analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses. *Vet. Mic.*
426 138, 145-149.
- 427 Molitor, T.W., Oraveerakul, K., Zhang, Q.Q., Choi, C.S., Ludemann, L.R., 1991.
428 Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus.
429 *J. Virol. Met.* 32, 201-211.
- 430 Niesters, H.G.M., 2001. Quantitation of Viral Load Using Real-Time Amplification
431 Techniques. *Met.* 25, 419-429.

- 432 Prikhod'ko, G.G., Reyes, H., Vasilyeva, I., Busby, T.F., 2003. Establishment of a
433 porcine parvovirus (PPV) DNA standard and evaluation of a new LightCycler nested-
434 PCR assay for detection of PPV. *J. Virol. Met.* 111, 13-19.
- 435 Sambrook, R., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory*
436 *manual*, second ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- 437 Shackelton, L.A., Hoelzer, K., Parrish, C.R., Holmes, E.C., 2007. Comparative analysis
438 reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 88, 3294-3301.
- 439 Soares, R.M., Durigon, E.L., Bersano, J.G., Richtzenhain, L.J., 1999. Detection of
440 porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the
441 highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Met.* 78, 191-198.
- 442 Song, C., Zhu, C., Zhang, C., Cui, S., 2010. Detection of porcine parvovirus using a
443 TaqMan-based real-time PCR with primers and probe designed for the NS1 gene. *Virol.*
444 *J.* 7, 353.
- 445 Thacker, B.J., Gonzalez, P.L., 1988. Infectious reproductive diseases in swine. *Comp.*
446 *Conint. Edu. Vet. Pract.* 10, 669-680.
- 447 Warrilow, D., Northill, J.A., Pyke, A., Smith, G.A., 2002. Single rapid TaqMan
448 fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. *J. Med. Virol.*
449 66, 524-528.
- 450 Wilhelm, S., Zeeuw, E.J., Selbitz, H.J., Truyen, U., 2005. Tissue distribution of two
451 field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after
452 experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. *J. Vet. Med.*
453 *B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 52, 323-326.
- 454 Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H.J., Truyen, U. 2006. Real-time PCR protocol
455 for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J. Virol. Met.* 134, 257-260.

ARTIGO 2

Detection of novel porcine parvovirus and other viral co-infections in piglets naturally displaying postweaning multisystemic wasting syndrome

Artigo a ser submetido à publicação no periódico *Veterinary Microbiology*.

Artigo formatado conforme as normas do periódico.

1

2 **Detection of novel porcine parvovirus and other viral co-infections in piglets**
3 **naturally displaying postweaning multisystemic wasting syndrome**

4

5

6 Carine Kunzler Souza¹

7 Danielle Gava²

8 Ângela Oliveira Corbellini¹

9 Karla Ratje Gonçalves¹

10 André Felipe Streck¹

11 Luciane Dubina Pinto¹

12 Cláudio Wageck Canal¹

13

14 Complete postal addresses:

15

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

19 ² Setor de Suínos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
20 (Av. Bento Gonçalves, 9090 Prédio 42.602 CEP 91540-000, Porto Alegre, Brazil).

21

22 Corresponding author (C.W. Canal): Telephone: 55 51 3308-6926.

23 E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

24

25 **Abstract**

26 Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is an emerging worldwide
27 disease that affects swine performance causing significant economic losses. Infection
28 with porcine circovirus type 2 (PCV2) and probably other viral pathogens are the most
29 probable etiology of the disease. Polymerase chain reaction (PCR) for PCV2, porcine
30 parvovirus 1 (PPV1), torque teno sus virus 1 and 2 (TTV1 and TTV2) and porcine
31 hokovirus (PHoV) were performed to detect these viruses in different tissues (lymph
32 nodes, lungs, liver, spleen and kidneys) of piglets displaying PMWS. Also, eight
33 overlapping fragments of VP1/VP2 region of PHoV were amplified and sequenced for
34 phylogenetic analysis. All the samples were PCR positive for PCV2 and the other
35 viruses were detected in all herds, with the exception of TTV1. The samples presented
36 co-infections with TTV2 (86.8%), PPV1 (81.6%), PPV2 (73.7%), PHoV (55.3%) and
37 TTV1 (5.3%). The lymph node samples displayed the majority of the positive results for
38 all pathogens. In the phylogenetic analysis, Brazilian PHoV sequences were more
39 closely related to European sequences. The results indicate that piglets displaying
40 PMWS are PCV2 infected and can be co-infected with different parvovirus and torque
41 teno sus virus species.

42

43 **Key Words:** postweaning multisystemic wasting syndrome, porcine circovirus type 2,
44 PCR, co-infection, detection.

45

46

47

48

49 **1. Introduction**

50 Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) is an emerging
51 worldwide disease of swine that cause economically impact. The syndrome was first
52 described in Canada in 1991 and clinically, it is a multifactorial disease that causes
53 progressive weight loss, lymphadenopathy and increased mortality in 5-12 week old
54 pigs (Todd et al., 1991; Allan and Ellis, 2000). Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the
55 main viral agent of PMWS; however, a cofactor is frequently necessary to express the
56 syndrome (Krakowka et al., 2000; Krakowka et al., 2001). Infectious cofactors have
57 been identified which facilitate the replication of PCV2. Besides, infectious cofactors,
58 as management and genetics, were recognized for the expression of PMWS (Segalés et
59 al., 2005; López-Soria et al., 2011).

60 The first infectious agent identified was porcine parvovirus 1 (PPV1), which
61 associated with PCV2 increases the PMWS symptoms (Kennedy et al., 2000).
62 Parvoviruses are small, non-enveloped and ubiquitous that causes a range of diseases in
63 many animal species. Co-infections with PPV1 and porcine reproductive and respiratory
64 syndrome virus (PRRSV) could enhance the risk of PMWS development (Pogranichniy
65 et al., 2002). An association between PCV2 and torque teno sus virus genotype 1 and 2
66 (TTV1 and TTV2) has been reported in Europe and United States (Kekarainen et al.,
67 2006; Ellis et al., 2008). TTV are ubiquitous, have single-stranded DNA, and belongs to
68 the *Anelloviridae* family (ICTV, 2009). Studies have been shown high prevalence of
69 TTV in piglets with PMWS (Kekarainen et al., 2006; Ellis et al., 2008). However, the
70 presence of TTV in piglets with PMWS could not be involved with increased
71 pathogenicity (Lee et al., 2010).

72 Other viral infectious cofactors have been recognized and correlated with
73 PMWS in order to understand the disease, as porcine bocavirus, (Blomstrom et al.,
74 2009), confirming the presence of multiple viral infections in PMWS (Blomstrom et al.,
75 2010).

76 Since PPV2 was identified in swine sera in Myanmar, there are no reports of this
77 virus in swine population (Hijikata et al, 2001). Despite, porcine hokovirus (PHoV) was
78 identified in Hong Kong, China, closely related to human PARV4 (Jones et al., 2005;
79 Lau et al. 2008), and was co-detected in swine with PRRSV, there are no studies that
80 correlate the presence of PHoV in animals with PMWS. Recently, a study showed high
81 prevalence of porcine hokovirus (PHoV) in German wild boar populations (Adlhoch et
82 al., 2010).

83 As soon as it is known that PPV1 is an infectious co-factor for this syndrome, it
84 would not be surprising if other porcine parvovirus could be involved in PMWS. Until
85 now, there are no studies showing the presence of PPV2 and PHoV in PMWS.
86 Furthermore, the epidemiology, clinical significance and origin of these newly
87 identified parvovirus are still poorly understood.

88 The aim of the present study was to detect parvovirus (PPV1, PPV2 and PHoV)
89 and anellovirus (TTV1 and TTV2) presence in different pooled tissues of piglets
90 naturally displaying PMWS and to further analyze phylogenetically the VP1/VP2 region
91 of PHoV.

92

93

94

95

96 **2. Material and Methods**

97 2.1 Samples

98 The samples were collected in 2007, in Rio Grande do Sul State, Brazilian south
99 region. Eight herds of wasting piglets with clinical suspicion of PMWS from different
100 backgrounds (A, B, C, D, E, F, G, H) were sampled (30 animals each, between 90-100
101 days of age). At the time of necropsy, tissues were collected (lymph nodes, lung, spleen,
102 liver and kidney), pooled from each organ and herd, homogenized, frozen at -80°C and
103 clarified, totalizing 40 samples.

104

105 2.2 DNA Extraction

106 The DNA extraction from serum (100 µL) was carried out using a kit based on silica
107 following the manufacturer instructions (NewGene, Simbios Biotecnologia, Brazil).
108 DNA was eluted with 50 µL of elution buffer and stored at -20°C.

109

110 2.3 PCR detection of viruses

111 Specific primers were used to detect PCV2 from a previously described protocol
112 (Larochelle et al., 1999). To detect PPV, a nested-PCR was performed using two primer
113 pairs that amplified a fragment of the gene encoding non-structural protein NS-1
114 (Soares et al., 1999) with the following modifications: initial denaturation at 95°C for 2
115 min., 35 cycles of denaturation at 95°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s and
116 extension at 72°C for 45 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min. TTV-1 and
117 TTV-2 were detected as previously described (Segalés et al., 2009).

118 Primer pairs for PPV2 (sense: 5' – AGA TTC TTG CAG GCC GTA GA -3' and
119 antisense: 5' – CCA AGG GTC AGC ACC TTT TA – 3') and for PHoV (sense: 5'-
120 GTG GCA GTG ATA TTG CAT CG -3' and antisense: 5'- TGG CAG TCA TTG AAT

121 GGA AA - 3') were selected using the Vector NTI Advance 10 Software. The following
122 mix conditions were used for amplification of PPV2 and PHoV: 2.5 μ L of 10x buffer,
123 0.75 μ L of $MgCl_2$ (50 nM), 2 μ L of dNTPs (2.5 nM), 1 μ L of each primer (20 μ M), 0.2
124 μ L of Taq DNA polymerase (1 U/ μ L) (Ludwig Biotecnologia, Brazil) and water up to
125 25 μ L. The PCR for PPV2 started with 1 cycle for denaturation at 95°C for 2 min., 30
126 cycles at 95°C for 15 s, 55°C for 30 s, 72°C for 45 s and final extension at 72°C for 7
127 min. For PHoV, the initial denaturation was performed with 1 cycle at 95°C for 2 min.,
128 35 cycles at 95°C for 30 s, 50°C for 1 min., 72°C for 1 min. and final extension at 72°C
129 for 5 min.

130 All amplification products were electrophoresed on 2% agarose gels with 40
131 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0 (TAE) running buffer, stained with 0.1 μ g/mL of
132 Blue Green I (LGC, Brazil) and visualized under UV light. The PCR for PCV2 and
133 nested-PCR for PPV1 amplified 263 and 137 base pair (bp) fragments, respectively.
134 Also PCR for PPV2, TTV1, TTV2 and PHoV generated a fragment of 250 bp for each
135 virus. Standard precautions were taken to avoid PCR contamination.

136

137 2.4 Primers for PHoV sequencing (VP1/VP2 region)

138 In August 2010, 15 nucleotide sequences of PHoV strains/isolates complete
139 genomes were retrieved from GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
140 using the key-word "porcine hokovirus". The accession numbers of the strains/isolates
141 used for alignment using MEGA software version 4.0 (Tamura et al., 2007) were the
142 following: EU200671 - EU200677 and FJ982246 - FJ982255. The consensus sequence
143 was constructed from the alignment to verify the regions conserved between these
144 sequences, in order to select the primers that could detect all the PHoV strains. The

145 primers were selected using Vector NTI Advance 10 Software and 100 bp overlapping
 146 of fragments with a length ranging from 400 bp to 600 bp. The VP1/VP2 region
 147 consists in a length of 2777 bp (VP1= position 2188 to 4965 and VP2 = 3298 to 4965)
 148 based on the sequence with accession number EU200671. To obtain full-length of
 149 VP1/VP2 region 16 primers were designed (8 overlapping PCR fragments), described in
 150 Table 1. Primer-BLAST was used to verify the primers specificity (Available at:
 151 www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool).

