

ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMOAGLUTINAÇÃO PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO NO ESTADO DE MINAS GERAIS¹

AURORA M.G. GOUVEIA², MIREYA C. GOMEZ² E RONALDO REIS²

ABSTRACT.- Gouveia A.M.G., Gomez M.C. & Reis R. 1982. [Reproductive failure and survey of hemagglutination inhibiting antibodies to porcine parvovirus in Minas Gerais State, Brazil.] Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o parvovírus suíno no Estado de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 4(1):17-22. Depto Med. Vet. Preventiva, Univ. Fed. Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000, Brazil.

Porcine parvovirus (PPV) is widely described throughout the world as an important agent in reproductive failure in pigs. The prevalence of antibodies to PPV was investigated in sera collected in nine herds from four counties of Minas Gerais State, Brazil. Out of 608 sera tested by the hemagglutination inhibition (HI) technique conducted in microtiter system, 336 (55,3%) had antibodies to PPV in dilutions greater than 1:80 suggesting that the virus is widespread in the swine population considered. The antibody levels were heterogenous in each herd, indicating an infection in evolution.

INDEX TERMS: Parvovirus, swine, porcine, parvoviridae.

SINOPSE.- O parvovírus suíno (PVS) é amplamente descrito no mundo como agente importante na ocorrência de problemas reprodutivos em suínos. A prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS foi estudada em soros colhidos em nove rebanhos provenientes de quatro municípios do Estado de Minas Gerais, Brasil. Dos 608 soros testados através da prova de inibição da hemoaglutinação conduzida em sistema de microtítulo, 336 (55,3%) apresentaram anticorpos para o PVS em diluições superiores a 1:80 sugerindo ampla disseminação do vírus na população suína estudada. O perfil sorológico dos animais testados revelou níveis heterogêneos de anticorpos em cada plantel sugerindo infecção em evolução.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Parvovírus, suíno, parvoviridae.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de falhas reprodutivas em rebanhos suínos comerciais é freqüente e suas causas podem ser, dentre outras, de natureza infecciosa, nutricional, genética, tóxica ou de manejo. Entretanto, com o crescente desenvolvimento da suinocultura industrial, os fatores não infecciosos têm sido menos freqüentes, observando-se papel cada vez mais relevante dos agentes infecciosos na ocorrência de alterações reprodutivas tais como

mumificação fetal, natimortalidade, abortos, retorno ao estro e morte embrionária.

A partir dos primeiros isolamentos feitos em suínos abortados ou natimortos na Inglaterra (Cartwright & Huck 1967), inúmeros trabalhos têm sido dedicados ao estudo da patogenicidade do parvovírus (PVS) na incidência dos problemas reprodutivos em suínos.

Numerosos levantamentos sorológicos baseados no teste de inibição da hemoaglutinação (HI) demonstram a ampla difusão do PVS no mundo. Percentagens elevadas de soros suínos oriundos de abatedouros, de rebanhos com problemas reprodutivos e de rebanhos aparentemente normais, possuem anticorpos para o PVS (Vannier et al. 1976).

O PVS foi isolado em diversos países e, na maior parte das vezes, a partir de levantamentos realizados em áreas de alta prevalência de problemas reprodutivos. Sabe-se que o vírus uma vez introduzido em plantéis soro-negativos, dissemina rapidamente envolvendo 100% dos suínos em poucos meses, sendo esta difusão facilitada pela existência dentro da população suína de uma grande heterogeneidade de níveis de anticorpos circulantes (Vannier et al. 1976). O conhecimento das taxas de anticorpos e a análise individual e de rebanho possibilitam o conhecimento da disseminação e do poder patogênico do PVS no plantel e conseqüentemente, a adoção de medidas de controle adequadas a cada caso.

O teste de HI constitui-se no método de eleição para evidenciar anticorpos anti-PVS apresentando resultados similares ao teste de soro-neutralização (Joo et al. 1976).

A revisão bibliográfica revelou que o PVS foi descrito em quase todos os países, excetuando-se os da América Latina. A ocorrência relativamente freqüente de falhas reprodutivas sem causa definida motivou a realização deste trabalho que

¹ Aceito para publicação em 16 de setembro de 1983.

