

EPIDEMIOLOGIA DELLE NUOVE SPECIE DI PARVOVIRUS DEL SUINO IN FOCOLAI DI REPRODUCTIVE FAILURE IN ITALIA

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF NEW PORCINE PARVOVIRUS SPECIES IN REPRODUCTIVE FAILURE OUTBREAKS IN ITALY

FAUSTINI G.¹, TUCCIARONE C.M.¹, DONNESCHI A.², FRANZO G.¹, BONIOTTI B.², ALBORALI G.L.², DRIGO M.¹.

¹Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute (MAPS) - Università di Padova;

²Istituto Zooprofilattico Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: Porcine parvovirus, reproductive failure, real-time PCR.

Keywords: Porcine parvoviruses, reproductive failure, real-time PCR.

RIASSUNTO

All'ormai noto Porcine parvovirus 1 (PPV1), dal 2001 si sono affiancate nuove specie di parvovirus suini (PPV2-7), la cui rilevanza è ancora incompresa. Questo studio intende indagarne la presenza in Italia a partire da feti raccolti da focolai di *reproductive failure* e conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) nel biennio 2019-2020. Avvalendosi di quattro distinte duplex real-time PCR, descritte in studi precedenti, PPV1 e tutte le nuove specie PPV2-7 sono state identificate in almeno un'azienda. Il 46,7% e il 57,4% del totale delle aziende testate rispettivamente nel 2019 e nel 2020 sono risultate positive per almeno una specie di PPV, con frequenza decrescente per PPV6-1-3-7-2. Basse percentuali si sono osservate per PPV4 e PPV5.

Analizzando i nostri risultati in relazione alle frequenze dei patogeni ricercati presso l'IZSLER, nel 2020 co-infezioni tra PPV2-7 e agenti virali e batterici si sono osservate rispettivamente nel 22,2% e 11,1% delle aziende testate; l'associazione più comune è risultata fra PCV-2 e almeno una specie di PPV (23,8%). PPV2-7 sono stati rilevati singolarmente nel 17,8% (2019) e 7,4% (2020) delle aziende. Questo studio oltre a fornire un aggiornamento epidemiologico sul PPV1, evidenzia per la prima volta la circolazione delle nuove specie di PPV sul territorio italiano, come singolo agente e in co-infezione con altri patogeni comunemente responsabili di *reproductive failure*.

ABSTRACT

Since 2001, the well-known porcine parvovirus 1 (PPV1) has been flanked by new species of porcine parvovirus (PPV2-7), whose role is still unclear. This study aims to investigate their presence in fetuses collected from reproductive failure outbreaks in Italy and submitted to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) in the biennium 2019-2020. Four distinct duplex real-time PCRs, described in previous studies, identified PPV1 and all new PPV2-7 species in at least one farm. Positive farms for at least one PPV species accounted for 46.7% and 57.4% of those tested in 2019 and 2020, respectively; the most frequently detected species were in decreasing order PPV6-1-3-7-2. Small percentages were observed for PPV4 and PPV5. In relation to the frequencies of other pathogens routinely screened by IZSLER, in 2020 PPV2-7 co-infections with viral and bacterial agents were observed in 22.2% and 11.1% of the farms, respectively. The most common association was between PCV-2 and at least one PPV species (23.8%). New PPVs were detected alone in 17.8% and 7.4% of the farms in 2019 and 2020, respectively. This study provides both an epidemiological update on the presence of PPV1 and the first

evidence of the circulation of new PPV species in Italy, alone or in co-infection with other pathogens commonly responsible for *reproductive failure*.

INTRODUZIONE

Nell'industria suinicola, le malattie infettive rappresentano una costante minaccia per la salute degli animali e per l'economia dell'intero settore. La loro sorveglianza, comprensione, gestione e prevenzione, a partire dal comparto riproduttivo, appaiono quindi cruciali per rendere un'azienda suinicola competitiva sul mercato. A tal proposito, i virus sono tra gli agenti che più condizionano negativamente le performance riproduttive, soprattutto per le conseguenze che determinano sulle scrofe gravide in termini di malattie sistemiche e aborto (Mengeling et al., 2000), seppur modulate dai fattori relativi alla gestione, all'agente e all'ospite (Althouse et al., 2019).