152

153 Table 1. Primers selected for amplification and sequencing of VP1/VP2 region from
 154 PHoV.

PCR	Primer	Sequence (5' – 3')	Position	Length (bp)	Tm (°C)
A	P1f	GCA CTG AGG GCT ACG TTC GTT CTC	1985-2009	503	61.4
	P2r	TGA CCA GGT CCA TGA AAA ATC TCC C	2464-2487		58.9
B	P3f	GGA GTA GAC GTA TGG GTG GGG GTT A	2285-2309	405	61.3
	P4r	GGA ATA TTT CCT GGA ACT GCC CTT C	2710-2734		57.7
C	P5f	CTT AGG TGA TTT TCA CCG GCC GC	2550-2572	562	60.6
	P6r	CTC CTT TGC CTC CCA GAT ACC CC	3089-3111		61.3
D	P7f	GGT GAT TTG CCA TAC ATC CAT GGG	2968-2991	530	58.3
	P8r	GTC CGC ATA CCC ATA ACA GGC TGC	3474-3497		62.0
E	P9f	GTT GGG GGG CAC TCA TTT CTC TG	3354-3376	550	60.2
	P10r	CCC CAG ACA CTC TGC ATC ATG ATG	3380-3903		59.6
F	P11f	GCC CGG GGA GAA TTA TGT TCT TCC T	3762-3786	487	60.6
	P12r	GCG GAT ACT CCA GGG TTG ATG TAC C	4224-4248		60.8
G	P13f	CGG CAT AAT CCC ATT CCT CCG TC	3991-4013	494	59.7
	P14r	CTT CCA CTC CCA CTC CCA TCC ACT C	4460-4484		62.5
H	P15f	GCC GTC ACG AGG AAA GTT ATA CCG G	4322-4346	594	61.1
	P16r	CGT ACA CAG GTA CAT TGG GGT CCC	4892-4915		61.1

155

156

157

158 2.5 PCR and sequencing of nearly-full length of VP1/VP2 region of PHoV

159 The reaction mixture for each PHoV overlapping PCR consisted of 5 μ L of 10x
160 buffer, 1.5 μ L of $MgCl_2$ (50 nM), 4 μ L of dNTPs (2.5 nM), 2.0 μ L of each primer (20
161 pmol/ μ L), 0.4 μ L of Taq polymerase (1 U/ μ L) (Ludwig Biotecnologia, Brazil) and
162 milliQ water up to 50 μ L. All 8 PCR were established with the same thermal cycle
163 conditions: starting with 1 cycle for denaturation at 95°C for 5 min., 35 cycles at 95°C
164 for 1 min., 61°C for 1 min., 72°C for 1 min. and a final extension at 72°C for 10 min. All
165 amplification products were electrophoresed as previously described.

166 The PHoV PCR positive samples were purified with NucleoSpin[®] II (Macherey-
167 Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer instructions. The purified
168 samples were quantified using MassRuler[™] Express DNA Ladder LR Forward,
169 (Fermentas,USA) in 2% agarose gels. The samples (30 to 45 ng) were labeled with 3.2
170 pmol of each primer (Table 1) and 2 μ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing
171 RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ L. The reaction was performed in
172 a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Samples were sequenced in the
173 ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Brazil)
174 using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50cm
175 capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems).

176

177 2.6 Phylogenetic analysis

178 The obtained sequences were assembled using the DNA Baser version 3.0
179 Software. To perform phylogenetic analysis, the Genbank available PHoV sequences
180 were aligned with the four sequences (B0461, B2044, LN1725 and B1725) from the
181 present study. The Genbank sequences aligned, using MEGA Software version 4.0,

182 (Tamura et al., 2007) were previously described and the Germany sequences were
183 added in the alignment with accession numbers: GQ869539, GQ869540, GQ869541,
184 GQ869542 and GQ869543. To perform phylogenetic trees, a Bayesian Inference (BI)
185 was conducted using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). The
186 substitution models for the BI analyses were found using MrMODELTEST (Nylander,
187 2002) with the AIC criterion. For each analyses, four Markov chains, one cold and three
188 heated were run for 2×10^6 generations, with trees sampled every 100 generations, and
189 those trees generated prior to stationary were discarded as “burn-in”. Also, *neighbour-*
190 *joining* method (NJ) with Kimura’s two parameters and 1000 *Bootstrap* replications was
191 conducted for phylogenetic tree construction using MEGA Software, v.4, (Tamura et
192 al., 2007). Both phylogenetic methods were compared in order to verify the similarity
193 trees topologies.

194

195 **3. Results**

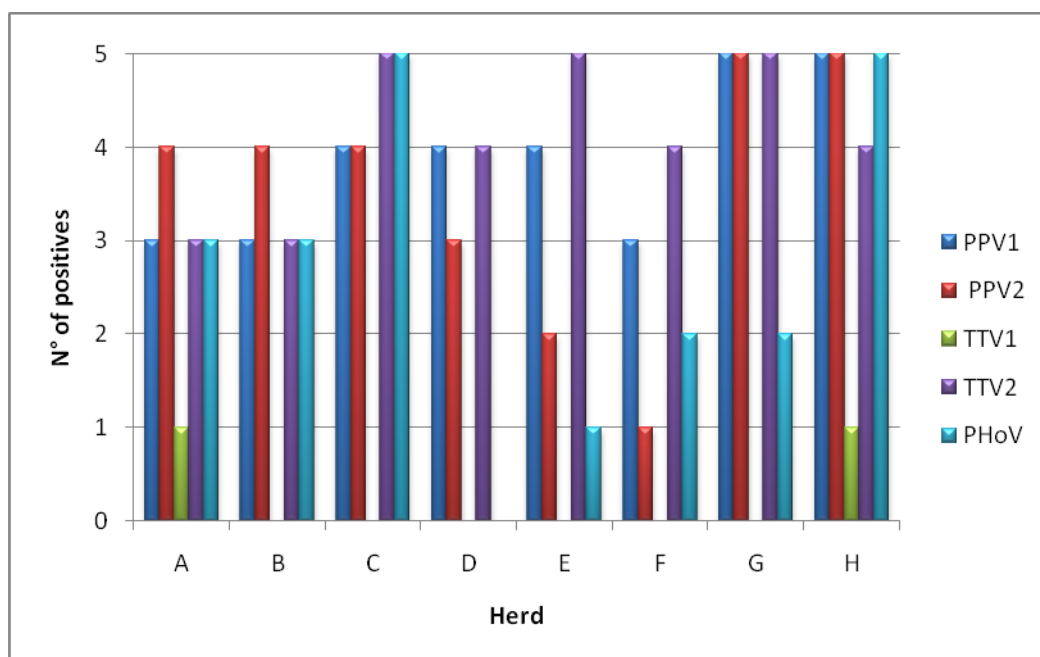
196 3.1 Histopathology and Immunohistochemistry for PCV2

197 The inclusion criteria for the PCV2 group also requires that swine fulfill all requisites of
198 triad of findings for the case definition of PCV2 disease proposed by Steven Sorden
199 (2000). The animals presented clinical signs as lessened weight gain, diarrhea and
200 wasting. In the histopathology, the samples presented lymphocytic depletion,
201 multinucleated giant cell formation in lymph nodes and histiocytic replacement of
202 follicles in lymphoid tissues. The lungs presented multifocal lymphohistocytic
203 interstitial pneumonia. Also, the lymph node samples were anti-PCV2 positive in the
204 immunohistochemistry (IHC) (Data not shown).

205

206 3.2 Detection of viruses in tissues

207 All the samples were positive for PCV2 in PCR test. The negative controls did
 208 not displayed amplification products. All herds were also positive for PPV1, PPV2 and
 209 TTV2. TTV1 was found in only 2 herds (A and H) and PHoV was found in 7 herds,
 210 with the exception of herd D (Figure 1).



211

212 Figure 1. Number of positive samples for PPV1, PPV2, TTV1, TTV2 or PHoV
 213 with PCV2 per herd.

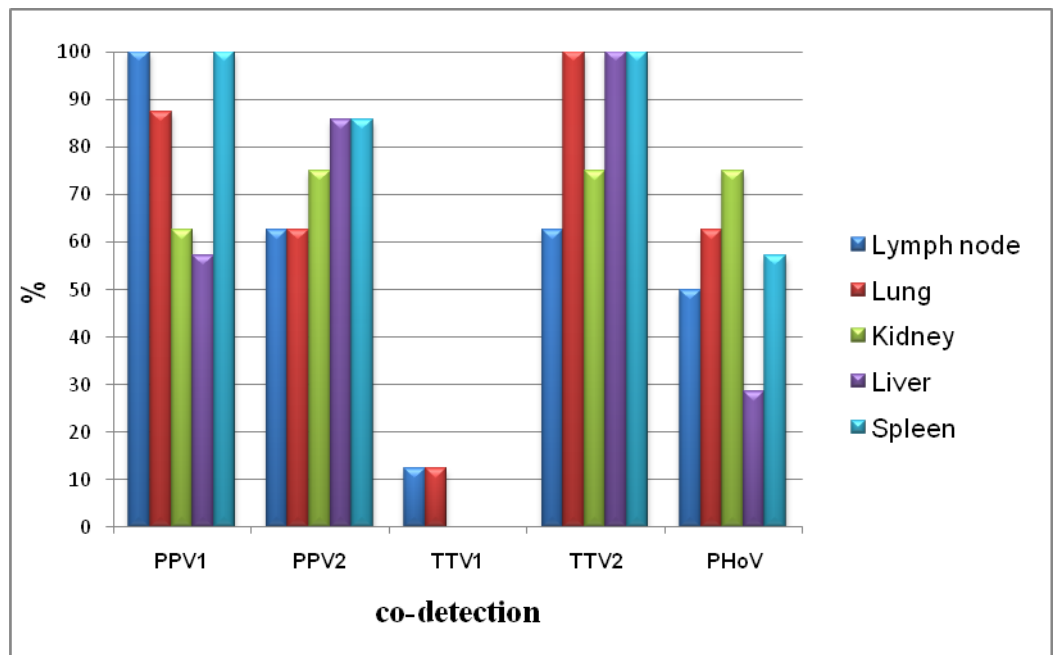
214

215 Thirty one out of 38 samples (81.6%) were positive for PPV1. TTV2 was found
 216 more frequently with genogroup 1, with 33 positives out of 38 samples (86.8%). In
 217 contrast, TTV1 presented only two positive samples. Twenty eight out of the 38
 218 samples (73.7%) were positive for PPV2 and 21 out of the 38 (55.3%) were positive for
 219 PHoV.

220

221 All lymph node samples were positive for PPV1. The lung samples also positive
 samples for all viruses, but mostly with PPV1 and TTV2 (87.5% and 100%),

222 respectively. The positive samples for PPV1, PPV2, TTV2 and PHoV were almost
 223 equally in kidney samples, exception with TTV1 (62.5%, 75%, 75%, 75% and 0%),
 224 respectively. The percentage of positives in liver samples were found PPV1, PPV2,
 225 TTV1, TTV2 and PHoV (57.2%, 85.7%, 0%, 100% and 28.6%), respectively. The
 226 spleen samples presented positives for PPV1, PPV2, TTV1, TTV2 and PHoV (100%,
 227 85.7%, 0%, 100% and 57.1%), respectively (Figure 2).



228

229 Figure 2. Percentage of positive samples for PPV1, PPV2, TTV1, TTV2 or PHoV in
 230 pooled organs.

231

232 PCV2 and PPV2 were distributed in all organs homogeneously. The presence of
 233 PPV1 was found in all organs, mainly in lymph nodes, lungs and spleen. TTV2 was
 234 found mainly in lymph nodes, liver and spleen. TTV1 was found only on lymph node
 235 and lung samples. PHoV was found in all organs.