Baseado na tese apresentada por A.M.G. Gouveia como requisito parcial para o grau de Mestre em Medicina Veterinária na Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, em abril de 1982.

² Depto Med. Vet. Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Cx. Postal 567, Belo Horizonte, MG 30000.

objetivou determinar a prevalência de anticorpos para o PVS em soros de suínos no Estado de Minas Gerais e a possível associação entre título de anticorpos para o PVS e a ocorrência de problemas reprodutivos em fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos soros

Suínos provenientes de nove propriedades situadas em quatro municípios do Estado de Minas Gerais, regularmente vacinados contra a peste suína clássica, erisipelose e leptospirose, foram divididos em seis grupos: A, B, C, D, E e F; os grupos A e E representavam granjas diferentes e o grupo F compreendia soros de animais de quatro propriedades que, por não constituírem número representativo das granjas ou por não terem histórico da vida reprodutiva, foram agrupadas para efeito descritivo.

Para o levantamento sorológico foram testados 608 suínos independentemente de raça, sexo ou idade.

Para o estudo clínico-sorológico foram testados 342 animais compreendendo 50 leitões (1 a 150 dias de idade), 163 fêmeas e 129 machos.

Inquérito de opinião

Após prévia notificação do proprietário foi aplicado um inquérito que buscou as seguintes informações:

- local e identificação da propriedade;
- população animal;
- ocorrência de alterações reprodutivas em porcas (tamanho da leitegada, mumificação fetal, natimortos e retorno ao estro);
- manejo sanitário dos animais.

Tratamento dos soros

Os soros testados foram inativados pelo calor a 56°C por 30 minutos e adsorvidos à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos com suspensão de eritrócitos de cobaio a 50% em solução salina fosfatada 0.15 M (PBS) pH 7,2 e suspensão de caolim a 25% em solução salina borato (pH 9,0) nas proporções de 1:1:0,5 respectivamente para remoção de auto-hemoaglutininas e inibidores inespecíficos da aglutinação (Joo et al. 1976, Mengeling 1972). Os adsorventes foram removidos por centrifugação a 1000 g por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes estocados a -80°C até o momento do exame. Os soros originais foram considerados como tendo sido diluídos a 1:2,5 durante o tratamento.

Cultivos celulares

Culturas primárias de células renais de feto suíno foram obtidas por extração com tripsina a 0,25% em solução salina fosfatada pH 7,8 e cultivadas em meio mínimo essencial (MEM)³ suplementado com 10% de soro bovino inativado e antibióticos (200 UI de penicilina G potássica, 200 µg de sulfato de estreptomicina e 5 µg de anfotericina-B por ml).

Vírus

A décima passagem da amostra NADL-2 do parvovírus suíno⁴ em cultivos primários de rim de feto suíno com título hemoaglutinante de 1:256 foi utilizada como antígeno para a prova sorológica. O título das hemoaglutininas virais foi determinado através da prova de hemoaglutinação (HA) em sistema de microtítulo, que consiste basicamente na adição de 0,05 ml de eritrócitos de cobaio a 1% a igual volume de cada uma das diluições duplas de vírus, em microplacas com fundo em "V", utilizando-se microdiluidores e micropipetas de 0,05 ml de capacidade⁵. Controles apropriados de vírus e de eritrócitos foram mantidos

nas mesmas condições. Após um período médio de 2 horas a 4°C, as placas foram examinadas sendo o título hemoaglutinante expresso como a recíproca da maior diluição de vírus que causou hemoaglutinação completa, a qual corresponde a 1 UHA.

Prova sorológica

A presença de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS foi determinada através da técnica de HI em sistema de microtítulo. Utilizando-se microdiluidores de 0,025 ml de capacidade⁵ foram feitas diluições duplas dos soros previamente tratados, em placas de microtítulo com fundo em "V"⁵. A cada diluição foram adicionados 0,025 ml contendo 4 UHA de vírus. As placas foram mantidas a 4°C por 60 minutos para permitir a reação antígeno-anticorpo e a seguir foram adicionados a cada mistura soro-vírus 0,05 ml de eritrócitos de cobaio a 1%. Controles apropriados de soro positivo⁴ e negativo, vírus e eritrócitos foram mantidos nas mesmas condições. As placas foram examinadas após um período médio de 2 horas a 4°C sendo o título inibidor da hemoaglutinação expresso como a recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a aglutinação.