In questo contesto, il parvovirus suino (dapprima PPV, poi nominato PPV1 in seguito alla scoperta di altre specie) è considerato uno dei principali agenti responsabili di *reproductive failure*, i cui effetti sono riassunti nell'acronimo SMEDI (*stillbirth, mummification, embryonic death and infertility*) (Streck & Truyen, 2020). PPV1 è endemico nella maggior parte del mondo, ed è stato identificato in tutte le categorie produttive. Il principale, se non unico, segno clinico è il *reproductive failure* nelle scrofe che, in gruppi di animali non vaccinati, o in cui la vaccinazione non è stata gestita correttamente, può manifestarsi sotto forma di una vera e propria "*abortion storm*". Al contrario, in verri e in suini adulti all'ingrasso questo patogeno non sembra avere particolare rilevanza clinica.

In tassonomia, secondo quanto riportato dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), il PPV1 è classificato nella famiglia dei *Parvoviridae*, sottofamiglia dei *Parvovirinae* e, a partire dal 2001, sei nuove specie di porcine parvovirus (comunemente note come PPV2-7), lo hanno affiancato, anche se la loro patogenicità ed epidemiologia sono ancora da comprendere realmente.

La circolazione di un virus ad elevato tasso evolutivo come il PPV1, deve essere guardata con interesse, in quanto può portare all'emergere di varianti con differente antigenicità e virulenza (Zimmermann et al., 2006) the complete capsid protein sequences (VP1/VP2, potenzialmente non pienamente coperte dai vaccini sinora disponibili per PPV1. A maggior ragione, la scoperta di nuove specie virali per le quali risultano carenti alcune informazioni sul ruolo epidemiologico e gli strumenti di profilassi indiretta, rappresenta una potenziale minaccia per la suinicoltura.

Alla luce delle evidenze epidemiologiche relative alle nuove specie di PPV riscontrate in altri paesi europei, risulta difficile immaginare in Italia un quadro epidemiologico che sia rimasto immutato negli anni, considerando soprattutto la peculiarità della nostra zootecnia, altamente concentrata a livello territoriale ed interconnessa.

Con l'obiettivo di approfondire le informazioni sull'epidemiologia di PPV1 e delle nuove specie di parvovirus suino in Italia, il presente studio si propone di indagarne la presenza sul territorio italiano a partire da feti provenienti da focolai di *reproductive failure* conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) nel biennio 2019-2020.

MATERIALI E METODI

Campionamento. Il presente studio è stato condotto su campioni di feti suini conferiti all'IZSLER nell'ambito dell'attività diagnostica di routine nel biennio 2019- 2020, provenienti da aziende del Nord Italia con focolai di *reproductive failure* in corso.

Presso l'Istituto, gli organi di interesse (fegato, polmone, cuore e placenta) sono stati prelevati e omogenati in pool di almeno tre feti, tranne per i feti abortiti nelle prime fasi della gestazione che sono stati processati per intero. In Istituto, secondo un protocollo standardizzato, gli omogenati sono stati sottoposti preliminarmente ad analisi batteriologiche per *Escherichia coli* e *Streptococcus suis* e ad analisi molecolari per porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus 2 (PCV-2), PPV1, *Leptospira interrogans* e *Chlamydia spp.* Un'aliquota per ogni scrofa è stata conferita al Laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS. L'IZSLER ha condiviso inoltre un database in Microsoft Excel® successivamente ampliato con i risultati quali-quantitativi delle indagini biomolecolari condotte in questo studio per la ricerca di PPV.

Estrazione degli acidi nucleici. Dai campioni sono stati estratti gli acidi nucleici con il kit Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Durante la fase di estrazione, ad ogni campione è stata aggiunta un'aliquota di controllo interno fornito dal kit QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (QIAGEN).

