

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**FREQÜÊNCIA DO PARVOVÍRUS SUÍNO EM FETOS MUMIFICADOS,  
ABORTADOS E NATIMORTOS DETECTADO ATRAVÉS DA  
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

**TATIANA MITIKO KANASHIRO**

BOTUCATU – SP

Dezembro 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**FREQÜÊNCIA DO PARVOVÍRUS SUÍNO EM FETOS MUMIFICADOS,  
ABORTADOS E NATIMORTOS DETECTADO ATRAVÉS DA  
REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)**

**TATIANA MITIKO KANASHIRO**

**Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior**

Trabalho de conclusão de curso realizado no Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BOTUCATU – SP

Dezembro 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS*

Kanashiro, Tatiana Mitiko.

Freqüência do parvovírus suíno em fetos mumificados, abortados e natimortos detectado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)/  
Tatiana Mitiko Kanashiro. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade  
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

1. Suíno - Doenças 2. Suíno - Reprodução 3. Parvovírus

Palavras-chave: Fetos; HA; Parvovírus suíno; PCR;

**Frequência do parvovírus suíno em fetos mumificados, abortados e natimortos detectado através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

Frequency of porcine parvovirus in mummified fetuses, aborted and stillborn detected by polymerase chain reaction

T. M. Kanashiro<sup>1</sup>, T. F. Cruz<sup>1</sup>, A. M. M. G. Castro<sup>2</sup>, K. L. Ferrari<sup>2</sup>, J. P. Araújo Junior<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu

<sup>2</sup>Faculdade de Jaguariúna – Jaguariúna – São Paulo

**RESUMO**

Parvovírus Suíno (PVS) está associado com distúrbios reprodutivos, sendo encontrado em todo o mundo, inclusive no Brasil. Muitos procedimentos diagnósticos são empregados para a sua detecção como, por exemplo, a imunofluorescência, o HA, o HI e a PCR, sendo que este último vem se mostrando como uma importante técnica, por ser específico e sensível. Neste trabalho, utilizamos a PCR para detectar o PVS em fetos de granjas com problemas reprodutivos. Um total de 170 amostras de fetos abortados, mumificados ou natimortos armazenadas congeladas há mais de 3 anos foram testadas pela PCR com primers para a região VP2 do PVS e para o c-myc (controle endógeno). Somente 142 amostras (83,53%) foram positivas para c-myc e, entre elas, apenas seis (4,22%) foram positivas para o PVS, as quais foram submetidas ao HA. Neste teste, a suspensão de hemácias a 1% foi adotada e três amostras (50%) produziram aglutinação, com um baixo título (4). Por esse estudo, o parvovírus suíno foi detectado nas amostras analisadas por PCR e HA e ressalta-se a importância da adoção do controle endógeno quando se trabalha com esse tipo de material, com alto grau de autólise.

Palavras-chave: Parvovírus suíno; fetos; PCR; HA

\* Correspondência para o autor:

Email: [jpessoa@ibb.unesp.br](mailto:jpessoa@ibb.unesp.br)

Instituto de Biociências – Laboratório de Virologia

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Distrito de Rubião Júnior, s/n - 18618-000 – Botucatu – São Paulo

Tel: (14) 3811-6058

### **ABSTRACT**

Porcine parvovirus (PPV) is associated with reproductive failure and it has been found worldwide, including Brazil. Many diagnostic procedures are used for its detection, for example, immunofluorescence, HA, HI and PCR and this is an important technique because it is very specific and sensitive. In this work, the presence of PPV in fetuses from swine farms with reproductive problems was detected by PCR. All of 170 samples from aborted fetuses, mummies or stillborns were sampled by PCR with primers designed to VP2 region of PPV and c-myc (endogenous control). Only 142 samples (83,53%) were positive for c-myc and among them six samples (4,22%) were positive for PPV which were tested in HA. In this test, erythrocytes suspension 1% was used and three samples (50%) agglutinated but they presented low titer (4). For this work, porcine parvovirus was detected in the samples analyzed by PCR and HA. It is important to emphasize the use of endogenous control when material with elevated degree of autolysis is examined.