Diluyente

Em todas as provas foi utilizada como diluyente solução salina fosfatada 0,15 M (pH 7,2) suplementada com 0,4% de soroalbumina bovina⁶.

Procedimentos estatísticos

O tamanho da amostra foi estimado por amostragem aleatória simples. Os dados quantitativos foram comparados pelo teste "t" de Student e as tabelas de contingência analisadas pelo teste de X² para a avaliação da dispersão de frequências absolutas (percentual de distribuição) (Zuwaylif 1970).

RESULTADOS

Levantamento sorológico

Nas 608 amostras testadas, 336 (55,3%) foram sorologicamente positivas para o PVS (Quadro 1).

Analisando individualmente as propriedades estudadas verificou-se que a prevalência de animais positivos em cada uma delas foi semelhante à geral, exceto nas granjas D, onde houve

Quadro 1. Prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o parvovírus suíno no Estado de Minas Gerais

Título ^(a)	Nº de soros	%
0 - 40	272	44,7
80 - 10.240 ^(b)	336	55,3
Total	608	100,0

(a) Recíproca da maior diluição de soro que inibiu completamente a hemoaglutinação frente a 4 UHA de PVS.

(b) Foram considerados positivos soros com título igual ou superior a 80.

³ Grand Island Biological Co., Grand Island, New York, USA.

⁴ Gentilmente cedido pela Universidade da Califórnia, Davis, USA.

⁵ LIMBRO Chemical Co., New Haven, Connecticut, USA.

⁶ SIGMA Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

ANTICORPOS INIBIDORES DA HEMOAGLUTINAÇÃO PARA O PARVOVÍRUS SUÍNO

Quadro 2. Prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o parvovírus suíno em propriedades amostradas no Estado de Minas Gerais

Propriedade	Animais examinados	Resultados positivos ^(a)	
		Nº	%
A	126	78	61,9
B	165	88	53,3
C	79	44	55,7
D	48	39	81,3
E	91	49	53,8
F	99	38	38,4

(a) Título igual ou superior a 80.

maior percentual de soros positivos, e na granja F, onde o percentual foi ligeiramente inferior (Quadro 2).

Estudo clínico-sorológico

Verificou-se dentro da população suína examinada, grande heterogeneidade de níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS. Dentro de uma mesma granja foram encontrados animais com títulos sorológicos muito variáveis na faixa considerada ou seja, títulos variando de 0 até ≥ 10240 (Quadro 3, Fig. 1).

De 53 animais examinados com título de anticorpos igual ou inferior a 40, somente 14 (26,4%) apresentaram anteriormente alterações reprodutivas. Por outro lado de 110 suínos com título sorológico superior a 80, 50 (45,5%) haviam apresentado problemas reprodutivos (Quadro 4).

Dos 129 machos de diversas idades examinados, 78 (60,5%) apresentaram título de anticorpos HI para o PVS superior a 80 (Quadro 5).

Por ocasião de um surto de alterações reprodutivas ocorrido na granja B a análise do desempenho reprodutivo por parto de matrizes sorologicamente positivas para o PVS revelou que a frequência de mumificação fetal diminuiu à medida que os partos aumentaram em número, causando elevação signifi-

Quadro 4. Ocorrência de alterações reprodutivas em porcas com diferentes níveis de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS no Estado de Minas Gerais

Animais examinados	Título ^(a)	Nº de animais com alteração	%
53	0 – 40	14	26,4
110	80 – 10.240	50	45,5

(a) Vide Quadro 1.

cativa ($p < 0,05$) no número médio de leitões nascidos vivos por leitegada e decréscimo significativo ($p < 0,05$) da percentagem de leitões nascidos mortos (Quadro 6).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em qualquer região ou país onde não tenha sido assinalada a presença de determinado agente infeccioso, a pesquisa de anticorpos para este agente através de levantamento sorológico representa a primeira etapa para a investigação inicial de sua presença e conhecimento de sua possível importância.

