

Determinación de anticuerpos y antígeno contra parvovirus porcino en fetos colectados en rastro

Humberto Ramírez Mendoza*
Francisco Trigo Tavera**
Pablo Correa Girón***
Héctor Castillo Juárez†
María del Carmen Mercado García*

Abstracts

In this study 36 pregnant uteri obtained from a slaughterhouse were investigated; 4 of them contained embryos in the first third of gestation, 26 were in the second third, and 6 uteri in the last one. From each embryo and fetus collected, the liver and lung were macerated, and positive hemagglutination was detected in fetuses on the second third of gestation from 7 uteri. From these fetuses only 2 were positive to the viral identification using a hyperimmune serum against porcine parvovirus (PPV), while only in 8 fetuses from 13 uteri measuring more than 14 cm, antibodies against PPV were detected. From the results obtained, it is concluded that PPV is capable to infect the embryos or fetuses on different stages of gestation in pregnant sows, and also that PPV can affect just some piglets in the same uterus causing different clinical manifestations.

Key words: PORCINE, PARVOVIRUS, FETUSES.

Resumen

En este estudio se revisaron 36 úteros gestantes que se obtuvieron de rastro; 4 de ellos se encontraban en el primer tercio de gestación, 26 fueron del segundo tercio y 6 estaban en el último tercio. De cada embrión y feto se llevaron a cabo macerados de hígado y pulmón y se detectó hemaglutinación (HA) positiva en fetos de 7 úteros del segundo tercio de gestación; sólo en dos de ellos hubo identidad viral con un suero hiperinmune contra parvovirus porcino (PVP). Mientras que de los fetos de 13 úteros gestantes, que medían más de 14 cm de largo, sólo en 8 fetos se pudieron detectar anticuerpos contra PVP. Se concluye que el PVP es capaz de infectar a la camada en los diferentes estadios de la gestación, y sólo a algunos individuos de una misma camada, causando diferentes manifestaciones clínicas.

Palabras clave: CERDO, PARVOVIRUS, FETOS.

Recibido el 16 de junio de 1997 y aceptado el 23 de febrero de 1998.

* Departamento de Producción Animal: Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

*** CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Carretera México-Toluca, Km 15.5, Palo Alto, 05110, México, D.F.

† Cornell University, Department of Animal Science B-18 Morrison Hall, Ithaca, NY, 14850, USA.

Introducción

Cuando una cerda tiene 4 embriones o menos o si éstos ocupan un solo cuerno uterino durante los primeros 15 días de preñez, la gestación no puede continuar y se presenta la repetición del estro. Sin embargo, en el momento del parto algunas camadas pueden ser de 4 lechones o menos.¹

La eliminación experimental de embriones después del día 15 de preñez, hasta dejar menos de 4 embriones, no es motivo suficiente para interrumpir la gestación.

A partir del día 12 de gestación se pierde entre el 25% y 40% de los embriones, al parecer debido al medio uterino adverso y no por falla en el desarrollo embrionario. Fisiológicamente la muerte embrionaria después del día 30 de gestación es rara, la cual se atribuye a procesos infecciosos, como el parvovirus porcino.^{2,3}

El PVP es un agente infeccioso específico del cerdo, ya que se ha observado que no tiene relación antigénica con otros parvovirus, como el del ratón, rata, gato, perro, bovino, ovino, conejo o el del visón.^{4,5} Sin embargo, pueden existir diferencias en la virulencia, dependiendo de la cepa involucrada.⁶

La infección causada por PVP se manifiesta con reabsorciones embrionarias, mortinatos, momificaciones, infertilidad y nacimiento de lechones débiles.^{5,7,8,9,10,11}

Cuando la infección se presenta antes de la primera mitad de la gestación, ocasionará muerte embrionaria o fetal, con reabsorción o momificación.¹² Cuando la infección trasplacentaria ocurre después de la segunda mitad de la gestación, los fetos sobreviven en útero sin signos aparentes. Esto se debe a que la infección trasplacentaria requiere de 10 a 14 días, o hasta más, para afectar a los fetos; después de 70 días de gestación, los fetos son capaces de mostrar una respuesta inmunológica al virus.^{10,12}

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la presencia del PVP o detectar anticuerpos contra él en fetos de cerdas enviadas a rastro.