Keywords: Porcine parvovirus; fetuses; PCR; HA

## INTRODUÇÃO

Parvovírus Suíno (PVS) é um dos principais vírus responsáveis por distúrbios reprodutivos, como morte embrionária, mumificação fetal (Mengeling et al., 1975; Mengeling, 1978), abortamento e natimortalidade (Cartwright et al., 1969; Mengeling et al., 2000). Além disso, o PVS apresenta distribuição mundial, estando presente na maioria dos rebanhos, assumindo deste modo, grande importância econômica. No Brasil, a situação é semelhante, uma vez que estudos sorológicos mostraram a ocorrência de anticorpos anti-PVS em Minas Gerais (Gouveia, 1984) e no Pará (Rodrigues, 2003) e o vírus foi detectado por nested-PCR em amostras fetais originárias de Goiás, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo (Soares et al., 2003).

A parvovirose ocorre quando fêmeas suínas, com até 70 dias de gestação, são expostas ao vírus, principalmente, por via oronasal, infectando os embriões ou fetos transplacentariamente. Após esse período, os fetos passam a ser imunocompetentes o que lhes confere capacidade de resposta imune com produção de anticorpos específicos e possível sobrevivência frente à infecção. O PVS apresenta tropismo por células fetais, pois a sua replicação é dependente de atividade mitótica, sendo que o vírus utiliza enzimas produzidas pela célula para poder se replicar (Mengeling, 1999; Mengeling et al., 2000). Estudos mostram o PVS como um importante cofator que age sinergicamente com o Circovírus Suíno tipo 2 (PCV2) na patogênese da Síndrome Multissistêmica do Definhamento do Leitão Desmamado – PMWS (“Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome”) (Ellis et al., 2000).

O PVS pertence ao gênero *Parvovirus*, à subfamília *Parvovirinae* e à família *Parvoviridae*. Seu genoma consiste em uma fita de DNA (Cartwright et al., 1969) simples, de polaridade negativa, com cerca de 5000 nucleotídeos. Contém duas grandes ORFs (região aberta de leitura) que ocorrem no mesmo frame de sua fita complementar, sendo que a ORF à esquerda codifica uma proteína não-estrutural (NS1) essencial para a replicação viral e a ORF à direita codifica três proteínas do capsídeo (VP1, VP2 e VP3). A ORF à esquerda é altamente conservada entre vários parvovírus, como em MVM (“minute virus of mice”), CPV (“canine parvovirus”) e o PVS tendo 90% de homologia em uma

região codificadora de NS1. A sequência de VP1 chega a ter 73% de homologia com MVM e CPV. Já VP2 não é tão altamente conservada, mostrando homologia de 50 a 60% com FPV (“feline panleucopenia virus”) e 20% com outros (Ranz et al., 1989; Molitor et al., 1983).

O diagnóstico laboratorial pode ser feito por identificação de antígeno viral ou de anticorpos contra ele. O isolamento viral é pouco realizado, pois é um procedimento muito laborioso e demorado, podendo demorar até 30 dias para detecção (Joo e Johnson, 1976), os tecidos utilizados são usualmente tóxicos para os cultivos celulares (Sobestiansky, 1999) e a infectividade em fetos mumificados diminui com o tempo (Mengeling et al., 1975). Utiliza-se a microscopia imunofluorescente para análises de tecidos fetais com menos de 70 dias de gestação, pois anticorpos podem interferir na detecção do antígeno (Mengeling, 2000).

O teste da inibição da hemaglutinação (HI) é uma prova utilizada para detectar anticorpos contra PVS (Joo e Johnson, 1976; Mengeling, 1999; Oravainen et al., 2005) e foi padronizada por Joo et al. (1976a) utilizando métodos para a retirada de inibidores inespecíficos da hemaglutinação e hemaglutininas naturais no soro, que poderiam interferir e dificultar a interpretação. No entanto, os animais podem apresentar altos títulos devido à vacinação (Oravainen et al., 2005) e anticorpos em fetos mumificados, infectados com menos de 70 dias de gestação, não são detectados (Joo et al., 1976b). São citados ainda, a soroneutralização, a imunodifusão e o ELISA (“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) como técnicas utilizadas para a detecção de anticorpos (Mengeling, 1999).

Pode-se também investigar o vírus pelas hemaglutininas presentes em seu capsídeo com o teste da Hemaglutinação (HA). O teste é baseado na propriedade do vírus de aglutinar hemácias de cobaias, ratos, macacos, camundongos, tipo O humano, galinha e gatos (Cartwright et al., 1969; Joo e Johnson, 1976; Joo et al., 1976b).