Disegno e produzione del plasmide. In assenza di campioni la cui positività per le nuove specie di PPV fosse nota e per standardizzazione, è stato disegnato un plasmide contenente le sequenze dei patogeni di interesse (PPV1-7) nelle regioni target delle metodiche di real-time PCR scelte per lo studio (Milek et al., 2019; Palinski et al., 2016).

In assenza di campioni a positività nota per le nuove specie di PPV e per standardizzazione, è stato disegnato un plasmide contenente le sequenze dei patogeni di interesse (PPV1-7) (Milek et al., 2019; Palinski et al., 2016).

Per il disegno del plasmide, sono state scaricate da Genbank le sequenze di riferimento delle specie note di PPV. Dopo l'allineamento in MEGA X (Kumar et al., 2018) ai primer delle metodiche di riferimento, i segmenti di genoma delle varie specie di PPV contenenti le regioni target sono stati concatenati in un'unica sequenza in formato FASTA, poi inviato alla ditta Genscript Biotech (Paesi Bassi).

Metodiche duplex real-time PCR. La ricerca di PPV1 e PPV2, PPV3 e PPV6, PPV4 e PPV5 è stata svolta mediante tre *duplex* real-time PCR descritte da Milek et al., (2019), utilizzando gli stessi primer, sonde e combinazioni di patogeni. La ricerca di PPV7 è stata eseguita secondo la metodica descritta da Palinski et al., 2016, e messa a punto in *duplex*, insieme al saggio per la valutazione del controllo interno. Le metodiche sono state eseguite con il kit QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (QIAGEN) e il termociclatore LightCycler® 96 Instrument (Roche).

La validazione delle metodiche di real-time PCR è stata effettuata a partire da diluizioni seriali in base 10 del plasmide concentrato 10^8 copie/ μ L, per la produzione delle curve standard per la quantificazione e la valutazione della sensibilità analitica.

Analisi statistica. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita tramite Microsoft Excel®. Il titolo virale è stato quantificato nei campioni sperimentali se superiore al LOD della rispettiva metodica, mentre valori inferiori al LOD sono stati comunque considerati ma registrati come positivi non quantificabili. Le aziende di provenienza dei campioni sono state divise per anno di conferimento. Le positività rilevate per le singole aliquote sono state poi raggruppate per azienda. Sono state quindi analizzate le frequenze di positività ai PPV in funzione di anno di campionamento, positività agli altri patogeni del pacchetto diagnostico standard per *reproductive failure* e azienda. La sintesi di queste analisi è stata riportata tramite tabelle e grafici, riassuntivi delle frequenze assolute e relative.

RISULTATI

La validazione delle metodiche ha restituito i seguenti rispettivi valori di efficienza e *limit of detection* (LOD): PPV1 = 1.97 e 10⁰ copie/μL; PPV2 = 2.04 e 10¹ copie/μL; PPV3 = 1.82 e 10¹ copie/μL; PPV6 = 1.87 e 10⁰ copie/μL; PPV4 = 1.76 e 10¹ copie/μL; PPV5 = 1.79 e 10¹ copie/μL; PPV7 = 1.83 e 10¹ copie/μL.

I campioni oggetto delle analisi provenivano da 80 aziende, di cui 45 campionate nel 2019 e 54 nel 2020. Diciannove aziende (24,4%) hanno conferito campioni in entrambi gli anni di monitoraggio.

Complessivamente, sono stati conferiti 562 feti analizzati in 163 aliquote, ognuna corrispondente ad una scrofa.

PPV: aziende positive e co-infezioni. Nell'ottica di un aggiornamento epidemiologico del PPV1 e di una prima ricerca dei PPV2-7, in Tabella 1 sono riportate le positività sulle aziende campionate per anno.