Material y métodos

Los fetos se obtuvieron del rastro de Tlalnepantla, en el Estado de México, México. La toma de muestras se realizó durante un mes, posteriormente los fetos fueron transportados en bolsas de polietileno al laboratorio, en donde se pesaron, midieron y se tomaron muestras de hígado y pulmón, las cuales fueron trituradas en un mortero de Tembroeck en una suspensión al 10% con solución salina. La solución se centrifugó y con el sobrenadante se hicieron diluciones de 2 (log2) a 15 (log2) para efectuar la prueba de hemaglutinación (HA). Lo que sobró de cada feto que midiera más de 16 cm de largo, fue devuelto a las bolsas de polietileno para, después de 12 horas, coleccionar los fluidos fetales, centrifugar, coleccionar el sobrenadante y realizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) para detectar

anticuerpos contra PVP. Se consideró como suero positivo aquel que tuviera un título > 8 (log2).¹³

La técnica rápida para evaluar la presencia de PVP en fetos se resume de la siguiente manera:

- Los fetos que midieron menos de 16 centímetros tuvieron menos de 70 días de gestación. En macedados de pulmón e hígado de estos fetos se realizó HA de los sobrenadantes. Las muestras que resultaron positivas se confrontaron con un suero positivo y otro negativo contra PVP para evaluar identidad viral.
- Los fetos que midieron más de 16 centímetros tenían más de 70 días de gestación. Además de intentar buscar al virus se buscaron anticuerpos generados por los fetos. Al colocar los fetos en las bolsas de polietileno se desprendieron líquidos corporales y a partir de estos líquidos, se realizó la prueba de IHA.

Para estimar la edad fetal (EF) se midió la longitud de los fetos (LF). Las medidas se obtuvieron a partir del occipital hasta la base de la cola (vértebras coccígeas del feto).

La fórmula que se utilizó para hacer esta estimación fue la siguiente:^{14,15}

$$EF = \frac{LF + 70.59}{3.25}$$

En donde: EF= edad fetal en días

LF= longitud del feto en mm.

También se pesaron (PF) y se contó el número de fetos por camada (NF).

A fin de evaluar la presencia del virus se clasificaron los úteros gestantes en aquellos que tuvieron por lo menos un feto con respuesta a la HA o a la IHA. Se les asignó la abreviatura UGP (úteros gestantes positivos). A los fetos en donde se pudo determinar la respuesta a través de dichas pruebas, se les asignó la abreviatura FETOPO (fetos positivos)

Análisis estadístico

Los resultados fueron transformados a logaritmo base 2 (log 2) para analizarlos y poder realizar medias aritméticas.¹⁶ Se aplicó también la prueba de Behrens-Fisher para comparar las medias de las variables: peso, largo, edad y número de fetos.¹⁷

Resultados

Cuatro de los úteros gestantes se encontraban en el primer tercio de la gestación; los fetos medían en promedio entre 3.1 y 5.5 cm; pesaban entre 5.8 y 20 g y la edad estimada era entre 30 y 38 días (Cuadro 1).

El número de fetos de los 4 úteros gestantes que se encontraban en el primer tercio de gestación fue de 7 a

Cuadro 1
ÚTEROS GESTANTES EN EL PRIMER TERCIO DE
GESTACIÓN (<38 DÍAS)

Útero gestante (número)	Estimación edad fetal (días)	Número de fetos	Longitud promedio (cm)	C.V. (%)	Peso promedio (g)
10	30	8	3.1	3.6	5
38	38	7	5.5	5.0	20
39	34	9	4.3	5.8	10
42	33	7	3.8	6.3	4

CV: Coeficiente de variación.

9 y en ninguno de éstos se pudo observar HA a partir del macerado de hígado y pulmón.

En el segundo tercio de gestación se encontraron 26 úteros gestantes; cada feto medía en promedio entre 6.7 y 16.62 cm y el peso osciló entre 15 y 291 g (Cuadro 2).

De estos úteros se pudo detectar HA a partir de los fetos; sin embargo, la HA se presentó sólo en algunos fetos de los úteros identificados con los números 26, 30, 31, 32, 34, 35 y 41. El título hemaglutinante fue entre 4 y 9 (log 2).