Quadro 5. Ocorrência de machos sorologicamente positivos no teste de HI para o PVS em granjas de suínos do Estado de Minas Gerais

Propriedade	Nºs positivos/ n.ºs examinados(%)	Nºs negativos/ n.ºs examinados(%)
A	12/24 (50,0)	12/24 (50,0)
B	17/33 (51,5)	16/33 (48,5)
C	18/26 (69,2)	8/26 (30,8)
D	18/31 (58,1)	13/31 (41,9)
E	13/15 (86,7)	2/15 (13,3)
Total	78/129(60,5)	51/129(39,5)

(a) Soros com título igual ou superior a 80.

Quadro 3. Distribuição de frequência dos títulos de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para o PVS em soros de suínos no Estado de Minas Gerais

Granjas	Nº soros testados	Frequência dos títulos											
		0	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
A	126	23	8	10	7	17	13	18	9	3	6	3	9
B	165	12	24	23	18	22	20	16	11	5	3	4	7
C	79	7	7	7	16	8	4	10	7	6	2	5	2
D	48	0	3	2	4	13	6	5	3	0	4	5	3
E	91	2	17	8	15	3	16	11	1	7	6	0	5
F	99	29	11	14	7	6	11	8	4	3	3	1	2
Total	608	71	70	64	67	69	70	68	35	24	24	18	28

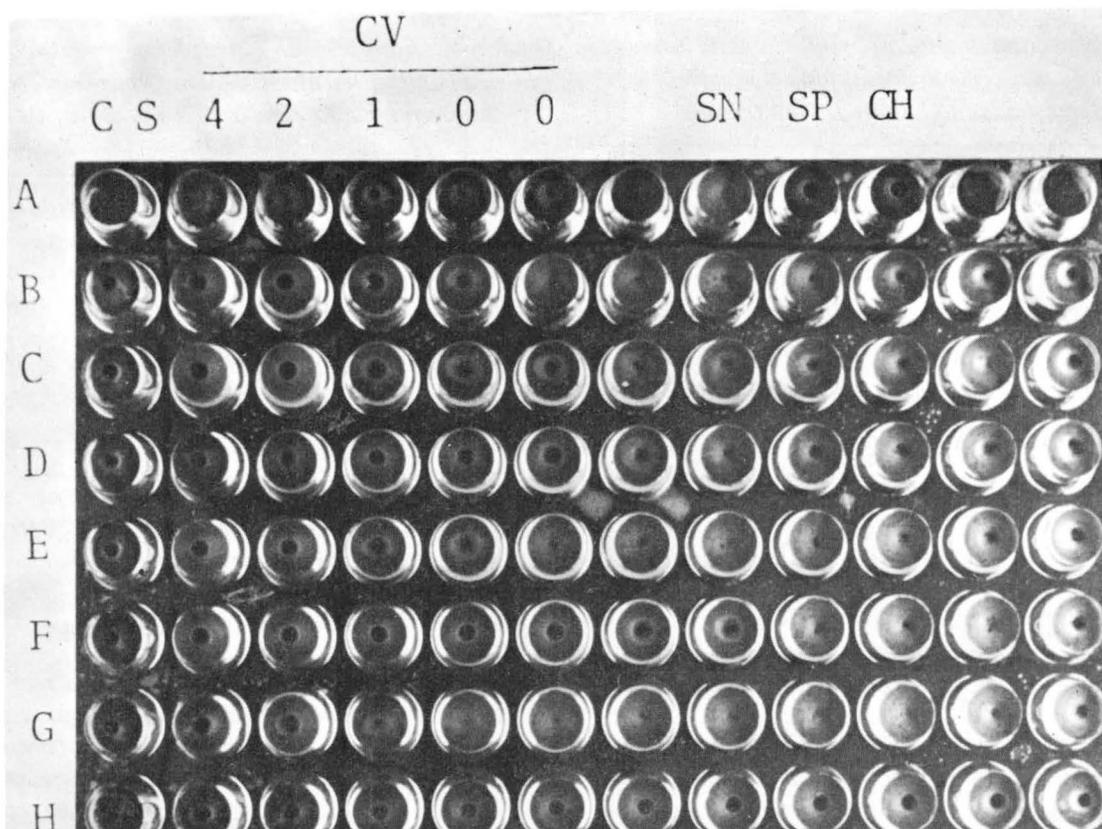


Fig. 1. Prova de inibição da hemoaglutinação (HI) para o pavovírus suíno (PVS) em microtítulo. Coluna CS: controles individuais de soro, diluição 1/5.