236

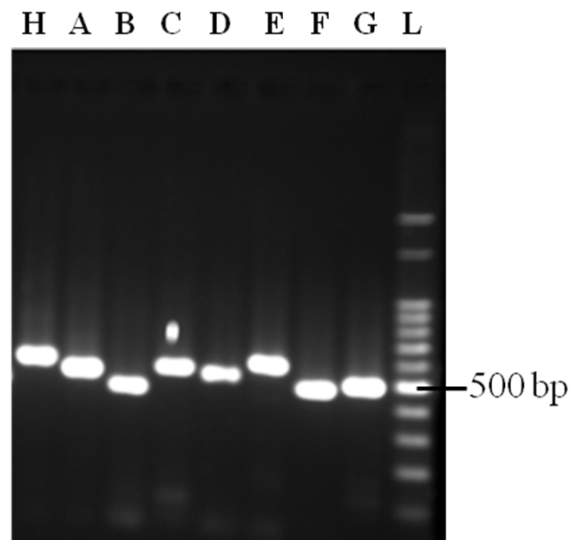
237

238

239 3.3 Phylogenetic analysis of PHoV

240 All the PCR fragments showed the expected length, (A: 503 bp, B: 450 bp, C:
241 562 bp, D: 530 bp, E: 550 bp, F: 487 bp G: 494 bp and H: 594 bp (Figure 3).

242



243

244 Figure 3. Agarose gel (2%) showing the 8 overlapping PCR fragments for PHoV. PCR
245 – H: 594 bp, A: 503 bp, B: 450 bp, C: 562 bp, D: 530 bp, E: 550 bp, F: 487 bp G: 494
246 bp and 100 pb DNA ladder.

247

248 The sequenced samples (B0461, B2044 and LN1725) in the present study
249 presented the same size, 2713 nucleotides (position: 2188 - 4901) covering almost all
250 the VP1 (position: 2188 – 4965) and VP2 (position: 3298 – 4965) overlapping regions,
251 missing only 64 nucleotides. However, the amplified sequence for sample B1725 had
252 1701 nucleotides in size (position: 2188 – 3889), missing 1076 nucleotides to have the
253 complete VP1/VP2 region. Three spleen samples were sequenced from three different
254 herds (B0461, B2044 and B1725) and one lymph node sample (LN1725) from the same
255 herd as B1725.

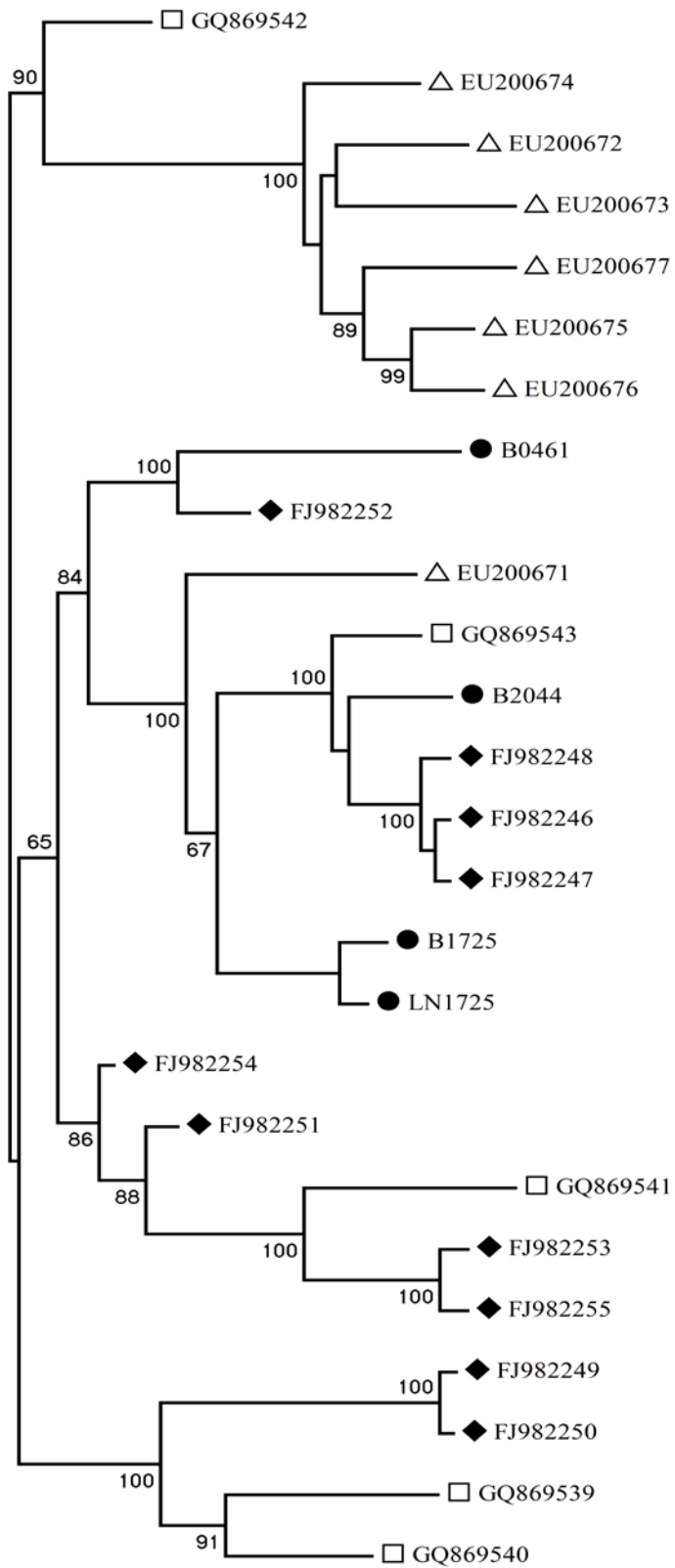
256 Both methods for phylogenetic tree construction (BI and NJ) compared
257 displayed similarity in the topology of the trees. The phylogenetic tree was rooted in the
258 midpoint. Sample B0461 formed a large branch length with a Great Britain sequence,
259 and sample B2044 presented a short branch length with one German sequence and three
260 Great Britain sequences. Samples B1725 and LN1725 clustered in a separate branch.
261 The Chinese sequences clustered in a distinct branch, although one of these sequences
262 clustered with other sequences. The Great Britain sequences formed three clusters
263 related with German and Brazilian sequences (Figure 4).

264 In the amino acid sequence analysis, 148 synonymous substitutions and 22 non-
265 synonymous substitutions were found. As there is no reference strain for PHoV, a
266 Chinese sequence was selected as the reference (accession number: EU200671). In the
267 Brazilian sequence B0461 three amino acid substitutions were found, V787→M,
268 Q908→R and N1348→S that were not found in the other sequences analyzed.
269 Moreover, this sample presented two amino acid changes I1093→L and I1112→V,
270 which were also found in sequence B2044. The amino acid change I1093→L was also
271 observed in four Great Britain sequences and in one German sequence. The amino acid
272 change I1112→V was found in Brazilian sequence B1725, in eight Great Britain
273 sequences and in two German sequences. The amino acid change L1061→P was only
274 found in LN1725 and B1725, whereas, four Great Britain sequences and one German
275 sequence had changed L1061→R. The Brazilian sequences obtained in the present
276 study presented six positions with amino acid changes (787, 908, 1061, 1093, 1112 and
277 1348). From these, four amino acid changes were found exclusively in the Brazilian
278 sequences (V787→M, Q908→R, L1061→P and N1385→S) (Table 2).

Table 2. Amino Acid substitutions within PHoV VP1/VP2 sequences

Samples	Origin	Amino acid position - VP1/VP2																					
		787	820	834	860	879	908	923	939	1061	1064	1085	1093	1112	1217	1238	1279	1325	1348	1425	1429	1465	1469
EU200671	China	V	T	L	P	E	Q	S	D	L	S	P	I	I	T	D	I	N	N	N	V	V	V
EU200672	China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-
EU200673	China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU200674	China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU200675	China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU200676	China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EU200677	China	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	I	-	-
FJ982246	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ982247	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ982248	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	N	-	-	-	L	V	S	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ982249	Great Britain	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	E	-	S	-	-	-	-	G
FJ982250	Great Britain	-	S	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	E	-	S	-	-	-	-	G
FJ982251	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ982252	Great Britain	-	-	I	-	-	-	-	-	R	-	-	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ982253	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
FJ982254	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FJ982255	Great Britain	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
GQ869539	Germany	-	-	I	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
GQ869540	Germany	-	-	I	S	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G
GQ869541	Germany	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
GQ869542	Germany	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	M	-	-	-	-	-	-
GQ869543	Germany	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B0461	Brazil	M	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	L	V	-	-	-	-	S	-	-	-	-
B2044	Brazil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LN1725	Brazil	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1725	Brazil	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	-	V	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Dashes represent amino acid identity with EU200671 sequence, used as a reference strain. ND - Not determined.



0.05

280

281 Figure 4. Phylogenetic tree constructed by Bayesian Inference based on nearly-full
 282 length nucleotide sequences of the VP1/VP2 region of PHoV. The symbols refer to
 283 origin of each sequence: Δ China, \blacklozenge Great Britain, \square Germany and \bullet Brazil. All the

284 sequences are represented with the accession number from Genbank, exception
285 Brazilian samples. The trees were statistically evaluated in a bootstrap analysis with
286 1000 replicates. Bootstrap values higher than 50% are shown at nodes.
287

288 **4. Discussion**

289 The present study is the first report that addresses the co-infection of PCV2 with
290 novel porcine parvovirus, such as PPV2 and PHoV, in piglets naturally displaying
291 PMWS. The co-infection between PCV2 and PPV1, PPV2 or TTV2 was found in all
292 herds. Studies reported that PPV1 infection is widespread in Brazilian pig herds
293 (Gouveia et al., 1984; Martins et al., 1984; Bersano et al., 1993; Streck et al., 2011).
294 Furthermore, studies have been shown that the co-infection with PPV1 in pigs with
295 naturally acquired PMWS might be an important cofactor in the pathogenesis of some
296 cases of PMWS (Ellis et al., 2008). In the present study, comparing the occurrence of
297 both genogroups of TTV, genogroup 2 was more frequently found than genogroup 1. In
298 other studies, have been shown that despite there was no significant difference between
299 TTV genogroups in PMWS-affected pigs, TTV2 (77%) was more strongly correlated
300 with PMWS compared to TTV1 (60%) (Kekarainen et al., 2006; Taira et al., 2009).

301 Recently, a study indicates the presence of multiple viral infections in PMWS
302 pigs, such as TTV1 (77%), TTV2 (94%) and porcine bocavirus (88%) (Blomström
303 et al., 2010). Thus, the presence of other parvovirus, as PPV2 and PHoV in pigs with
304 PMWS may be other possible infectious co-factors that could be involved in the
305 syndrome. In the present study, more than 70% and 50% of the samples were positive
306 for PPV2 and PHoV, respectively. However, it is not possible to determine their role in
307 co-infection with PCV2, since their properties in infectivity and pathogenicity are not so
308 far determined. Until now, the presence of PHoV in piglets with PMWS and co-infected
309 with PCV2 have not been reported, although a previous study co-detected with porcine
310 reproductive and respiratory syndrome Virus (PRRSV) in positive animals for PHoV

311 (Lau et al., 2008). In addition, it was shown that the co-infection of PRRSV and PCV2
312 increased the clinical impact of porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS)
313 (Gillespie et al., 2009). In the present work, the samples were not tested for PRRSV
314 because Brazil is free from PRRSV, according to the Office International des Epizooties
315 (OIE, 2010).

316 In the different organs analyzed, the lymph node samples were co-infected by
317 PCV2 mainly with PPV1. Also, the lung samples presented co-infection of PCV2, mostly
318 with PPV1 and TTV2. All the viruses were co-infected with PCV2 in kidney samples,
319 exception TTV1. The co-infection of PCV2 with PPV2 and TTV2 were found more
320 than 80% in liver samples and the spleen samples presented 100% of co-infection of
321 PCV2 between PPV1 and TTV2. The viruses distribution in tissues has been shown in
322 other studies, as PCV2, PPV1, TTV1, TTV2 and PHoV that were found in various
323 tissues (Wilhelm et al., 2005; Fernandes et al., 2006; Saha et al., 2010; Aramouni et al.,
324 2010; Lau et al., 2008; Adlhoch et al., 2010). PHoV has been detected in serum, lymph
325 nodes, nasopharyngeal and faecal samples (Lau et al., 2008). The present study showed
326 that PHoV can be found in various porcine tissues. There are no studies reporting the
327 detection of PPV2 in tissues, only in serum (Hijisaka et al., 2001). However, further
328 studies are necessary in order to determine the role of these agents and interactions with
329 PCV2 in PMWS.