Los sobrenadantes de los macerados de hígado y pulmón de los fetos que resultaron positivos a la HA, se diluyeron hasta obtener 8 unidades hemaglutinantes. Al confrontarlos con un suero positivo y otro negativo contra parvovirus porcino, solamente algunos fetos de los úteros 30, 31 y 32 fueron positivos a la IHA. El título que se obtuvo en éstos fue de 12 (log 2).

Cuadro 2
ÚTEROS GESTANTES EN EL SEGUNDO TERCIO DE GESTACIÓN (>38< 76 DÍAS)

Útero gestante (número)	Estimación edad fetal (días)	Número de fetos	Longitud promedio (cm)	C.V.	Peso promedio (g)	C.V. (%)	Número de fetos (+) HA	Número de fetos (+) IHA
8	60	11	12.5	3.2	126	8.2		
9	70	4	16.0	14.0	236	4.7		
15	42	8	6.7	5.2	15	16.5		
16	48	9	8.7	5.2	39	6.6		
17	43	6	7.4	4.6	22	5.6		
19	73	8	16.6	4.2	337	13.6		2
20	60	10	12.4	15.3	137	17.3		
21	61	5	13.0	6.3	163	5.2		
22	44	8	7.5	4.2	33	2.9		
24	44	5	7.4	3.9	28	3.9		
25	49	7	9.0	3.4	41	7.9		
26	57	6	11.5	5.0	95	14.4	2	
27	57	5	11.5	2.8	100	6.3		
28	49	6	9.0	12.0	39	28.6		
29	47	8	8.7	6.6	48	3.7		
30	47	4	8.6	11.6	38	3.2	1	
31	72	12	16.6	8.6	291	20.9	4	
32	62	6	13.2	5.0	184	4.5	1	
33	50	7	9.3	3.9	73	45.8		
34	60	8	12.5	5.2	131	6.4	2	
35	68	6	15.2	4.0	245	7.8	1	
36	69	9	15.6	2.8	251	39.4		5
37	65	6	14.4	5.0	186	14.9		
41	64	8	14.1	7.8	191	16.6	2	
44	52	3	10.1	2.1	68	5.8		
46	51	10	9.8	7.5	89	12.3		

CV: Coeficiente de variación.

HA: Hemaglutinación.

IHA: Inhibición de la hemaglutinación.

Cuadro 3
ÚTEROS GESTANTES EN EL TERCER TERCIO DE GESTACIÓN (76 DÍAS)

<i>Útero gestante (número)</i>	<i>Estimación edad fetal (días)</i>	<i>Número de fetos</i>	<i>Longitud promedio (cm)</i>	<i>C.V.</i>	<i>Peso promedio (g)</i>	<i>C.V. (%)</i>	<i>Número de fetos (+) IHA</i>
11	86	10	21.5	6.6	762	18.6	1
12	96	5	24.2	2.6	1327	9.0	2
18	90	7	22.5	7.8	772	21.5	3
43	80	3	19.1	1.5	557	19.3	2
45	96	7	24.2	5.8	1153	18.6	5
47	80	5	18.8	12.6	466	18.9	1

CV: Coeficiente de variación.
IHA: Inhibición de la hemaglutinación.

Cuadro 4
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE LOS ÚTEROS GESTANTES ANALIZADOS

<i>Variable</i>	<i>Promedio X</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>C.V.</i>
NF	7.02	2.15	30.6
EF	59.08	17.27	29.2
LF	12.33	5.56	45.1
PF	230.08	316.09	137.4
FETOPO	0.94	1.98	
RES	0.30	0.46	

n = 36
NF: Número de fetos por camada
EF: Edad fetal
LF: Longitud fetal
PF: Peso fetal
FETOPO: Fetos positivos
RES: Camada con respuesta
CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 5
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE LOS FETOS QUE NO GENERARON RESPUESTA A LAS PRUEBAS DE HEMAGLUTINACIÓN O INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

<i>Variable</i>	<i>Promedio X</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>C.V.</i>
NF	7.08	1.93	27.2
EF	51.04	11.05	21.6
LF	9.73	3.56	36.6
PF	85.82	73.00	85.1

n = 25
CV: Coeficiente de variación.
NF: Número de fetos por camada
EF: Edad fetal
LF: Longitud fetal
PF: Peso fetal
CV: Coeficiente de variación.