Já a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) detecta o DNA viral e se mostra bastante sensível e específica, tornando-se uma importante técnica para a aplicação no diagnóstico de rotina de PVS (Molitor et al., 1991; Soares et al., 1999), assim como as variações da PCR que já foram utilizadas em vários trabalhos, como a nested-PCR (Soares et al., 1999; Soares et al., 2003; Belák et al., 1998; Wolf et al., 2008) e a PCR em Tempo

Real (Wilhelm et al., 2005; Wilhelm et al., 2006). A PCR pode detectar o DNA do PVS sob condições em que não se realiza o isolamento, como a presença de anticorpos neutralizantes (Mengeling et al, 2000) ou quando há uma concentração muito baixa de partículas virais mesmo sendo de vírus não viáveis (Soares et al., 1999; Molitor et al., 1991).

O objetivo deste trabalho foi pesquisar, pela PCR, o parvovírus suíno em amostras fetais que apresentavam sinais sugestivos de parvovirose suína.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 170 amostras, consistindo cada uma de uma mistura de vários órgãos (fígado, rim e baço) coletados de fetos mumificados, natimortos ou abortados. Uma quantidade do material foi macerada e suspensa a 20% p/v em TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) sendo 100 µL utilizados para extração de DNA total com o kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare) seguindo o método direto, de acordo com as instruções do fabricante, sendo o DNA eluído com 100 µL de água ultrapura estéril.

Para a amplificação do DNA de PVS foram utilizados primers que detectam uma sequência na região VP2, sendo que o sense 5' - GGG GGA GGG CTT GGT TAG AAT CAC - 3' e o antisense 5' - ACC ACA CTC CCC ATG CGT TAG C - 3' amplificam um fragmento de 197 pares de bases (pb). Realizou-se, também, uma reação para o controle endógeno, utilizando primers para a sequência do gene c-myc consistindo o sense em 5' - CTC CCT GAG ACT CTG CCA TC - 3' e o antisense 5' - GCT GCC TCT TTT CCA CAG AA - 3', os quais amplificam um produto de 247 pb (Wilhelm et al., 2006).

As reações para a realização das PCRs de todas as amostras, tanto para c-myc quanto para PVS, foram preparadas com 4 µL do DNA extraído em um volume final de 20 µL contendo 0,4 µM de cada primer e 1X Go Taq® Green Master Mix (Promega). A amplificação foi realizada no termociclador Mastercycler Gradient – Eppendorf sob as seguintes condições: denaturação inicial a 94 °C por 10 minutos; 39 ciclos consistindo de denaturação a 94 °C por 60 segundos, hibridização dos primers a 60 °C por 60 segundos e

extensão a 72 °C por 60 segundos com um último ciclo de 72 °C por 10 minutos. Em seguida, os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado com 0,01% de SyBR<sup>®</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Como controles positivos (CP) foram utilizados o DNA extraído da vacina contra PVS (Suvaxyn P – Fort Dodge) e de sangue total de suíno para o c-myc. Os controles negativos (CN) da extração e da reação de PCR consistiram de água ultrapura estéril.

As amostras positivas para c-myc e PVS pela PCR foram submetidas ao HA. Para o preparo da suspensão de hemácias, o sangue total de cobaia, mantido em Solução de Alsever (v/v), foi filtrado com algodão e lavado duas vezes com PBS (0,01M PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; 0,14M NaCl; pH 7,4), realizando entre cada lavagem uma centrifugação de 805 x g por 5 minutos, obtendo somente o sedimento de hemácias. Para determinar a melhor diluição da suspensão de hemácias, fez-se um teste com suspensão a 0,6% e a 1%. Em uma placa com fundo em “U” fez-se uma diluição seriada de 0,025 mL de vacina inativada contra parvovirose suína (Suvaxyn P – Fort Dodge) em PBS, sendo essa diluição de razão 2, começando por 1:2 até 1:2048 e feita em duplicata. Em seguida, adicionou-se 0,025 mL de suspensão de hemácias em cada diluição. Após um período de 18 horas a 4 ° C fez-se a leitura. Com isso, testaram-se, em seguida, somente as amostras fetais positivas para c-myc e PVS pela PCR. Primeiramente, prepararam-se as amostras de acordo com Joo et al. (1976b): macerou-se uma quantidade do órgão e fez uma suspensão a 10% (p/v) em PBS sendo essa congelada e descongelada duas vezes e, então, centrifugada a 1.000 x g por 10 minutos a 4 ° C. Utilizou-se 0,025 mL desse sobrenadante para realizar o teste HA nas mesmas condições anteriores mas, adotando somente, a suspensão de hemácias com a melhor diluição determinada. Para o controle positivo, empregou-se como amostra a vacina contra parvovirose suína (Suvaxyn P – Fort Dodge) e o controle negativo consistiu de suspensão de hemácias a 1% e PBS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os materiais analisados foram obtidos de fetos provenientes de granjas com casos clínicos sugestivos de parvovirose suína, dos quais 66 eram de fetos mumificados, 102 natimortos e dois abortados.