Il primo dato epidemiologico rilevante è quanto emerge dalle aziende positive per PPV1 nel 2019 (6,7%) e nel 2020 (31,5%), per un totale di positività pari al 25% delle aziende testate, a cui solo un'azienda contribuisce in entrambi gli anni. Il PPV1 è anche la specie rilevata a concentrazioni più elevate, con alcuni campioni che hanno registrato titoli molto elevati, attorno a 10⁷-10⁸ copie/μL, in co-infezione rispettivamente con *Chlamydia spp.* e con PCV-3.

Di rilievo epidemiologico interessante è l'identificazione di tutti i nuovi PPV2-7 in almeno un'azienda tra quelle testate nel 2019, con una variabilità che va da un'azienda per i PPV4-5 a 9 aziende per il PPV6. Sia nel 2019 che nel 2020, le specie maggiormente identificate sono in ordine PPV6-1-3-7.

Tabella 1: percentuali di aziende positive ai diversi PPV per anno (45 aziende nel 2019; 54 aziende nel 2020). Le aziende campionate entrambi gli anni sono 19. *Specie di PPV presenti nella stessa azienda nel biennio 2019-2020.

Table 1: percentages of farms positive for each PPVs by year (45 farms in 2019; 54 farms in 2020). Nineteen farms were sampled in both years. *PPV species present in the same farm in 2019-2020.

| Aziende positive per patogeno (conteggio e frequenza relativa) | | | | | | | |
|--|------------|----------|------------|----------|----------|------------|-----------|
| Anno | PPV1* | PPV2 | PPV3 | PPV4 | PPV5 | PPV6 | PPV7* |
| 2019 | 3 (6,7%) | 2 (4,4%) | 8 (17,8%) | 1 (2,2%) | 1 (2,2%) | 9 (20,0%) | 6 (13,3%) |
| 2020 | 17 (31,5%) | 0 (0%) | 9 (16,7%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 12 (22,2%) | 6 (11,1%) |
| Totale | 20 (25,0%) | 2 (2,5%) | 17 (21,3%) | 1 (1,3%) | 1 (1,3%) | 21 (26,3%) | 12 (15%) |

La percentuale di aziende positive per almeno una specie di PPV nel 2019 e nel 2020 è risultata essere rispettivamente pari al 46,7% (21/45) e al 57,4% (31/54). Fra queste, il 23,8% (5/21) e il 29,0% (9/31) sono risultate positive per più di una specie di PPV, rispettivamente nel 2019 e nel 2020. I parvovirus riscontrati più spesso in co-infezione sono il PPV3 e il PPV6, sia nel 2019 che nel 2020, identificati nel 50% delle aziende in cui

era presente una co-infezione tra PPV (n=14).

Co-infezioni fra PPV1-7 e altri agenti. La ricerca di altri patogeni responsabili di *reproductive failure* condotta presso l'IZSLER ha riguardato tutte le 163 aliquote, tranne per il PCV-3 che è stato possibile testare solo in 107 campioni. Nel complesso, le aziende testate per PCV-3 sono 65, di cui 35 testate nel 2019, 23 nel 2020, e 7 in entrambi gli anni. Le percentuali delle aziende positive ai PPV e agli altri patogeni oggetto di screening sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2: percentuali di aziende positive ai diversi agenti infettivi sul totale delle aziende campionate (n=80). *Le percentuali relative a PCV-3 si riferiscono ad un totale di 42 e 30 aziende testate rispettivamente nel 2019 e 2020, e ad un totale di 65 aziende nel biennio (sette aziende testate sia nel 2019 che nel 2020).