En el tercer tercio de gestación se encontraron 6 úteros donde los fetos medían entre 18.8 y 24.2 cm, y pesaban entre 466 y 1327 g (Cuadro 3).

En 8 de los 36 úteros gestantes se pudo detectar anticuerpos a partir de fluidos corporales de los fetos. Los 8 úteros en donde se encontraron estos fetos fueron: 11, 12, 18, 19, 36, 43, 45 y 47. La edad fluctuó entre los 69 y 95 días de gestación y el título de anticuerpos fue entre 4 y 8 (log 2).

Los úteros gestantes que manifestaron anticuerpos con los fluidos corporales tenían entre 3 y 10 fetos. El tamaño osciló entre 15.6 cm (útero número 36) y 24.2 cm (úteros con números 12 y 45) con un coeficiente de variación hasta de 12.65 (útero 47). El peso promedio de estos fetos tuvo un rango de 251.0 g (útero con numero 36) a

1327 g (útero con numero 12) con un coeficiente de variación máxima de 39.44 (útero con número 36).

En el Cuadro 4 aparece la descripción de las variables analizadas de todos los úteros gestantes (NF, EF, LF; PF; FETOPO y UGP); el promedio de fetos positivos fue de 0.94. El coeficiente de variación más amplio fue en peso fetal.

En el Cuadro 5 aparecen las mismas variables anteriores pero sólo de los fetos que no generaron respuesta a las pruebas de HA e IHA. En el Cuadro 6 se describen las variables de los fetos que sí generaron respuesta a las pruebas de HA o IHA.

En el Cuadro 7 aparecen las medias y desviaciones estándar de las variables estudiadas en cada uno de los úteros gestantes, donde se observa que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) para las variables peso, largo y edad.

Cuadro 6
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE LOS FETOS
QUE GENERARON RESPUESTA A LAS PRUEBAS
DE HEMAGLUTINACIÓN O INHIBICIÓN
DE LA HEMAGLUTINACIÓN

Variable	Promedio X	Desviación estándar	C.V.
NF	6.90	2.7	39.1
EF	77.36	14.89	19.2
LF	18.22	4.77	26.2
PF	557.95	408.22	73.2
FETOPO	3.09	2.54	

n = 11

CV: Coeficiente de variación.

NF: Número de fetos por camada

EF: Edad fetal

LF: Longitud fetal

PF: Peso fetal

FETOPO: Fetos positivos

CV: Coeficiente de variación.

Cuadro 7
MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LAS VARIABLES
ESTUDIADAS EN LOS FETOS DE LOS ÚTEROS
GESTANTES

	(+) X		(-) X	
	X	S	X	S
Peso	557.95 ^a	408.22	85.83 ^b	73.00
Largo	18.22 ^a	4.78	9.74 ^b	0.51
Edad	77.36 ^a	20.17	51.04 ^b	4.88
Número fetos	6.91 ^a	0.81	7.08 ^a	0.39

n1 = 11

n2 = 25

Diferente literal indica diferencia estadística significativa (P<0.01) según prueba de B-F.

En los 8 úteros gestantes que se encontraban en el segundo tercio de gestación se presentó HA, pero sólo en 3 de ellos se pudo comprobar identidad frente al virus al utilizar un suero testigo positivo y otro testigo negativo. La inespecificidad mostrada por el resto de las muestras que presentaron aglutinación pudo deberse a contaminación bacteriana en el manejo de los fetos.

La HA que se observó en las muestras se pudo generar por la presencia de otros virus hemaglutinantes que atraviesan placenta, como son: el virus de la encefalomiocarditis, rubulavirus porcino o influenza porcina. Para determinar que la HA correspondía a PVP se obtuvieron 8 UHA a partir de las muestras que hemaglutinaron y se confrontaron con un suero positivo y otro negativo a PVP. Cuando el suero positivo reaccionaba con el sobrenadante de la muestra sospechosa se consideró como una HA positiva a PVP.