Após a extração de DNA, duas PCRs foram desenvolvidas, primeiramente para o c-myc (controle endógeno) e, em seguida, para o PVS.

Para o controle endógeno, sabe-se que o c-myc é um proto-oncogene altamente conservado entre as espécies, com 90-100% de identidade na sequência, cuja expressão possui muitas funções nos processos fisiológicos (Reiner, 1999). Deste modo, ele foi utilizado como controle endógeno neste trabalho e indicou uma extração de DNA bem sucedida, como já foi estudado por Wilhelm et al. (2006). Das 170 amostras analisadas, 28 (16,47%) foram negativas para o c-myc, sendo 25 de fetos mumificados e três de natimortos. Possivelmente, pode ter ocorrido degradação de DNA nas amostras devido ao grau de autólise dos órgãos e/ou pela presença de inibidores da amplificação.

Para a PCR de PVS, foram analisadas somente as amostras positivas para o c-myc, ou seja, 142 amostras (83,53%). Entre essas, apenas seis amostras (4,22%) foram positivas para o PVS (Fig. 1), sendo a maioria (cinco) oriunda de fetos natimortos e uma de feto mumificado. Wolf et al. (2008) também verificou maior frequência de positividade em fetos natimortos. No entanto, em seu estudo, também com fetos oriundos de granja com histórico de problemas reprodutivos, eles encontraram 96,4% de positividade para o vírus utilizando o nested-PCR e primers para a região do gene NS1. Soares et al. (1999), encontrou 75% de fetos positivos ao utilizar a PCR, também com primers para NS1, no entanto, ao empregar o nested-PCR o resultado aumentou para 95,83%.

Os primers utilizados nessa PCR foram desenhados para a região do gene VP2. Essa região por possuir menor homologia com outros parvovírus reconhecem mais seletivamente o PVS (Molitor et al., 1991) ao contrário da região NS1 que possui alta homologia (90%) com todos os outros parvovírus (Soares et al., 1999). De acordo, com Wilhelm et al. (2006), os primers utilizados são específicos para PVS conforme foi comprovado em seu trabalho, no qual foram testados para CPV, parvovírus humano B19 genótipo 1, FPV e para outros

patógenos como PCV2 (circovírus suíno) e PRRSV (vírus da doença respiratória e reprodutiva suína), não ocorrendo amplificação.

Apesar disso, foi detectado um baixo número de amostras positivas ocorrendo, possivelmente, devido à presença de inibidores na amplificação das amostras ou por uma quantidade muito baixa de DNA, sendo necessária, talvez, a realização da nested-PCR, como comentado por Soares et al. (1999).

Com relação ao teste de HA, melhores resultados foram obtidos com a suspensão de hemácias a 1% para a qual a vacina teve um título de 64.

Assim, realizou-se o teste com as amostras, utilizando somente as que foram positivas para c-myc e PVS pela PCR. Das seis amostras testadas, três (50%) foram positivas, mas apresentaram um baixo título (4), sendo estas provenientes de fetos natimortos (Fig. 1 e 2). Títulos baixos para HA em metade das amostras também foram encontrados por Soares et al. (1999), entretanto os autores ressaltam que baixo ou ausente título no HA pode sugerir que também ocorram falsos negativos. Das três amostras negativas, uma era de feto mumificado e os outros dois de natimortos. Isso poderia ter ocorrido por não haver vírus íntegro devido ao grau de deterioração do material ou, ainda, segundo Molitor et al. (1991) a presença de anticorpos nas amostras pode limitar a técnica e uma pequena quantidade de vírus pode não ser detectada, por causa da baixa sensibilidade do teste.