330 In the phylogenetic analysis, the BI and NJ methods in tree construction
331 presented similar topologies. The sample B0461 clustered with a Great Britain
332 sequence, sample B2044 presented to be more related with Germany and Great Britain
333 sequences. And samples B1725 and LN1725 formed a separated branch in the
334 phylogenetic tree. This close relationship between PHoV Brazilian sequences and
335 European sequences could be explained by the virus spread through pigs imported from

336 Europe to Brazil. In other studies, the phylogenetic analysis was performed comparing
337 sequences of PHoV, human hokovirus (HHoV) and bovine hokovirus (BHoV) that
338 showed three different clusters (Szelei et al., 2010; Adlhoch et al., 2010).

339 In amino acid level were found 148 synonymous changes and 22 non-
340 synonymous changes. Until now, there is no a PHoV reference strain for comparison
341 with other sequences and it was not described the possibly important sites in genome
342 that could be related with virulence and other virus properties. Only in the B0461
343 sequence were found three amino acid changes (V787→M, Q908→R and N1348→S)
344 that were not found in the other sequences. Moreover, this sample presented two amino
345 acid changes, which were also found in sequence B2044. Interestingly, the amino acid
346 change L1061→P was found in LN1725 and B1725, whereas, in some European and
347 German sequences was found L1061→R. The Brazilian samples showed exclusively 4
348 amino acid changes that were not found in the other analyzed sequences. Then, these
349 amino acid changes analyzed could show the phylogenetic differences in Brazilian
350 sequences from the other sequences.

351

352 **5. Conclusion**

353 Multiple viruses (PCV2, PPV1, TTV2, PPV2 and PHoV) were detected in all
354 herds, with the exception of TTV1. The lymph node samples displayed the majority of
355 the positive results for all pathogens. These viruses were elucidated in samples from
356 2007, showing that these novels parvovirus were circulating in Brazilian herds. Further
357 studies are required to understand the evolution and prevalence of PHoV in pigs in
358 commercial herds. Also, studies have yet to be conducted to verify if there is a
359 correlation between these viruses and elucidate their possible role in PMWS.

360

361 **6. Acknowledgements**

362 Financial support was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento
363 Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do
364 Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Pró-reitoria de Pesquisa da UFRGS. We are
365 thankful to Simbios Biotecnologia that kindly supplied the DNA extraction kits
366 (NewGene).

367

368 **7. References**

- 369 Allan, G.M., Ellis, J.A., 2000. Porcine circoviruses: A review. *J. Vet. Diag. Invest.* 12,
370 3-14.
- 371 Adlhoch, C., Kaiser, M., Ellerbrok, H., Pauli, G., 2010. High prevalence of porcine
372 Hokovirus in German wild boar populations. *Virologica J.* 7, 171.
- 373 Aramouni, M., Segalés, J., Cortey, M., Kekarainen, T., 2010. Age-related tissue
374 distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. *Vet. Microbiol.* 15, 350-353.
- 375 Bersano, J.G., Schotten, M.H.S., Kroeff, S.S., Bastos, G.M., 1993. Dados preliminares
376 sobre a ocorrência de anticorpos para o Parvovírus Suíno no Estado de São Paulo. In:
377 Trabalho Apresentado na VI Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, SP, 030,
378 17.
- 379 Blomstrom, A.L., Belák, S., Fossum, C., McKillen, J., Allan, G., Wallgren, P., Berg, M.,
380 2009. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine
381 circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res.*
382 146, 125-129.
- 383 Blomström, A.L., Belák, S., Fossum, C., Fuxler, L., Wallgren, P., Berg, M., 2010.
384 Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and torque teno virus
385 indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting
386 syndrome pigs. *Virus Res.* 152, 59-64.
- 387 Ellis, J.A., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D.M., Harding, J.,
388 West, K.H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K., McNeilly, F., 2000.
389 Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally
390 acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 21-
391 27.
- 392 Ellis, J.A., Allan, G., Krakowka, S., 2008. Effect of co-infection with genogroup 1
393 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2 - associated postweaning
394 multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 69, 12.
- 395 Fernandes, L.T., Ciacci-Zanella, J.R., Sobestiansky, J., Schiochet, M.F., Trombetta, C.,
396 2006. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 isolado do Brasil e parvovírus
397 suíno em suínos SPF. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 58, 1, 1-8.

- 398 Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V., 2009.
399 Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. *J. Vet. Intern.*
400 *Med.* 23, 1151-1163.
- 401 Gouveia, A.M.G., Gomez, M.C., Reis, R., 1984. Alterações reprodutivas e prevalência
402 de anticorpos inibidores de hemoaglutinação para o parvovirus suino no estado de
403 Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.* 4, 17-22.
- 404 Hijisaka, M., Abe, K., Win, K.M., Shimizu, Y.K., Keicho, N., Yoshikura, H., 2001.
405 Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Jpn. J.*
406 *Infec. Dis.* 54, 244-245.
- 407 Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny.
408 *Bioinfo.*, 17, 754-755.
- 409 Jones, M.S., Kapoor, A., Lukashov, V.V., Simmonds, P., Hecht, F., Delwart, E., 2005.
410 New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J. Virol.*
411 79, 8230-8236.
- 412 Kennedy, S., Moffett, D., Mcneilly, F., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., Allan,
413 G.M., 2000. Reproduction of lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome
414 by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination
415 with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122, 9-24.
- 416 Kekarainen, T., Sibila, M., Segalés, J., 2006. Prevalence of swine torque teno virus in
417 post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non- PMWS
418 affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* 87, 4, 833-837.
- 419 Krakowka, S., Ellis, J.A., Meehan, B., Kennedy, S., Mcneilly, F., Allan, G., 2000. Viral
420 wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic
421 wasting syndrome in gnotobiotic swine by co-infection with porcine circovirus 2 and
422 porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 37, 254-263.
- 423 Krakowka S, Ellis J.A., McNeilly F., Ringler S., Rings D.M., Allan G. 2001. Activation
424 of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs
425 infected with porcine circovirus 2. *Vet. Pathol.* 38, 31-42.
- 426 Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., Magar, R., 1999. Typing of porcine circovirus in
427 clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 80, 69-75.
- 428 Lau, S.K., Woo, P.C., Tse, H., Fu, C.T., Au W.K., Chen, X.C., Tsoi, H.W., Tsang T.H.,
429 Chan J.S., Tsang, D.N., Li, K.S., Tse, C.W., Ng, T.K., Tsang, O.T., Zheng, B.J., Tam,
430 S., Chan, K.H., Zhou, B., Yuen, K.Y., 2008. Identification of novel porcine and bovine
431 parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J. Gen. Virol.* 89, 1840-1848.
- 432 Lee, S.S., Sunyoung, S., Jung, H., Shin, J., Lyoo, Y.S., 2010. Quantitative detection of
433 porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2-negative and Porcine circovirus-
434 associated disease-affected pigs. *J. Vet. Diag. Invest.* 22, 2, 261-264.
- 435 López-Soria, S., Nofrarías, M., Calsamiglia, M., Espinal, A., Valero, O., Ramírez-
436 Mendoza, H., Mínguez, A., M. Serrano, J.M., Marín, O., Callén, A., Segalés, J., 2011.
437 Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) clinical expression under field
438 conditions is modulated by the pig genetic background. *Vet. Microbiol.* Epub and print.
- 439 Martins, R.M., Rohe, P.M., Guimarães, I.J., Rangel, E.V., 1984. Sorologia de
440 Parvovirus Suíno em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In:
441 Trabalho Apresentado no Primeiro Congresso Nacional de Veterinários Especialistas
442 em Suínos, 1, Curitiba: Abraves.

- 443 Nylander, J.A.A., 2002. MrModeltest v 1.0b. Program distributed by the author.
444 <<http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>>.
- 445 OIE. Office International des Epizooties. <<http://www.oie.int/>>
- 446 Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U.,
447 Naito, Y., Yoshikawa, A., 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in
448 pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and
449 tupaia. *J. Gen. Virol.* 83, 1291-1297.
- 450 Pogradichniy, R.M., Yoon, K.J., Harms, P.A., Sorden, S.D., Daniels, M., 2002. Case-
451 control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral
452 pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14,
453 449-456.
- 454 Saha, D., Lefebvre, D.J., Van Doorselaere, J., Atanasova, K., Barbe, F., Geldhof, M.,
455 Karniyuchuk, U.U., Nauwynck, H.J., 2010. Pathologic and virologic findings in mid-
456 gestational porcine fetuses after experimental inoculation with PCV2a or PCV2b. *Vet.*
457 *Microbiol.* 145, 62-68.
- 458 Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases. *Anim Health*
459 *Res Rev.* 6, 119–142.
- 460 Segalés, J., Martínez-Guinó, L., Cortey, M., Navarro, N., Huerta, E., Sibila, M., Pujols,
461 J., Kekarainen, T., 2009. Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1
462 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Vet. Microbiol.* 134, 199-207.
- 463 Soares, R.M., Durigon, E.L., Bersano, J.G., Richtzenhain, L.J., 1999. Detection of
464 porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the
465 highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *J. Virol. Methods.* 78, 191-198.
- 466 Streck, A.F., Gava, D., Souza, C.K., Gonçalves, K.R., Bortolozzo, F.P., Wentz, I.,
467 Canal, C.W., 2011. Presence of porcine parvovirus in sera from pigs is independent of
468 antibody titers. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift.* Epub and print.
- 469 Szelei, J., Liu, K., Li, Y., Fernandes, S., Tijssen, P., 2010. Parvovirus 4-like virus in
470 blood products. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 3, 561-564.
- 471 Taira, O., Ogawa, H., Nagao, A., Tuchiya, K., Nunoya, T., Ueda, S., 2009. Prevalence
472 of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-
473 weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet*
474 *Microbiol.* 139, 3-4, 347-350.
- 475 Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary
476 Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Bio. Evol.* 24, 1596-1599.
- 477 Todd, D. Niagro, F.D. Ritchie, B.W., Curran, W., Allan, G.M., Lukert, P.D., Latimer,
478 K.S., Steffens, W.L., McNulty, M.S., 1991. Comparison of three animal viruses with
479 circular single stranded DNA genomes. *Arch. Virol.* 135, 117-129.
- 480 Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P., Paton D.J., 1994.
481 Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three
482 genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis,
483 *Arch. Virol.* 136, 309-323.
- 484 Wilhelm, S., Zeeuw, E.J.L, Selbitz, H.-J., Truyen, U., 2005. Tissue distribution of
485 two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs

486 after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. J.
487 Vet. Med. B. 52, 323-326.

5. DISCUSSÃO GERAL

A PCR em tempo real tem sido amplamente utilizada como um método sensível e rápido para o diagnóstico de uma gama de patógenos virais (LEMMON e GARDNER, 2008). No primeiro artigo foi estabelecida uma qPCR para detecção e quantificação da região gênica conservada NS1 de PPV1 em amostras de soro. Para a padronização da técnica foi avaliada a especificidade, sensibilidade e curva de quantificação da qPCR. A curva de quantificação padrão da qPCR demonstrou linearidade variando de 6×10^6 cópias genômicas por mililitro (gce/mL) a 2×10^3 gce/mL apresentando um valor de coeficiente de correlação (R^2) de 0.98. No teste de especificidade, a qPCR não apresentou valores de *Cycle threshold* (Ct) nos patógenos do grupo de exclusão (PCV-2, CPV, FPV, CFSV, Erisipela e Leptospirose). E todas as cepas de PPV1 testadas, apresentaram fluorescência (Ct), demonstrando uma especificidade de 100%. Outros estudos têm demonstrado que a qPCR utilizando a sonda TaqMan[®] apresentou alta especificidade nos ensaios para PPV1 (CHEN et al., 2009; SONG et al., 2010). A sensibilidade analítica da qPCR apresentou maior linearidade até 5000 gce/mL com 100% de probabilidade de detecção de PPV1. No entanto, a análise estatística (PROBIT) demonstrou um limite de detecção de 1.250 gce/mL com 50% de probabilidade de detectar PPV1.