Table 2: percentages of farms positive for each infectious agents out of total farms sampled (n=80). *Percentages for PCV-3 refer to a total of 42 and 30 companies tested in 2019 and 2020, respectively, and a total of 65 companies in the two-year period (seven companies tested in both 2019 and 2020).

| Anno | Aziende positive per patogeno (conteggio e frequenza relativa) | | | | | | | |
|---------------|--|------------|----------------|------------|------------|------------|-----------------|----------------|
| | PPV1 | PPV2-7 | Batteriologico | PRRSV | PCV-2 | PCV-3* | Leptospira spp. | Chlamydia spp. |
| 2019 | 3 (6,7%) | 19 (42,2%) | 11 (24,4%) | 7 (15,6%) | 14 (31,1%) | 10 (23,8%) | 0 (0%) | 3 (6,7%) |
| 2020 | 17 (31,5%) | 19 (35,2%) | 12 (22,2%) | 14 (25,9%) | 18 (33,3%) | 1 (3,3%) | 4 (7,4%) | 1 (1,9%) |
| Totale | 20 (25,0%) | 38 (47,5%) | 23 (28,8%) | 21 (26,3%) | 32 (40,0%) | 11 (16,9%) | 4 (5,0%) | 6 (7,5%) |

Dalle analisi condotte presso l'IZSLER, il patogeno maggiormente identificato è il PCV-2. Le co-infezioni tra PCV-2 e almeno una specie di PPV risultano abbastanza comuni essendo state descritte nel 23,8% (19/80) del totale delle aziende testate e nel 59,4% (19/32) di quelle positive per PCV-2.

Il PPV1 è stato riscontrato come singolo agente solo in una azienda (2,2%) nel 2019 (n=45) e in 3 (5,6%) nel 2020 (n=54).

Le aziende positive a PPV1 e almeno un altro agente virale e batterico tra quelli ricercati risultano essere rispettivamente il 2,2% e il 4,4% nel 2019 (n=45) e il 20,4% e il 5,6% nel 2020 (n=54).

Complessivamente, i nuovi PPV sono stati rilevati singolarmente nel 17,8% (8/45) e nel 7,4% (4/54) delle aziende testate rispettivamente nel 2019 e nel 2020. Nessuna azienda ha registrato una positività esclusivamente per i PPV4-5, mentre il PPV2 è l'unico a essere stato individuato sempre in co-infezione con una delle altre specie tra PPV3,6,7. I parvovirus che più frequentemente sono stati rilevati in assenza di qualsiasi altro patogeno sono il PPV3 nel 2019, e il PPV6 nel 2020.

Nel 2019, le nuove specie di parvovirus sono state identificate in co-infezione con almeno uno degli altri agenti virali (PPV1 compreso) nel 20,0% (9/45) e degli agenti batterici nell'8,9% (4/45) del totale delle aziende campionate in quell'anno. Nel 2020 queste percentuali hanno raggiunto rispettivamente livelli del 22,2% (12/54) e dell'11,1% (6/54) delle aziende.

La Figura 1 riassume le percentuali delle aziende positive a PPV1 come singolo agente e in co-infezione con gli altri patogeni sul totale delle aziende testate nel relativo anno. La Figura 2 riporta la stessa sintesi relativamente alle specie PPV2-7.

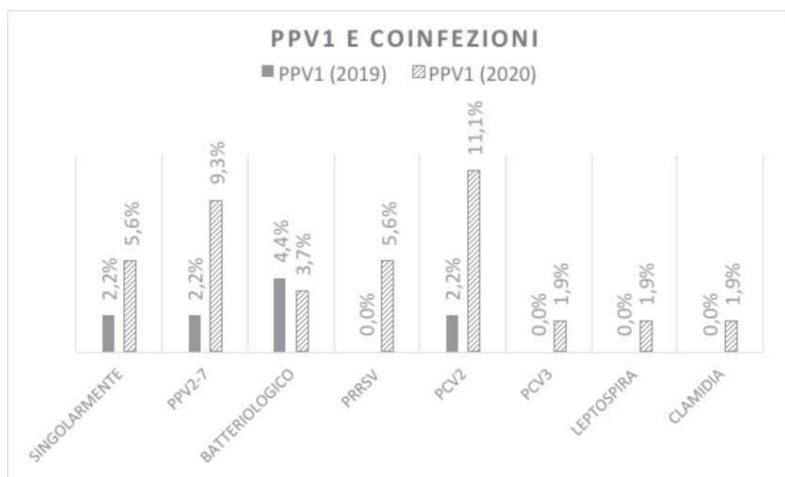


Figura 1: percentuali delle aziende positive a PPV1 come singolo agente e in co-infezione con gli altri patogeni. Le percentuali sono riferite ad un numero totale di 45 aziende nel 2019 e 54 nel 2020. Le percentuali per la co-infezione PPV1 con PCV3 si riferiscono ad un totale di 42 e 30 aziende testate per PCV3 rispettivamente nel 2019 e 2020.