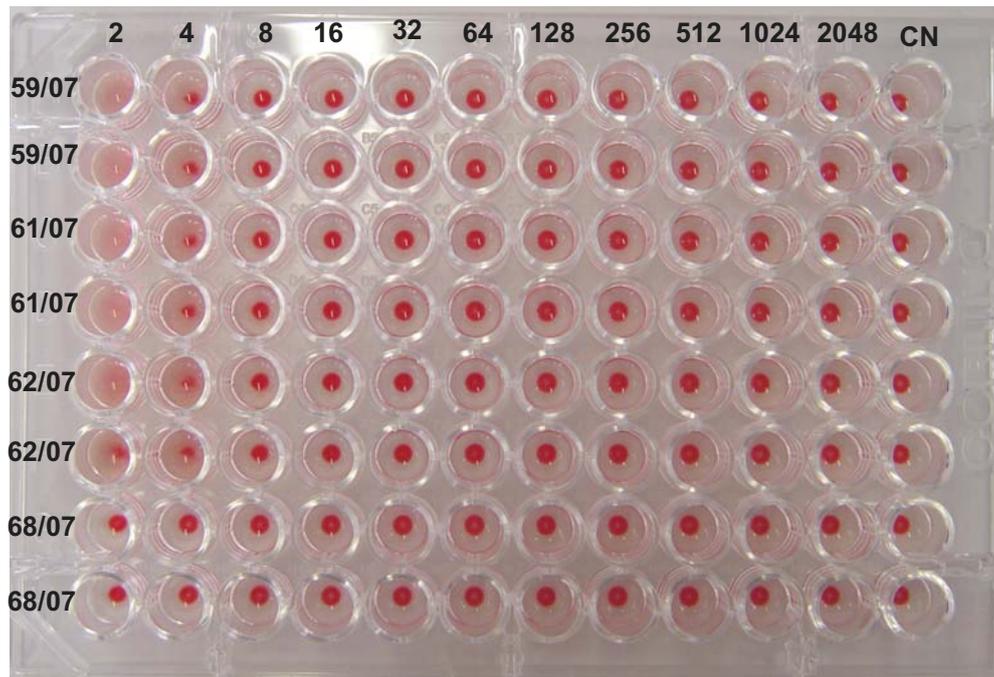


Figura 1. Teste da Hemaglutinação (HA) para o PVS. Placa 1. Colunas: diluições seriadas de razão 2 e CN. Linhas: Amostras testadas em duplicata.

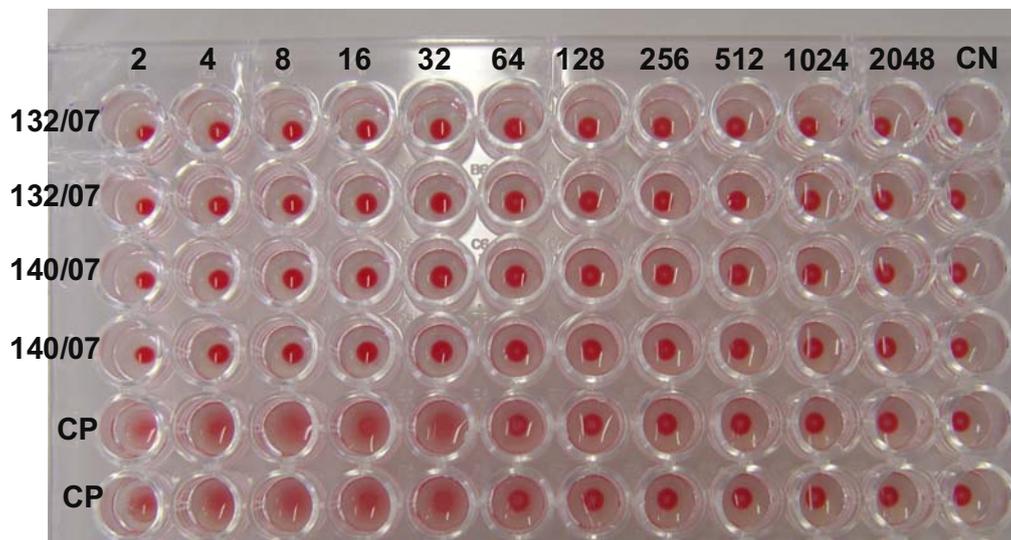


Figura 2. Teste de Hemaglutinação (HA) para PVS. Placa 2. Colunas: diluições e CN (controle negativo). Linhas: Amostras e CP (controle positivo) testadas em duplicata