Na casuística foram avaliadas amostras de soro de fêmeas nulíparas, múltíparas e leitões saudáveis e leitões refugos. Nos grupos 1, 2 e 3, as fêmeas nulíparas e múltíparas apresentavam-se saudáveis e viviam em condições sanitárias elevadas, por isso, esses grupos apresentaram um baixo número de positivos para PPV1. No grupo 4, foi obtido três amostras positivas na nPCR e duas na qPCR, e uma das amostras com carga relativamente alta de 80.890 gce/mL. Apesar desses leitões apresentarem-se saudáveis, viviam em baixas condições sanitárias, com risco de infecções. Já no grupo 5, do qual os leitões eram refugos, foi obtido o maior número de animais positivos para PPV1. Essas amostras positivas apresentaram cargas virais que variaram entre 1.025 gce/mL a 794.769 gce/mL.

Comparando os resultados da qPCR com a nPCR, esta detectou quatro amostras de soro a mais do que a qPCR, demonstrando maior sensibilidade. A maior

sensibilidade da nPCR ocorre devido as duas reações e os dois pares de iniciadores, diferentemente da PCR convencional que possui somente uma reação com um par de iniciadores (PRIKHOD'KO et al., 2003). Com isso, no presente estudo a qPCR apresentou uma sensibilidade de 73% ao ser comparada com a nPCR. Já, estudos que compararam qPCR com PCR convencional demonstraram alta sensibilidade nos ensaios da qPCR (WARRILOW et al., 2002; CHEN et al., 2009; SONG et al., 2010). A qPCR apresenta uma série de vantagens em relação a PCR convencional, como: alta especificidade, ensaio rápido e preciso, não necessita de análise em gel de agarose, diminuindo o risco de contaminações durante o procedimento (MOLITOR et al., 1991; SOARES et al., 1999).

A reprodutibilidade avaliada intra e inter-ensaios demonstrou linearidade variando de 6.000.000 a 48.000 gce/mL e os coeficientes de variação de 1.3% - 1.6% (intra-ensaios) e 1,5% - 1,8% (inter-ensaios). A reprodutibilidade da qPCR pode ser maior quando comparada com outros métodos de quantificação, como a PCR convencional de competição, no entanto, necessita de um controle interno para auxiliar na quantificação, além de análise pós-PCR (LIU et al., 2000).

Ao comparar os métodos da qPCR, o SYBR Green I tem sido utilizado para detecção de PPV (WILHELM et al., 2006); no entanto, esse fluoróforo é um intercalante de dupla-fita de DNA, o que pode ocorrer a ligação do SYBR Green I em qualquer dupla-fita de DNA, gerando reações inespecíficas. Diferentemente, os métodos baseados em sonda como TaqMan® e *molecular beacons* ligam-se especificamente na sequência-alvo de ácidos nucléicos demonstrando alta especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade para o diagnóstico de viroses (HEID et al., 1996; CHEN et al., 2009; SONG et al., 2010).

Portanto, a qPCR possibilita a determinação da quantificação viral com precisão, podendo ser útil para estudos de viremia, patogenicidade e monitoramento de infecções por PPV1 nas granjas (MIAO et al., 2009, FUJIWARA et al., 2011).

O segundo artigo, representa o primeiro relato de co-infecção de PCV2 com novos parvovirus (PPV2 e PHoV) em leitões apresentando naturalmente a PMWS.

A co-infecção de PCV2 com PPV1, TTV2 e PPV2 foi encontrada em todas as granjas estudadas. Estudos relatam que o PPV1 está amplamente distribuído nas granjas brasileiras, (MARTINS et al., 1984; BERSANO et al., 1993; STRECK et al., 2011).

Além disso, pode agir concomitantemente com PCV2, sendo um importante cofator no aumento da severidade das lesões apresentada na PMWS (ELLIS et al., 2000). No presente estudo, ao comparar a ocorrência de TTV1 e TTV2, foram obtidas mais amostras positivas para o genogrupo 2 do que para o genogrupo 1. Estudos têm demonstrado que o genogrupo 2 é mais prevalente em animais que apresentam PMWS (KEKARAINEN et al., 2006; TAIRA et al., 2009). Recentemente, um estudo mostrou a presença de múltiplas infecções virais em animais com PMWS, como TTV1 (77%), TTV2 (94%) and porcine boca-like virus (88%) (BLOMSTRÖM et al., 2010). No presente estudo, mais de 70% e 50% das amostras foram positivas para PPV2 e PHoV, respectivamente. Em razão disso, esses novos parvovirus podem estar envolvidos na PMWS, mas ainda não se sabe o real papel desses vírus na patogenia da síndrome. Até o momento, não existem relatos da presença de PHoV em co-infecção com PCV2 apresentando PMWS, no entanto, em um estudo foi detectado PHoV em animais positivos para PRRSV (LAU et al., 2008). No presente trabalho, não foi realizada a detecção de PRRSV nas amostras de leitões, pois o Brasil é considerado livre desta doença, de acordo com Office International des Epizooties (OIE, 2010).

Nos diferentes órgãos analisados, ocorreu a co-infecção de PCV2 principalmente com PPV1 em amostras de linfonodos. Além disso, a maioria das amostras de pulmão apresentou co-infecção de PCV2 com PPV1 e TTV2. Todos os vírus foram co-infectados com PCV2 em amostras de rim, com exceção TTV1. A co-infecção de PCV2 com PPV2 e TTV2 foram encontradas mais de 80% em amostras de fígado e as amostras de baço apresentaram 100% de co-infecção de PCV2 com PPV1 e TTV2.

A distribuição do vírus (PCV2, PPV1, TTV1, TTV2 e PHoV) tem sido demonstrada em outros estudos em variados tecidos (WILHELM et al, 2005; FERNANDES et al, 2006; SAHA et al, 2010; ARAMOUNI et al, 2010; LAU et al, 2008; ADLHOCH et al, 2010). No entanto, não existem estudos que relatam a detecção de PPV2 em tecidos, somente no soro de suínos (HIJISAKA et al., 2001). Já PHoV foi detectado no soro, linfonodos, nasofaríngea e amostras de fezes (LAU et al., 2008). O presente estudo mostrou que PHoV pode ser encontrado em vários tecidos de suínos, como linfonodo, pulmão, rim, fígado e baço. No entanto, mais estudos são necessários para determinar o papel desses agentes infecciosos e as suas interações com PCV2 no desenvolvimento da PMWS.

Na análise filogenética, os métodos de BI e NJ na construção da árvore apresentaram topologias similares. A amostra B0461 agrupou-se com uma sequência da Grã-Bretanha, a amostra B2044 apresentou-se mais relacionada com as sequências da Alemanha e da Grã-Bretanha. Já as amostras B1725 e LN1725 formaram um ramo separado na árvore filogenética. Esta similaridade entre as sequências brasileiras de PHoV e sequências européias pode ter ocorrido devido à possível propagação do vírus através da importação de suínos vindos da Europa para o Brasil. Em outros estudos, a análise filogenética foi realizada comparando sequências de PHoV, hokovirus humano (HHoV) e hokovirus bovino (BHoV), demonstrando três grupos distintos, o suíno, o humano e o bovino (Szelei et al, 2010;. Adlhoch et al, 2010).

Em nível de aminoácidos foram encontradas 148 mudanças sinônimas e 22 mudanças não sinônimas. Até agora, não há uma cepa de referência de PHoV para comparar essas mudanças não sinônimas nos aminoácidos e ainda não foram descritos sítios importantes no genoma que possam estar relacionados com a virulência.

Somente na sequência B0461 foram encontradas três mudanças de aminoácidos (V787→M, Q908→R and N1348→S), que não foram observadas nas outras. Além disso, esta amostra apresentou duas mudanças de aminoácidos, que também foram encontradas na sequência B2044. Curiosamente, a mudança L1061 → P foi encontrada nas sequências LN1725 e B1725, que em algumas sequências européias e alemãs o aminoácido mudou para L1061 → R. As amostras brasileiras apresentaram exclusivamente quatro mudanças de aminoácidos que não foram encontradas nas sequências analisadas dos outros países. Portanto, essas mudanças não sinônimas dos aminoácidos da região VP1/VP2 do PHoV demonstraram diferenças filogenéticas nas sequências brasileiras, além disso, são necessários mais estudos para identificar a importância dessas mutações e quais os sítios que podem estar envolvidos com a patogenia e propriedades do vírus.

6. CONCLUSÕES

1. A qPCR TaqMan detectou e quantificou PPV1 na região altamente conservada do gene NS1.
2. A qPCR demonstrou ser um método de diagnóstico para PPV1 altamente específico, preciso e rápido.
3. A qPCR teve a sensibilidade menor (73%) quando comparada com a nPCR.
4. A padronização da qPCR para detecção de PPV1 possibilita a quantificação viral no soro, sendo uma ferramenta útil para estudos de viremia e monitoramento da infecção de PPV1 nas granjas.
5. O primeiro relato de detecção de co-infecção de PCV2 com novos parvovirus (PPV2 e PHoV) em leitões apresentando naturalmente PMWS foi realizado neste trabalho.
6. Co-infecções de PCV2 com PPV1, PPV2, TTV1, TTV2 e PHoV foram detectadas em cinco diferentes órgãos e em oito granjas. As co-infecções com PCV2 apresentadas foram: TTV2 (86,8%), PPV1 (81,6%), PPV2 (73,7%), PHoV (55,3%) e TTV1 (5,3%).
7. Esses novos vírus (PPV2 e PHoV) foram encontrados em amostras coletadas em 2007, o que demonstra que estes vírus já estavam circulando nas granjas brasileiras.
8. As árvores filogenéticas construídas com os métodos BI e NJ apresentaram topologias similares. A sequência B0461 agrupou-se com uma da Grã-Bretanha. A sequência B2044 apresentou-se mais relacionada com sequências da Alemanha e da Grã-Bretanha. E as amostras B1725 e LN1725 formaram um ramo separado na árvore filogenética.
9. As sequências brasileiras de PHoV apresentaram exclusivamente quatro substituições de aminoácidos (V787→M, Q908→R, L1061→P e N1385→S) que não foram encontradas nas sequências analisadas dos outros países. No entanto, são necessários mais estudos para identificar a importância dessas mutações na patogenia e propriedades do vírus.

10. Mais estudos são necessários para compreender a evolução e a epidemiologia de PPV2 e PHoV em rebanhos comerciais de suínos. Além disso, ainda não está bem claro o papel desses novos parvovirus na PMWS.