Figure 1: Percentages of farms positive for PPV1 as single agent or in co-infection with other pathogens. Percentages refer to a total number of 45 farms in 2019 and 54 in 2020. Percentages for PPV1-PCV3 co-infection refer to a total of 42 and 30 farms tested for PCV3 in 2019 and 2020, respectively.

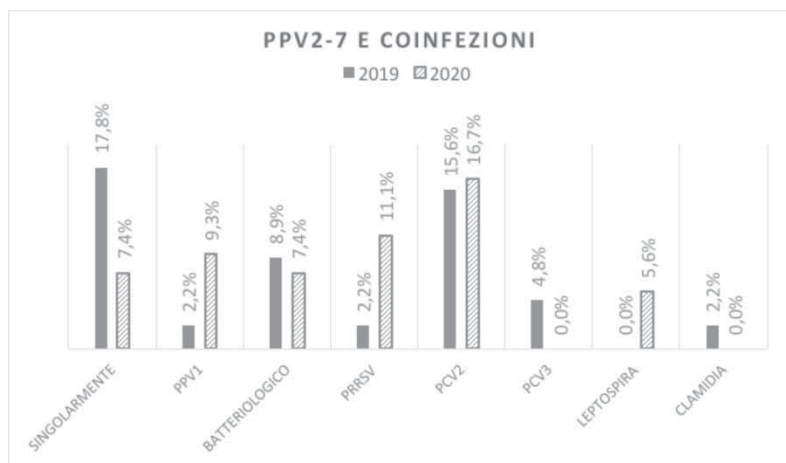


Figura 2: percentuali delle aziende positive ad almeno una delle specie PPV2-7 come singoli agenti e in co-infezione con gli altri patogeni. Le percentuali sono riferite ad un numero totale di 45 aziende nel 2019 e 54 nel 2020. Le percentuali per la co-infezione PPV2-7 con PCV3 si riferiscono ad un totale di 42 e 30 aziende testate per PCV3 rispettivamente nel 2019 e 2020.

Figure 2: Percentages of farms positive for PPV2-7 as single agents or in co-infection with other pathogens. Percentages refer to a total number of 45 farms in 2019 and 54 in 2020. Percentages for new PPVs-PCV3 co-infection refer to a total of 42 and 30 farms tested for PCV3 in 2019 and 2020, respectively.

DISCUSSIONE

Il presente studio fornisce sia un aggiornamento epidemiologico sulla circolazione del PPV1 sia una prima evidenza di circolazione delle nuove specie di PPV in Italia, in co-infezione e come singoli agenti.

Le frequenze riscontrate per PPV1 attestano una sua non trascurabile circolazione negli allevamenti italiani e, alla luce dell'azione non sterilizzante del vaccino ad oggi utilizzato, questo dato non deve meravigliare. Poiché il vaccino è ritenuto in grado di prevenire l'insorgenza della malattia, appare curioso il riscontro di outbreak di patologia riproduttiva in aziende positive esclusivamente al PPV1 sia nel 2019, che nel 2020. Per quanto un'inadeguata gestione della vaccinazione appaia l'ipotesi più probabile, queste evidenze non possono non stimolare importanti considerazioni e valutazioni sull'effetto sinergico del PPV1 con altri patogeni nel meccanismo patogenetico del *reproductive failure*, sulla possibile inefficacia del vaccino nel prevenire la malattia per nuovi ceppi di PPV1 (Zeeuw et al., 2007) e, parallelamente, sul possibile ruolo della vaccinazione come driver di evoluzione (Read & Mackinnon, 2010). Per rispondere a questi interrogativi saranno necessari studi dedicati che prevedano analisi di tipo filogenetico, per approfondire gli aspetti molecolari dell'epidemiologia di PPV1.