## CONCLUSÕES

Através da PCR para PVS foram detectadas seis amostras positivas (4,22%) de 142 (83,53%) previamente positivas para o controle endógeno c-myc, considerando-se o total de 170 testadas. Esses resultados demonstram a presença do agente nos materiais analisados, os quais foram obtidos de fetos provenientes de granjas com casos clínicos sugestivos de parvovirose suína, sendo cinco de natimortos e um de feto mumificado. O mesmo pode ser observado com a técnica de HA quando se testou as seis amostras positivas por PCR para PVS e somente três delas aglutinaram, produzindo um título baixo, enquanto as outras três amostras resultaram negativas. Por esse estudo, também pode ser ressaltada a importância de se adotar um controle endógeno, principalmente, quando se analisam amostras problemáticas, como essas que possuem um alto grau de autólise, podendo levar à ocorrência de resultados falso-negativos, sem se considerar as condições do material analisado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELÁK, S.; RIVERA, E.; BALLAGI-PORDÁNY, A. et al. Detection of challenge virus in fetal tissues by nested PCR as a test of the potency of a porcine parvovirus vaccine. **Vet. Res. Commun.**, v.22, p.139-146, 1998.
2. CARTWRIGHT, S. F.; LUCAS, M.; HUCK, R. A. A small haemagglutinating porcine DNA virus. I. Isolation and Properties. **J. Comp. Path.**, v.79, p.371-377, 1969.
3. ELLIS, J. A.; BRATANICH, A.; CLARK, E. G. et al. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.12, p.21-27, 2000.
4. GOUVEIA, A. M. G.; GOMEZ, M. C.; REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemoaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. **Pesq. Vet. Bras.**, V.4, P.17-22, 1984.

5. JOO, H. S.; JOHNSON, R. H. Porcine parvovirus: a review. **Vet. Bull.**, v.46, p.653-660, 1976.
6. JOO, H. S.; DONALDSON-WODD, C. R.; JOHNSON, R. H. A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. **Aust. Vet. J.**, v.52, p.422-424, 1976a.
7. JOO, H. S.; DONALDSON-WOOD, C. R.; JOHNSON, R. H. Rapid diagnostic techniques for detection of porcine parvovirus infection in mummified foetuses. **Aust. Vet. J.** v.52, p.51-52, 1976b.
8. MENGELING, W. L.; CUTLIP, R. C.; WILSON, R. A. et al. Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.166, n.10, p.993-995, 1975.
9. MENGELING, W. L. Prevalence of porcine parvovirus-induced reproductive failure: an abattoir study. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.172, n.11, p.1291-1294, 1978.
10. MENGELING, W. L. Porcine Parvovirus. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S. D.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. (Eds). 8.ed. Diseases of Swine. Ames: Iowa State University Press, Iowa, 1999, p.187-200.
11. 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. **Anim. Reprod. Sci.**, v.2, p.199-210, 2000.
12. MOLITOR, T. W.; JOO, H. S.; COLLETT, M. S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. **J. Virol.**, v.45, n.2, p.842-854, 1983.
13. MOLITOR, T. W.; ORAVEERAKUL K.; ZANG, Q. Q. et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. **J. Virol. Methods**, v.32, p.201-211, 1991.
14. OROVAINEN, J.; HEINONEN, M.; TAST, A. et al. High porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. **Reprod. Dom. Anim.**, v.40, p.57-61, 2005.
15. RANZ, A. I.; MANCLÚS, J. J.; DÍAZ-AROCA, E. et al. Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.2541-2553, 1989.

16. REINER, G.; HECHT, W.; LEEB, T. et al. Isolation and characterization of the porcine c-myc proto-oncogene and chromosomal assignment to SSC 4p13. **Anim. Genet.**, v.30, p.204-206, 1999.
17. RODRIGUEZ, C. A. R.; HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B. et al. Soroprevalência de anticorpos anti-parvovírus suíno em suínos do município de Uruará, Estado do Pará. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, p.501-503, 2003.
18. SOARES, R. M.; DURIGON, E. L.; BERSANO, J. G. et al. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. **J. Virol. Methods.**, v.78, p.191-198, 1999.
19. SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B. et al. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. **J. Gen. Virol.**, v.84, p.1505-1515, 2003.
20. SOBESTIANSKY, J.; MORES, N.; ROEHE, P. M. Parvovirose Suína. **Suinocultura Dinâmica**, ano 7, n.21, 1999.
21. WILHELM, S.; ZEEUW, E. J. L.; SELBITZ, H. J. et al. 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. **J. Vet. Med.**, v.52, p.323-326, 2005.
22. WILHELM, S.; ZIMMERMANN, P.; SELBITZ, H. J. et al. Real time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. **J. Virol. Methods**, v.134, p.257-260, 2006.
23. WOLF, V. H. G.; MENOSSI, M.; MOURÃO, G. B. et al. Molecular basis for porcine parvovirus detection in dead fetuses. **Genet. Mol. Res.**, v.7, n.2, p.509-517, 2008.