7. REFERÊNCIAS

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. Disponível em <<http://www.abipecs.org.br/>>. Acesso em: 15/12/2010.
- ADLHOCH, C.; KAISER, M.; ELLERBROK, H.; PAULI, G. High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. **Virology Journal**, v. 7, p. 171, 2010.
- ALLAN, G.M.; ELLIS, J.A. Porcine circoviruses: A review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p. 3–14, 2000.
- 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.
- ALLAN, G.M.; MCNEILLY, F.; KENNEDY, S.; DAFT, B.; CLARKE, E.G.; ELLIS, J.A.; HAINES, D.M.; MEEHAN, B.M.; ADAIR, B.M. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.10, p.3-10, 1998.
- ALLANDER, T.; TAMMI, M.T.; ERIKSSON, M.; BJERKNER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; ANDERSSON, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proceedings of the National Academy of Sciences - U S A**, v.102, p.12891-12896, 2005.
- ARAMOUNI, M.; SEGALÉS, J.; CORTEY, M.; KEKARAINEN, T. Age-related tissue distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. **Veterinary Microbiology**, v. 15, p. 350-353, 2010.
- ANDREWS, C.H. Generic names of viruses of vertebrates. **Virology**, v.40, p.1070-1071, 1970.
- ANTONIS, A.F.; BRUSCHKE, C.J.; RUEDA, P.; MARANGA, L.; CASAL, J.I.; VELA, C.; HILGERS, L.A.; BELT, P.B.; WEERDMEESTER, K.; CARRONDO, M. J.; LANGEVELD, J.P. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. **Vaccine**. v.24, n.26, p.5481-5490, 2006.
- APPEL, M.J.; SCOTT, F.W.; CARMICHAEL, L.E. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. **Veterinary Records**, v.25, n.105, p.156-159, 1979.
- BACHMANN, P.A.; SHEFFY, B. E.; VAUGHAN, J.T. Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. **Infection and Immunity**, n.12, p.455-460, 1975.
- BARBOSA, C.N. **Circovirus suíno-2 em suídeos brasileiros: detecção viral pela imunistoquímica e estudos sorológicos**. 2005. 96p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

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.; HÉBERT, 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.; TIJSSEN, P. Genome organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. **Virology**, v.197, n.1, p.86-98, 1993.

BERSANO, J.G.; SCHOTTEN, M.H.S.; KROEFF, S.S.E.; BASTOS, G.M. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o parvovírus suíno no Estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., 1993. **Anais...** São Paulo, SP, p.17, 1993.

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.

BLOOM, M.E.; BEST, S.M.; HAYES, S.F.; WELLS R.D.; WOLFINBARGER, J. B.; MCKENNA, R.; AGBANDJE-MCKENNA, M. Identification of aleutian mink disease parvovirus capsid sequences mediating antibody dependent enhancement of infection, virus neutralization, and immune complex formation. **Journal of Virology**, v.75, n.1, p.1116-1127, 2001.

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

BLOMSTRÖM, A.L.; BELÁK, S.; FOSSUM, C.; FUXLER, L.; WALLGREN, P.; BERG, M. Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. **Virus Research**, v. 152, p. 59-64, 2010.

BOISVERT, M.; FERNANDES, S.; TIJSSEN, P. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking towards the nucleus. **Journal of Virology**, v.84, p.7782-7792, 2010.

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.

BOURNE, F.J. Humoral immunity in the pig. **Veterinary Record**, v.98, n.25, p.499-501, 1976.

BRAILOVSKY, C. Research on the rat K virus (Parvovirus ratti). 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.1, n.110, p.49-59, 1966.

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

BUTLER, J.E.; ZHAO, Y.B.; SINKORA, M.C.; WERTZ, N.; KACSKOVICS, A.I. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.321-333, 2009.

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

CARTWRIGHT, S.F.; LUCAS, M.; HUCK, R.A. A small haemagglutinating porcine DNA virus. Isolation and properties. **Journal of Comparative Pathology**, v.79, p.371-377, 1969.

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: 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. Circovírus suíno tipo 2 (PCV-2). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.3, p.281-291, 2007.

CASTRO, A.M.M.G.; CORTEZ, A.; RUIZ, V.L.A.; LEOMIL, H.; MORENO, A. M.; DOTO, D.S.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection and differentiation of porcine circovirus in Brazilian pigs. **Veterinary Records**, v.154, n.26, p.728-729, 2004.

CASTRO, A.M.M.G.; RUIZ, V.L.A.; CASTRO, Jr.F.G.; BERSANO, J.G.; MORENO, A.M.; CORTEZ, A.; VILLALOBOS, E.M.C.; LEOMIL, H.; RICHTZENHAIN, L. J. Detecção e diferenciação de circovirus suíno tipo 1 e 2 (PCV-1 e PCV-2) em suínos nas fases de creche e crescimento/terminação em diferentes estados brasileiros e em suínos abatidos no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003, p.107-108.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; ASCOLI, K.; SIMON, N.; MORÉS, N.; OLIVEIRA, S.R.; KRAMER, B. Porcine circovirus type 2 (PCV2): a pathogenic emerging disease virus identified in archived tissues from brazilian swine herds. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 15, 2004, São Pedro. **Anais...** 2004a, p.99-100.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Diagnostic of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine in Brazil caused by porcine circovirus type 2 (PCV2). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, MG, v.55, p.522-527, 2003.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N. Síndrome multissistêmica do desmame do leitão (SMDLD) causada pelo circovirus suíno. In: CONGRESO MERCOSUR DE PRODUCCIÓN PORCINA, 2000, Buenos Aires. **Memoria...** 2000, p.16.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C. Diagnóstico molecular e caracterização de circovirus suíno tipo 2 isolados no Brasil. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10, 2001, Porto Alegre. **Anais...** 2001, p.97-98.

CIACCI-ZANELLA, J.R.; MORÉS, N.; SIMON, N.L.; OLIVEIRA, S.R.; GAVA, D. Identificação do circovírus suíno tipo 2 (PCV2) por reação em cadeia da polimerase e por imunoistoquímica em tecidos suínos arquivados desde 1988 no Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1480-1485, 2006.

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

CHEN, H.T.; ZHANG, J.; YANG, S.H.; MA, L.N.; MA, Y.P.; LIU, X.T.; CAI, X. P.; ZHANG, Y.G.; LIU, Y.S. Rapid detection of porcine parvovirus DNA by sensitive loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Virological Methods**, v.158, n.1-2, p.100-103, 2009.

CHEN, H.Y.; LI, X.K.; CUI, B.A.; WEI, Z.Y.; LI, X.S.; WANG, Y.B.; ZHAO, L.; WANG, Z.Y. A TaqMan-based real-time polymerase chain reaction for the detection of porcine parvovirus. **Journal of Virological Methods**, v.156, p.84-88, 2009.

CHENG, W.X.; LI, J.S.; HUANG, C.P.; YAO, D.P.; LIU, N.; CUI, S.X.; JIN, Y.; DUAN, Z.J. Identification and Nearly Full-Length Genome Characterization of Novel Porcine Bocaviruses. **PLoS ONE**, v.5, n.10, 2010, Epub ahead of print.

CHEUNG, A.K.; LAGER, K.M.; KOHUTYUK, O.I.; VINCENT, A.L.; HENRY, S.C.; BAKER, R.B.; ROWLAND, R.R.; DUNHAM, A.G. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. **Archives of Virology**, v.152, n.5, p.1035-1044, 2007.

CHEUNG, A.K.; WU, G.; WANG, D.; BAYLES, D.O.; LAGER, K.M.; VINCENT, A.L. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. **Archives of Virology**, v. 155, p. 801-806, 2010.

CHIARELLI, O.; CASTRO, L.A.; SILVA, F.M.F.; BONFÁ, G.; SILVA J.A.; MORAES, M.P.; ALMEIDA, M.R. Isolation of porcine circovirus type 2 (PCV2) in animals from Espírito Santo state. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 16, 2005, Salvador. **Anais...** 2005, p.99.

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.

CLEMENS, K.E.; PINTEL, D.J. The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order. **The Journal of Virology**, v.4, n.62, p.1448-1451, 1988.

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

COHEN, S.; BEHZAD, A.R.; CARROLL, J.B.; PANTÉ, N. Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery. **Journal of General Virology**, v.87, p.3309-3313, 2006.

CORTEY, M., OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; SEGALÉS, J. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature. **Veterinary Microbiology**, 2010. Epub ahead of print.

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.

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.

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 Records**, v.100, p.237-239, 1976.

DONE, S.H.; PATON, D.J. Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. **Veterinary Records**, 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.

DROLET, R.; D'ALLAIRE, S.; LAROCHELLE, R.; MAGAR, R.; RIBOTTA, M.; HIGGINS, R. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. **Veterinary Records**, v.150, n.5, p.139-143, 2002.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L.A.; HOLMES, E.C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature reviews: Genetics**, v.9, n.4, p.267-76, 2008.

DUNNE, H.W. Abortion, stillbirth, fetal death and infectious infertility. In: Dunne, H. W. **Ames: Iowa State University Press**, p.836-868, 1970.

ELLIS, J.A.; ALLAN, G.; KRAKOWKA, S. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2 - associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, n.12, 2008.

ELLIS, J.A.; BRATANICH, A.; CLARK, E.G.; ALLAN, G.; MEEHAN, B.; HAINES, D.M.; HARDING, J.; WEST, K.H.; KRAKOWKA, S.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MARTIN, K.; MCNEILLY, F. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, p. 21-27, 2000.

ELLIS, J.A.; CLARK, E.; HAINES, D.; WEST, K.; KRAKOWKA, S.; KENNEDY, S.; ALLAN, G.M. Porcine circovirus-2 and concurrent infections in the field. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.159-163, 2004.

- ELLIS, J.A.; KRAKOWKA, S.; LAIRMORE, M.; HAINES, D.; BRATANICH, A.; CLARK, E.; ALLAN, G.; KONOBY, C.; HASSARD, L.; MEEHAN, B.; MARTIN, K.; HARDING, J.; KENNEDY, S.; MCNEILLY, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, n.1, p.3-14, 1999.
- ETERPI, M.; MCDONNELL, G.; THOMAS, V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. **Journal of Hospital Infection**, v.73, p.64-70, 2009.
- FARR, G.A.; ZHANG, L.G.; 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 - USA**, 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**, v.180, n.2, p.262-264, 2009.
- FENAUX, M.; HALBUR, P.G.; GILL, M.; TOTH, T.E.; MENG, X.J. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 2494-2503, 2008.
- FERNANDES, L.T.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; SOBESTIANSKY, J.; SCHIOCHET, M.F.; TROMBETTA, C. Coinfecção experimental de circovírus suíno tipo 2 isolado do Brasil e parvovírus suíno em suínos SPF. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.1-8, 2006.
- FRANÇA, T.N.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F.; MORES, N.; ZANELLA, J.R.; DRIEMEIER, D. Surto de circovirose (síndrome multissistêmica de suínos desmamados) no estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.1, p.39-53, 2005a.
- FUJISAKI, Y. Haemagglutination-inhibition test for porcine parvovirus. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.28, n.3, p.135-138, 1975.
- FUJIWARA, K.; KOJIMA, H.; YASUI, S.; OKITSU, K.; YONEMITSU, Y.; OMATA, M.; YOKOSUKA, O. Hepatitis A viral load in relation to severity of the infection. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 2, p. 201-207, 2011.
- GASKINS, H.R.; KELLEY, K.W. Immunology and neonatal mortality. In: VARLEY, M.A. **The Neonatal Pig Development and Survival**. Cab International: Wallingford, 1995, p.39-55.
- GENOV, I.; SURTMADZHIEV, K.; FODOROV, V.; MERMERSKY, K. Parvoviruses isolated from pigs in Bulgaria. **Veterinaria Sbirka**, v.68, n.6, p.3-6, 1971.

GILLESPIE, J.; OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; PELZER, K.; BUECHNER-MAXWELL, V. Porcine Circovirus Type 2 and Porcine Circovirus-Associated Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.1151-1163, 2009.

GILLICK, J.C. An outbreak of swine fetal mummification associated with porcine parvovirus. **Australian Veterinary Journal**, v.53, p.105-106, 1970.

GIROD, A.; WOBUS, C.E.; ZÁDORI, Z.; RIED, M.; LEIKE, K.; TIJSSEN, 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.

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.; AGBANDJEMCKENNA, 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.

GRIERSON, S.S.; KING, D.P.; SANDVIK, T.; HICKS, D.; SPENCER, Y.; DREW, T.W.; BANKS, M. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. **Archives of Virology**. v.149, n.6, p.1171-1183, 2004.

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.

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

GUO, L.J.; LU, Y.H.; WEI, Y.W.; HUANG, L.P.; LIU, C.M. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. **Virology Journal**, v.7, p.273, 2010.

HAMEL, A.L.; LIN, L.L.; NAYAR, G.P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. **Journal of Virology**, v.72, n.6, p.5262-5267, 1998.