Meritevoli di discussione sono anche i risultati relativi a PPV2-7. L'aver individuato tutte le nuove specie di PPV sia come singoli agenti, ad eccezione di PPV4-5, sia in co-infezione con altri patogeni in feti raccolti da focolai di *reproductive failure*, potrebbe essere un indizio di un loro potenziale ruolo eziologico primario e/o sinergico nella patologia riproduttiva. Le diverse frequenze riscontrate per le nuove specie, oltre ad essere condizionate da motivi di natura epidemiologica, potrebbero essere imputabili al loro diverso tropismo tissutale. Studi precedenti descrivono infatti i fluidi orali come la matrice con il più alto tasso di rilevamento per quasi tutti i PPV (Mišek et al., 2019); per il PPV4 anche i tessuti fetali sembravano promettenti (Cságola et al., 2012). Nonostante la matrice analoga e la plausibilità epidemiologica della presenza di PPV4 e 5, il nostro studio ne evidenzia una circolazione molto limitata in Italia. Tuttavia, la scarsa efficienza della metodica per la ricerca di PPV4 e 5 osservata già in fase di validazione, potrebbe essere ricondotta all'utilizzo della stessa coppia di primer nella *duplex* real-time PCR. Questo rappresenta un potenziale ulteriore punto critico da indagare ed eventualmente risolvere. Questo studio descrive inoltre il rilievo delle specie PPV2-3-5 per la prima volta in casi di *reproductive failure*.

CONCLUSIONI

Il rilevamento delle nuove specie di parvovirus ha dimostrato la loro circolazione nel territorio italiano e la co-infezione con agenti patogeni per i quali è già stato descritto un sinergismo con il PPV1. Questo potrebbe far ipotizzare una rilevanza clinica per queste nuove specie virali. Tuttavia, il solo rinvenimento in campioni provenienti da focolai di *reproductive failure* non è sufficiente per supportarne il nesso causale. Pertanto, si rendono necessari ulteriori studi dedicati e standardizzati, che prendano in considerazione soggetti sani e malati, varie matrici e categorie produttive, per verificare il reale impatto delle nuove specie di parvovirus e descriverne la circolazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Althouse, G. C., Kauffold, J., & Rossow, S. (2019). Diseases of the Reproductive System. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine, Eleventh Edition* (pp. 373–390). John Wiley & Sons, Inc.

2. Cságola, A., Lorincz, M., Cadar, D., Tombácz, K., Biksi, I., & Tuboly, T. (2012). Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Archives of Virology*, *157*(6), 1003–1010. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1257-3>
3. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
4. Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (2000). The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 199–210. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00135-4)
5. Miłek, D., Woźniak, A., Guzowska, M., & Stajejek, T. (2019). Detection patterns of porcine parvovirus (PPV) and novel porcine parvoviruses 2 through 6 (PPV2–PPV6) in Polish swine farms. *Viruses*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/v11050474>
6. Palinski, R. M., Mitra, N., & Hause, B. M. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes*, *52*(4), 564–567. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1>
7. Read, A. F., & Mackinnon, M. J. (2010). Pathogen evolution in a vaccinated world. *Evolution in Health and Disease*, 139–152. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0011>
8. Streck, A. F., & Truyen, U. (2020). Porcine Parvovirus. *Current Issues in Molecular Biology*, *37*, 33–46. <https://doi.org/10.21775/cimb.037.033>
9. Zeeuw, E. J. L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.-J., & Truyen, U. (2007). Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, *88*, 420–427. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82302-0>
10. Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H.-J., Heinritzi, K., & Truyen, U. (2006). VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Journal of General Virology*, *87*, 295–301. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81086-0>