Fila A: CV, controles de vírus com 4, 2, 1, 0 e 0 UHA/0,025ml;

SN, controle de soro negativo;

SP, controle de soro padrão positivo;

CH, controle de hemácias;

Filas B a H: diluições duplas de soros em teste.

Com referência ao PVS, a existência de somente um sorotipo do vírus, cujas amostras isoladas em distintos países apresentam propriedades antigênicas idênticas (Vannier et al. 1976), facilita a detecção de anticorpos específicos que indicam contato com o vírus.

Não havendo sido detectada anteriormente a presença do PVS na América Latina, a alta prevalência de anticorpos HI para este vírus (55,3%) indicou a ampla disseminação do PVS na população suína estudada (Quadro 1 e 2). O percentual encontrado foi semelhante aos obtidos em levantamen-

tos realizados em países da Europa (Bachmann 1969, 1970, Horner & Buddle 1974, Vannier et al. 1976, Zupancic 1977, Timbol 1980), África (Pini 1975), Austrália (Johnson & Collings 1969, Coackley & Smith 1972, Johnson 1973, Gillick 1977) e América do Norte (Mengeling 1972, Redmann et al. 1974).

O título de anticorpos necessário para que um animal seja considerado sorologicamente positivo é bastante divergente. Mengeling (1972) ao descrever pela primeira vez a presença do PVS nos Estados Unidos, considerou positivos soros com títu-

Quadro 6. Performance reprodutiva segundo o parto de matrizes com problemas reprodutivos, sorologicamente positivas para o PVS, provenientes de uma mesma granja em Minas Gerais

Parto	Leitegadas examinadas	Nº leitões concebidos	Média nasc. vivos/ leitegada	Nº leitões nasc. mortos	% nasc. mortos ^(a)
1º	10	97	6,3	34	35,1
2º	8	87	8,1	22	25,2
3º	5	73	14,6	8	11,0

(a) Porcentagem do total de leitões concebidos vivos e mortos.

lo superior a cinco. Zupancic (1977) considerou positivos soros com título superior a 32, enquanto que Hogg et al. (1977) estabeleceram positividade em títulos superiores a oito. Em levantamento inicial realizado na França, somente foram considerados positivos soros com título igual ou maior que 320, para evitar possíveis erros devido à presença de inibidores não específicos da hemoaglutinação nos soros de suínos (Vannier et al. 1976). Joo et al. (1976) demonstraram que a adsorção dos soros com caolim e glóbulos vermelhos de cobaio remove estes inibidores inespecíficos sem perda significativa de imunoglobulina e evita reações falsamente positivas ocasionadas por soros auto-aglutinantes. Com base nestes resultados e considerando que os soros testados foram previamente tratados com caolim e eritrócitos de cobaio, que foram mantidos controles individuais de cada soro e que tratava-se de levantamento sorológico inicial, foram considerados positivos à prova de HI os animais que apresentaram anticorpos em diluição igual ou superior a 1:80, não querendo com isto afirmar que estes seriam níveis protetores e sim, indicativos de contato com o PVS.

Analisando individualmente as propriedades amostradas (Quadro 2) verificou-se que, com exceção das granjas D e F, a prevalência de animais sorologicamente positivos foi semelhante, indicando disseminação uniforme do PVS nas granjas estudadas. A granja D, onde predominavam animais com idade superior a 15 meses, apresentou percentual de positividade mais elevado (81,3%) que o de outras granjas. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Harkness et al. (1971), que encontraram maior proporção de soros positivos em animais mais velhos.

O estudo clínico-sorológico realizado nos plantéis onde a ocorrência de alterações reprodutivas é conhecida nos permitiu analisar, dentro de certas limitações, a possível relação entre a presença do PVS nos plantéis, revelada pela detecção de anticorpos específicos, e a ocorrência dos problemas reprodutivos observados.