HANSEN, M.S.; PORS, S.E.; JENSEN, H.E.; BILLE-HANSEN, V.; BISGAARD, M.; FLACHS, E.M.; NIELSEN, O.L. An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory Disease Complex in Denmark. **Journal of Comparative Pathology**, v.1, 2010.

HARBISON, C.E.; CHIORINI, J.A.; PARRISH, C. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. **Cell: Trends in Microbiology**, v.16, n.5, p.208-214, 2008.

HARBISON, C.E.; LYI, S.M.; WEICHERT, W.S.; PARRISH, C.R. Early Steps in Cell Infection by Parvoviruses: Host-Specific Differences in Cell Receptor Binding but Similar Endosomal trafficking. **Journal of Virology**, v.83, p.10504–10514, 2009.

HARDING, J.C.S.; CLARK, E.G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health Production**, v.5, p.201-203, 1997.

HARDING, J.C.S. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. **Veterinary Microbiology**, v.98, n.2, p.131-135, 2004.

Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; Williams, P.M., 1996. Real time Quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 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 microtubulealtering drugs on AAV2 transduction. **Virology**, v.367, p.10-18, 2007.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. 1.ed. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S. A., 2003.

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.

HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R., GELFAND, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5–3 exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.7276–7280, 1991.

HORWITZ, M. S. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Eds). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p 2587.

HUANG, LV.; ZHAI, S-L.; CHEUNG, A. K.; ZHANG, H-B.; LONG, J-X.; YUAN, S-S. Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in chinese swine herds. **Virology Journal**, v.7, p.333, 2010.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses.
<<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: 26/12/2009.

JELCIC, I.; HOTZ-WAGENBLATT, A.; HUNZIKER, A.; ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E.M. Isolation of multiple TT virus genogroups from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. **Journal of Virology**, v.78, n.14, p.7498-7507, 2004.

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.; COLLINGS, D.F. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. **Research in Veterinary Science**, v.12, p.570–572, 1971.

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

JOHNSON, R.H.; DONALDSON-WOOD, C.R.; JOO, H.S.; 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.; 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.; JOHNSON, R.H. Observations on rapid diagnosis of porcine parvovirus in mummified foetuses. **Australian Veterinary Journal**, v.53, p.106-107, 1977.

JOO, H.S.; JOHNSON, R.H. Serological response in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. **Australian Veterinarian Journal**, v.53, p.550-553, 1977.

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, 1976b.

JÓZWIK, A.; MANTEUFEL, J.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. **Journal of General Virology**, v.90, p.2437-2441, 2009.

KENNEDY, S.; MOFFETT, D.; MCNEILLY, F.; MEEHAN, B.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; ALLAN G.M. Reproduction of lesions of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.122, p.9-24, 2000.

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.

KIATIPATTANASAKUL-BANLUNARA, W.; TANTILERTCHAROEN, R.; SUZUKI, K.; ALBARENQUE, S.M.; THANAWONGNUWECH, R.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Detection of porcine circovirus 2 (PCV-2) DNA by nested PCR from formalin fixed tissues of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) pigs in Thailand. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.64, n.5, p.449-452, 2002.

KILHAM, L.; OLIVIER, L.T. A latent virus of rats isolated in tissue culture. **Virology**, v.7, n.4, p.428 - 437, 1959.

- KIM, J.; CHAE, C. A comparison of the lymphocyte subpopulations of pigs experimentally infected with porcine circovirus 2 and/or parvovirus. **The Veterinary Journal**, v.165, p.325-329, 2003.
- KIM, J.; CHOI, C.; CHAE, C. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome reproduced by co-infection with korean isolates of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.52-59, 2003.
- KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.98, n.1, p.25-31, 2001.
- KIM, J.; HAN, D.U.; CHOI, C.; CHAE, C. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, n.6, p.741-744, 2003a.
- KIM, J.H. e 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.
- 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.
- LANGEVELD, J.P.; CASAL, J.I.; VELA, C.; DALSGAARD, K.; SMALE, S.H.; PUIJK, W.C.; MELOEN, R H. B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface. **Journal of Virology**, v.67, n.2 p.765-772, 1993.
- LAROCHELLE, R.; BIELANSKI, A.; MÜLLER, P.; MAGAR, R. PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.12, p.4629-4632, 2000.
- 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.; YIP, C.C.; QUE, T.L.; LEE, R.A.; AU-YEUNG, R.K.; ZHOU, B.; SO, L.Y.; LAU, Y.L.; CHAN, K.H.; WOO, P.C.; YUEN, K.Y. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. **The Journal of Infectious Diseases**, v.196, p.986–993, 2007.

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.

LEARY, T.P.; ERKER, J.C.; CHALMERS, M.L.; DESAI, S.M.; MUSHAHWAR, I.K. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. **Journal of General Virology**, v.80, p.2115-2120, 1999.

LEE, S.S.; SUNYOUNG, S.; JUNG, H.; SHIN, J.; LYOO, Y.S. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2–negative and Porcine circovirus–associated disease-affected pigs, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, n.2, p.261-264, 2010.

LEMMON, G.H.; GARDNER, S.N. Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.7, n.18, p.1-10, 2008.

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.

LIU, Q.; WANG, L.; WILLSON, P.; BABIUK, L.A. Quantitative, competitive PCR analysis of porcine circovirus DNA in serum from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3474–3477, 2000.

LO-MAN, R.; RUEDA, P.; SEDLIK, C.; DERIAUD, E.; CASAL, I.; LECLERC, C.A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. **European Journal of Immunology**, v.28, p.1401–1407, 1998.

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.

LYOO, K.; PARK, Y.; PARK, B. Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. **Journal of Veterinary Science**, v.2, n.3, p.201-207, 2001.

MAGAR, R.; MÜLLER, P.; LAROCHELLE, R. Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.64, n.3, p.184-186, 2000.

MALDONADO, J.; SEGALÉS, J.; MARTINEZ-PUIG, D.; CALSAMIGLIA, M.; RIERA, P.; DOMINGO, M.; ARTIGAS, C. Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain. **Veterinary Journal**, v.169, n.3, p.454-456, 2005.

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.

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 and Biotechnology**, v.59, n.1, p.45-50, 2002.

MARTINS, R.M.; ROEHE, P.M.; GUIMARÃES, L.J.; RANGEL, E.V. Sorologia de parvovirus suíno em granjas do estado de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. In: V CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1984. **Anais...** Curitiba, PR. p.39, 1984.

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.

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.; BROWN, T.T.; PAUL, P.S. 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.; LAGER, K.M.; ZIMMERMAN, J.K.; SAMARIKEMANI, N.W.; BERAN, G.W. A current assessment of the role of porcine parvovirus as a cause of fetal porcine death. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.33-35, 1991.

MENGELING, W.L. Porcine parvovirus. 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.119-124.

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.2, p.199-210, 2000.

- MIAO, L.F.; ZHANG, C.F.; CHEN, C.M.; CUI, S.J. Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses. **Veterinary Microbiology**, v.138, n.1-2, p.145-149, 2009.
- 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.
- 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.
- MONTAGNARO, S.; SASSO, S.; MARTINO, L.; LONGO, M.; IOVANE, V.; GHIURMINO, G.; PISANELLI, G.; NAVA, D.; BALDI, L.; PAGNINI, U. Prevalence of Antibodies to Selected Viral and Bacterial Pathogens in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. **Journal of Wildlife Diseases**, v.46, p.316–319, 2010.
- MORAES, M.P.; COSTA, P.R.S. Parvoviridae. In: FLORES, E. (Org.). **Virologia Veterinária**, Santa Maria: UFSM, p.275-296, 2007.
- MORI, M.; SATO, K.; AKACHI, S.; ASAH, S.; TANIGUCHI, S.; NARITA, M. Retrospective study of porcine circovirus 2 infection in Japan: seven cases in 1989. **Veterinary Pathology**. v.37, n.6, p.667-669, 2000.
- MORIMOTO, T.; KURIGI, H.; MIURA, Y.; SUJIMORI, T.; FUJISAKI, Y. Isolation of Japanese encephalitis virus and hemagglutinating DNA virus from the brain of stillborn piglets. **National Institute of Animal Health**, v.12, p.127-136, 1972.
- MORÓN, 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.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINECK M.C.; STUDDERT M. J. 1999. **Veterinary Virology**, 3ed, London: Academic Press. p.628.
- MUZYCZKA, N.; BERNS, K.I. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: GRIFFIN, D.M.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**, v.2, 4ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.2327-2359, 2001.
- 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.

NIELSEN, J.; RONSHOLT, L.; SORENSEN, K.J. Experimental infection of pig foetuses with porcine parvovirus. **Veterinary Microbiology**, v.28, p.1-11, 1991.

NISHIZAWA, T.; OKAMOTO, H.; KONISHI, K.; YOSHIKAWA, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.241, p.92-97, 1997.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da PCR. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, julho/dez, n.3, p.10- 13, 2004.

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.

OIE. Office International des Epizooties. <<http://www.oie.int/>>

OKAMOTO, H.; TAKAHASHI, M.; NISHIZAWA, T.; TAWARA, A.; FUKAI, K.; MURAMATSU, U.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. **Journal of General Virology**, v.83, p.1291-1297, 2002.

OLVERA, A.; CORTEY, M.; SEGALES, J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: Phylogeny and clonality. **Virology**, v.357, p.175-185, 2007.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HALBUR, P.G. Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v.19, p.591-615, 2007.

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 Domestic Animals**, v.40, p.57-61, 2005.

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

PALERMO, L.M.; HUEFFER, K.; PARRISH, C.R. Residues in the apical domain of the feline and canine transferrin receptors control host-specific binding and cell infection of canine and feline parvoviruses. **Journal of Virology**, v.77, p.8915-8923, 2003.

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.

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.

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.

PENSAERT, M.B.; SANCHEZ, R.E.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; ALLAN, G.M.; NAUWYNCK, H.J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with special reference to porcine circovirus type 2 infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, n.2, p.175-183, 2004.

PESCADOR, C.A.; ROZZA, D.B.; ZLOTOWSKI, P.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; DRIEMEIER, D. Principais lesões histológicas associadas a circovirose em suínos das fases de crescimento e terminação em rebanhos suínos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11, 2003, Goiânia. **Anais...** 2003, p.105-106.

POGRANICHNIY, R.M.; YOON, K.J.; HARMS, P.A.; SORDEN, S.D.; DANIELS, M. Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.449-456, 2002.

PRIKHOD'KO, G.G.; REYES, H.; VASILYEVA, I.; BUSBY, T.F. Establishment of a porcine parvovirus (PPV) DNA standard and evaluation of a new LightCycler nested-PCR assay for detection of PPV. **Journal of Virological Methods**, v. 111, p. 13-19, 2003.

QI, T.; CUI, S. Expression of porcine parvovirus VP2 gene requires codon optimized E. coli cells. **Virus Genes**, v.39, n.2, p.217-222, 2009.

QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; CALSAMIGLIA, M.; RODRÍGUEZARRIOJA, 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.

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.; 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.

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.

RÁNZ, A.I.; MANCLUS, J.J.; DIAZ-AROCA, E.; CASAL, J.I. Porcine parvovirus: DNA sequences and genome organization. **Journal of General Virology**, v.70, p.2541-2553, 1989.

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.

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.

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.

RODRÍGUEZ-ARRIOJA, G.M.; SEGALÉS, J.; ROSELL, C.; ROVIRA, A.; PUJOLS, J.; PLANA-DURÁN, J.; DOMINGO, M. Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**. v.50, n.2, p.99-101, 2003.

RODRIGUEZ, C.A.R.; HOMEM, V.S.F.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA NETO, J.S.; RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, estado do Pará. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p.501-503, 2003.

ROEHE, P.; SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. Parvovirose. In: SOBESTIANSKY, J. & BARCELLOS, D. (Org.). **Doença dos Suínos**. Goiânia: Cânone editorial. 2007. p.286-293.

ROIC, B.; CAJAVEC, S.; TONCIC, J.; MADIC, J.; LIPEJ, Z.; JEMERSIC, L.; LOJKIC, M.; MIHALJEVIC, Z.; CAC, Z.; SOSTARIC, B. Prevalence of antibodies to

porcine parvovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia. **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.4, p.796-799, 2005.

ROSE, N.; LAROURE, G.; LE DIGUERHER, G.; EVENO, E.; JOLLY, J.P.; BLANCHARD, P.; OGER, A.; LE DIMNA, M.; JESTIN, A.; MADEC, F. Risk factors for porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in 149 French farrow-to-finish herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v.61, n.3, p.209-225, 2003.

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.

RUDEK, Z.; KWIATKOWSKA, L. The possibility of detecting fetal lymphocytes in the maternal blood of the domestic pig, *Sus scrofa*. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.36, p.580-583, 1983.

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.

RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; VIDAL, D.; HÖFLE, U.; VILLANÚA, D.; GAUSS, C.; SEGALÉS, J.; ALMERÍA, S.; MONTORO, V.; GORTÁZAR, C. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. **Theriogenology**, v.65, n.4, p.731-743, 2006.

SAHA, D.; LEFEBVRE, D.J.; VAN DOORSSELAERE, J.; ATANASOVA, K.; BARBE, F.; GELDHOF, M.; KARNIYCHUK, U.U.; NAUWYNCK, H.J. Pathologic and virologic findings in mid-gestational porcine fetuses after experimental inoculation with PCV2a or PCV2b. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 62-68, 2010.

SALMON, H. Immunity in the fetus and the newborn infant: a swine model. **Reproduction, Nutrition, Development**. v.24, n.2, p.197-206, 1984.

SALMON, H. The mammary gland and neonate mucosal immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.72, n.1-2, p.143-155, 1999.

SAMBROOK, R.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. p.223.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**. v.24, n.3, p.109-124, 2002.

SEGALÉS, J.; OLVERA, A.; GRAU-ROMA, L.; CHARREYRE, C.; NAUWYNCK, H.; LARSEN, L.; DUPONT, K.; MCCULLOUGH, K.; ELLIS, J.; KRAKOWKA, S.; MANKERTZ, A.; FREDHOLM, M.; FOSSUM, C.; TIMMUSK, S.; STOCKHOFER-ZURWIEDEN, N.; BEATTIE, V.; ARMSTRONG, D.; GRASSLAND, B.; BAEKBO,

- P.; ALLAN G. PCV2 genotype definition and nomenclature. **Veterinary Record**, v.162, p.867-868, 2008.
- 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.
- SIEGL, G. Molecular biology and pathogenicity of human and animal parvoviruses. **Behring Institute Mitteilungen**, v.85, p.6-13, 1990.
- SHANGJIN, C.; CORTEY, M.; SEGALÉS, J. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. **Virus Research**, v.140, n.1-2, p.209-215, 2009.
- SIMPSON, A.A.; HÉBERT, B.; SULLIVAN, G.M.; PARRISH, C.R.; ZÁDORI, Z.; TIJSSSEN, P.; ROSSMANN, M.G. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. **Journal of Molecular Biology**, v.315, n.5, p.1189-98, 2002.
- SHACKELTON, L.A.; HOELZER, K.; PARRISH, C.R.; HOLMES, E.C. Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. **Journal of General Virology**, v.88, p.3294-3301, 2007.
- SHACKELTON, L.A.; PARRISH, C.R.; TRUYEN, U.; HOLMES, E.C. High rate of viral evolution associated with the emergence of canine parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.102, p.379-384, 2005.
- SLOOTS, T.P.; MCERLEAN, P.; SPEICHER, D.J.; ARDEN, K.E.; NISSEN, M.D.; MACKAY, I.M. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. **Journal of Clinical Virology**, v.35, p.99-102, 2006.
- SOARES, R.M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; SAKAMOTO, S.M.; MARTINS, V.G.; BACCI, M.; FERNANDES, F.M.C.; RICHTZENHAIN, L.J. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. **Journal of General Virology**, v.84, p.1505-1515, 2003.
- SOARES, R.M.; DURIGON, E.L.; BERSANO, J.G.; RICHTZENHAIN, L.J. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **Journal of Virological Methods**, v.78, p.191-198, 1999.
- SONG, C.; ZHU, C.; ZHANG, C.; CUI, S. Detection of porcine parvovirus using a TaqMan-based real-time PCR with primers and probe designed for the NS1 gene. **Virology Journal**, v.7, p.353, 2010.
- SORENSEN, K. J., ASKAA, J. Fetal infection with porcine parvovirus in herds with reproductive failure. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.22, p.162-170, 1981a.
- SOUICIE, J.M.; ERDMAN, D.D.; EVATT, B.L.; ANDERSON, L.J.; TOROK, T.J.; EL-JAMIL, M.; BARNHART, E.; TEPPER, M.; BURRIL, H.N.; PICKETT, A.M.; MENGELING, W.L. Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate. **Transfusion Complications**, v.40, p.708-711, 2000.

SOUZA, C.K.; GONÇALVES, K.R.; STRECK, A.F.; GAVA, D.; CORBELLINI, A.O.; PINTO, L.D.; CANAL, C.W. Detection of porcine circovirus type 2 and coinfection with novel viruses in different tissues in piglets with naturally acquired PMWS. In: PORK EXPO 2010 & V FÓRUM INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA -, 09, 2010, Curitiba. **Anais...**2010.

STAEBLE; R.S.; SYDLER, T.; BUERGI, E.; MCCULLOUGH, K.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; POSPISCHIL, A. PMWS: an emerging disease identified in archived porcine tissues. **Veterinary Journal**, v.170, n.1, p.132-134, 2005.

STRECK, A.F., GAVA, D., SOUZA, C.K., GONÇALVES, K.R., BORTOLOZZO, F.P., WENTZ, I., CANAL, C.W. Presence of porcine parvovirus in sera from pigs is independent of antibody titers. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, 2001. Epub and print.

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.

SZELEI, J.; LIU, K.; LI, Y.; FERNANDES, S.; TIJSSEN, P. Parvovirus 4-like virus in blood products. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 561-564, 2010.

TAIRA, O.; OGAWA, H.; NAGAO, A.; TUCHIYA, K.; NUNOYA, T.; UEDA, S. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. **Veterinary Microbiology**, v.139, p347-350, 2009.

TATTERSALL, P.; WARD, D.C. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. **Nature**, v.263, p.106-109, 1976.

TINSLEY, T.W.; LONGWORTH, J.F. Parvoviruses. **Journal of General Virology**, v.20, p.7-15, 1973.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMAN, W.; KOCH, M.A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v.295, p.64-66, 1982.

TISCHER, I.; MIELDS, W.; WOLFF, D.; VAGT, M.; GRIEM, W. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of Virology**, v.91, p.271- 276, 1986.

TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.226, v.2, p.153-167, 1974.

TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 2^aed. Rocca, São Paulo, 1985. 329p.

TIZARD I.R. **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. 6.ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.

THACKER, B.J.; GONZALEZ, P.L. Infectious reproductive diseases in swine. **Compendium Conint. Edu. Vet. Pract**, v.10, p.669-680, 1988.

THOMSON, G.R.; PROZESKY, L. **Porcine Parvovirus infection**. In: COETZER, J. A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. (Eds.). *Infectious diseases of livestock*. South Africa: Oxford University Press. v.2, p.888-894,1994.

TODD, D.; NIAGRO, F D.; RITCHIE, B.W.; CURRAN, W.; ALLAN, G.M.; LUKERT, P.D.; LATIMER, K.S.; STEFFENS, W.L; MCNULTY, M.S. Comparison of three animal viruses with circular single stranded DNA genomes. **Archives of Virology**. v.135, p.117-129, 1991.

TOO, H.L.; LOVE, R.J. Some epidemiological features and effects on reproductive performance of endemic porcine parvovirus infection. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.2, p.50-53, 1986.

TSAO, J.; CHAPMAN, M.S.; AGBANDJE, M.; KELLER, W.; SMITH, K.; WU, H. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. **Science**, v.251, p.1456-1464, 1991.

USDA. Part II: Reference of Swine Health and Health Management in the United States. Fort Collins, CO: USDA: APHIS, VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System; 2000, #N3550202. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/swine/downloads/swine2000/dr_PartII.pdf Acesso em 2 de julho, 2010.

WANG, F.; XIN GUO, X.; GE, X.; WANG, Z.; CHEN, Y.; CHA, Z.; YANG, H. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, **Virus Research**, v.145, p.151–156, 2009.

WARRILOW, D.; NORTHILL, J.A.; PYKE, A.; SMITH, G.A. Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. **Journal of Medical Virology**, v.66, p.524-528, 2002.

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

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

WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; SELBITZ, H.J.; TRUYEN, U. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. **Journal of Virological Methods**, v.134, n.1-2, p.257-260, 2006.

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.2, p.136-43, 1984.

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.; HITCHELL, R.L.; LUEDKE, A.J.; SAUTTER, J.H. The effect of viral and others 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, 1995.

ZÁDORI, Z.; SZELEI, J.; LACOSTE, M.C.; LI, Y.; GARIÉPY, S.; RAYMOND, P.; ALLAIRE, M.; NABI, I.R.; TIJSSEN, P. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. **Developmental Cell**, v.2, p.291-302, 2001.

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.

ZHANG, C.F.; SONG, C.P.; CHEN, C.M.; CUI, S.J.; MIAO, L.F. Reproductive failure in wild boars associated to porcine parvovirus infection and in vivo and in vitro characterization of the causal isolate. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1611-1613, 2010.

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.

ANEXO 1

Resultados da PCR por Amostra/Lote para cada vírus testado: circovirus suíno 2 (PCV2), parvovirus suíno 1 e 2 (PPV1 e PPV2), torque teno sus virus 1 e 2 (TTV1 e TTV2), e hokovirus suíno (PHoV). As siglas representam os órgãos (LN: linfonodos, PL: pulmões, RN: rins, FG: Fígado e B: baço). Número: 1 são as amostras positivas e número 0: são as amostras negativas.

	Amostras/ Lotes	PCV2	PPV1	PPV2	TTV1	TTV2	PHoV
A	LN/0461	1	1	1	0	1	0
	PL/0461	1	0	1	1	1	1
	RN/0461	1	1	1	0	0	1
	B/0461	1	1	1	0	1	1
B	LN/0772	1	1	1	0	0	1
	PL/0772	1	1	1	0	1	1
	RN/0772	1	1	1	0	1	1
	FG/0772	1	0	1	0	1	0
C	LN/0987	1	1	1	0	1	1
	PL/0987	1	1	1	0	1	1
	RN/0987	1	0	1	0	1	1
	FG/0987	1	1	1	0	1	1
	B/0987	1	1	0	0	1	1
D	LN/1467	1	1	0	0	0	0
	PL/1467	1	1	0	0	1	0
	RN/1467	1	1	1	0	1	0
	FG/1467	1	0	1	0	1	0
	B/1467	1	1	1	0	1	0
E	LN/1430	1	1	0	0	1	0
	PL/1430	1	1	0	0	1	0
	RN/1430	1	0	0	0	1	1
	FG/1430	1	1	1	0	1	0
	B/1430	1	1	1	0	1	0
F	LN/1742	1	1	0	0	0	0
	PL/1742	1	1	0	0	1	1
	RN/1742	1	0	0	0	1	1
	FG/1742	1	0	0	0	1	0
	B/1742	1	1	1	0	1	0
G	LN/1725	1	1	1	0	1	1
	PL/1725	1	1	1	0	1	0
	RN/1725	1	1	1	0	1	0
	FG/1725	1	1	1	0	1	0

	B/1725	1	1	1	0	1	1
	LN/2044	1	1	1	1	1	1
	PL/2044	1	1	1	0	1	1
H	RN/2044	1	1	1	0	0	1
	FG/2044	1	1	1	0	1	1
	B/2044	1	1	1	0	1	1
	Total	38	31	28	2	33	21