Segundo Vannier e Tillon (1979), a demonstração da coexistência de animais sorologicamente positivos e negativos para o PVS associada à ocorrência de alterações reprodutivas sem causa definida sugere que a infecção pelo PVS, evidenciada pela presença de anticorpos específicos, pode estar diretamente relacionada com a ocorrência de tais alterações. O perfil sorológico encontrado demonstrou que os níveis de anticorpos dentro de uma mesma propriedade foram variáveis (Quadro 3, Fig. 1) sugerindo infecção em evolução; a coexistência de animais imunes para o PVS, que podem excretar o vírus por mais de 21 dias (Cartwright et al. 1971) e de animais não imunizados, cria condições favoráveis ao desenvolvimento da infecção dentro do plantel e ao aparecimento de problemas reprodutivos.

Uma vez introduzido em plantel negativo, o PVS dissemina-se envolvendo 100% dos animais em aproximadamente três meses (Johnson et al. 1976). Entretanto, o isolamento estrito ao qual os animais são submetidos no regime de criação em confinamento impede que a disseminação do vírus dentro da granja seja uniforme, acarretando conseqüentemente esta heterogeneidade de níveis sorológicos, ocasionando muitas vezes

imunidade dispersa nas porcas e varrões adultos. Gillick (1977) encontrou este mesmo perfil sorológico ao testar suínos criados em confinamento.

Juntamente com este tipo de manejo deve-se considerar a alta taxa de renovação dos plantéis, que não permite a formação de uma população uniformemente imune mas sim a coexistência de animais susceptíveis, imunes e ativamente infectados com eliminação do vírus.

No Quadro 4 observou-se que, dos 110 animais sorologicamente positivos para o PVS, somente 50 (45,5%) apresentaram alterações reprodutivas em alguma fase da vida, sugerindo que os animais podem tornar-se soro-positivos através do contato com o PVS fora do período gestacional, sem apresentar alteração clínica evidente.

A participação simultânea de vários agentes infecciosos na etiologia dos problemas reprodutivos é freqüente (Kirkbride & McAdaragh 1978). Apesar da evidenciação sorológica da ausência de peste suína clássica e leptospirose nestes animais, a presença de outros agentes não testados, como os enterovírus do grupo SMEDI, de ocorrência mundial e de difícil controle, não deve ser descartada.

Uma vez determinado o perfil sorológico de uma granja, deve-se procurar alcançar a maior homogeneidade possível de níveis de anticorpos ativos para o PVS, pois o aumento na proporção de animais soro-positivos acarretará diminuição na ocorrência de problemas reprodutivos.

Nas granjas testadas, a percentagem de machos sorologicamente positivos para o PVS foi de 60,5% (Quadro 5) e a possibilidade de estes animais, se em infecção ativa, transmitirem o PVS a porcas susceptíveis não deve ser descartada. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Ruckerbauer et al. (1978) em uma unidade de inseminação artificial de suínos. Como 51 (39,5%) dos machos testados foram soro-negativos, um posterior contato com o PVS poderia resultar em infecção destes. A patogenicidade do PVS para varrões adultos não foi esclarecida totalmente até o momento, ainda que o vírus tenha sido isolado do sêmen de varrões (Cartwright et al. 1969) e de ovários císticos em porcas inférteis (Johnson 1973) e em ambos os casos tenha sido associado à baixa fertilidade.

Durante um surto de alterações reprodutivas em uma das granjas estudadas verificou-se decréscimo significativo ($p < 0,05$) na freqüência de mumificação fetal e conseqüentemente aumento significativo ($p < 0,05$) no número médio de leitões por leitegada, à medida que os partos aumentaram em número (Quadro 6). A maior freqüência de alterações reprodutivas no 1º e 2º partos estaria relacionada aos níveis de anticorpos ativos e à idade à primeira cobrição, além das taxas de renovação do plantel.

Dentro deste contexto epidemiológico desfavorável, o estudo minucioso das condições sorológicas do rebanho nos indicará as medidas de controle mais adequadas a cada caso especificamente, evitando-se as possíveis perdas econômicas advindas das alterações reprodutivas causadas pelo PVS.

REFERÊNCIAS

Bachmann P.A. 1969. Vorkommen und Verbreitung von Picodna

- (Parvo) Virus beim Schwein. Zentralbl. Veterinaermed., Reihe B, 16(4):341-345.
- Bachmann P.A. 1970. Parvoviren beim Schwein. Zentralbl. Veterinaermed., Reihe B, 17 (1): 192-194. (Vet. Bull. 46(9):658)
- Cartwright S. & Huck R.A. 1967. Viruses isolated in association with herd infertility, abortions and stillbirths in pigs. Vet. Rec. 81 (8): 196-197.
- Cartwright S., Lucas M. & Huck R.A. 1969. A small hemagglutinating DNA virus. I. Isolation and properties. J. Comp. Pathol. 79(3): 371-377.
- Cartwright S., Lucas M. & Huck R.A. 1971. A small hemagglutinating DNA virus. II. Biological and sorological studies. J. Comp. Pathol. 81(1):145-155.
- Coackley W. & Smith V.W. 1972. Porcine parvovirus in Western Australia. Aust. Vet. J. 48(9):536.
- Gillick J.C. 1977. An outbreak of swine foetal mummification associated with porcine parvovirus. Aust. Vet. J. 53(2):105-106.
- Harkness J.W., Chapman M.S. & Darbyshire J.H. 1971. A survey of antibodies to some respiratory viruses in the sera of pigs. Vet. Rec. 88(17):441-447.
- Hogg G.G., Lenghaus C. & Forman A.J. 1977. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. J. Comp. Pathol. 87(4):539-549.
- Horner G.W. & Buddle J.R. 1974. Serological evidence of porcine parvovirus in New Zealand. N. Z. Vet. J. 22(4):61.
- Johnson R.H. 1973. Isolation of swine parvovirus in Queensland. Aust. Vet. J. 49(3):157-159.
- Johnson R.H. & Collings D.F. 1969. Experimental infection of piglets and pregnant gilts with parvovirus. Vet. Rec. 85(14):446-447.
- Johnson R.H., Donaldson-Wood C.R., Joo S.H. & Allender V. 1976. Observations on the epidemiology of porcine parvovirus. Aust. Vet. J. 52(2):80-84.
- Joo S.H., Donaldson-Wood C.R., & Johnson R.H. 1976. A standardised hemagglutination-inhibition test for porcine parvovirus antibody. Aust. Vet. J. 52(9):422-424.
- Kirkbride C.A. & McAdaragh J.P. 1978. Infectious agents associated with fetal and early neonatal death and abortions in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 172(4):480-483.
- Mengeling W.L. 1972. Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the USA. Am. J. Vet. Res. 33(4):2239-2248.
- Pini A. 1975. Porcine parvovirus in pig herds in Southwestern Africa. J. S. Afr. Vet. Assoc. 46(3):241-244.
- Redman D., Bohl E.M. & Ferguson L.C. 1974. Porcine parvovirus: natural and experimental infections of the porcine fetus and prevalence in mature swine. Infect. Immun. 10(4):718-723.
- Ruckerbauer G.M., Dulac G.C. & Boulanger P. 1978. Demonstration of parvovirus in canadian swine and antigenic relationships with isolates from other countries. Can. J. Comp. Med. 42(3):278-285.
- Timbol C.R. 1980. Studies of porcine parvovirus. Philipp. J. Vet. Med. 19(1):81-91.
- Vannier P. & Tillon J.P. 1979. Reliable diagnosis of parvovirus infection in reproductive disorders in swine. Recl. Med. Vet. 155(2): 151-158.
- Vannier P., Leunen J. & Tillon J.P. 1976. Rôle du parvovirus dans les troubles de la reproduction chez le porc. Recl. Med. Vet. 152 (9): 509-516.
- Zupancic Z. 1977. Detection of hemagglutination inhibiting antibodies to 59E/69 parvovirus un serum of pigs in Croatia. Vet. Arh. 47 (3): 143-152. (Vet. Bull. 48 (3): 215)
- Zuwaylif F.H. Estimating the population mean from a sample 1970. In: General applied statistics. 2nd ed. Addison-Wesley, Northridge, p. 116-144.