De todos los úteros gestantes, los que tenían ≤ 6 fetos fueron identificados con los números 9, 17, 21, 24, 26, 30, 32, 35, 37, 43 y 44; sólo en los úteros gestantes 30 y 32 se pudo asociar HA a la presencia del virus. En la camada 30 también se encontró un feto hemorrágico al igual que en la 24; sin embargo, en esta última no se pudo detectar la presencia del antígeno. El hecho de que no se haya podido detectar la presencia del antígeno por HA no significa que el feto no se haya infectado; como sucede con el virus de influenza, del que se requieren 10⁷ viriones para realizar la HA, además de que no siempre es factible aislar el virus debido al tiempo de infección de los fetos.¹⁸ No siempre se pudo asociar el bajo número de fetos con parvovirus porcino, a pesar de que este procedimiento se considera suficientemente confiable para el diagnóstico.¹⁹

Se ha observado también que la concentración de parvovirus en el feto es alta una semana después de que ha tenido contacto con el virus y disminuye en forma progresiva a las 3 y 10 semanas posinfección. Para corroborar la presencia del virus se recomienda intentar el aislamiento a partir de cultivos celulares como testículo de cerdo o riñón fetal porcino, practicar inmunofluorescencia directa en los fetos o realizar pruebas como Dot Blot o PCR.^{6,20}

Los fetos en donde se detectaron anticuerpos correspondieron a animales que tenían 70 o más días de gestación. La presencia de estos anticuerpos en el último tercio de gestación indica que la infección en la hembra se presentó al final del segundo tercio de gestación, ya que de haberse presentado antes le hubiera provocado muerte fetal. La infección trasplacentaria no se presentó en todos los fetos, ya que para que ésta ocurra se requieren periodos prolongados, 10 a 14 días o aún más.²¹

La mayor parte de los fetos se encontraban en el segundo tercio de la gestación. El promedio de gestación de los 36 úteros gestantes fue de 59 días de edad; el promedio de gestación de los úteros gestantes que no generaron respuesta fue de 51 días y el promedio de los que sí generaron respuesta fue de 77. La longitud promedio de todos los fetos fue de 12 cm; la de los fetos

Discusión

Se analizaron 36 úteros gestantes de lechones, de los cuales 25 fueron negativos tanto para HA como para la IHA.

En los 11 úteros gestantes restantes se observó respuesta, 8 para IHA y 3 para HA. Esto representa el 30.56% de respuesta e indica que este porcentaje de los úteros gestantes estuvo en contacto con el virus; por lo menos en un feto de estos úteros gestantes generó respuesta (Cuadro 4), con lo cual se demuestra una vez más la capacidad que tiene el virus de provocar una infección intrauterina.¹⁸

en donde no hubo respuesta fue de 9.74 cm y la de los que resultaron positivos fue de 18.22. El peso promedio fue de 230.08 g para todos los úteros gestantes, 85.83 g en los úteros gestantes negativos y de 557.95 g en los úteros gestantes positivos (Cuadros 5 y 6).

Con estos datos se observa que los animales que resultaron positivos estaban al final del segundo tercio de gestación.

Según el análisis de todas las variables (Cuadro 4), 34 fetos respondieron a una de las 2 pruebas, al distribuirse entre los 36 úteros gestantes analizados representan el 0.94% de fetos positivos por camada. En este mismo análisis los 11 úteros gestantes en donde se observó respuesta representó un promedio de 3.09 fetos positivos para cada uno de los úteros gestantes (Cuadro 6).

A partir de la prueba de Fisher se pudo observar que las varianzas para peso, largo y edad eran diferentes en los úteros gestantes positivos y negativos. Por esta razón, se realizó la prueba de Behrens-Fisher (B-F), para comparar las medias. En el número promedio de fetos no hubo diferencia significativa ($P < 0.01$), aun cuando las varianzas son diferentes. El hecho de tener la misma media, pero variaciones distintas, implica que en las cerdas positivas existe una mayor dispersión, lo que puede deberse a que las cerdas negativas tienen úteros gestantes de tamaño más homogéneo (Cuadro 7). Con estos resultados se puede concluir que el PVP es un agente infeccioso que se encuentra ampliamente diseminado en el medio, que es posible poder determinar la infección en fetos a partir de macerados de órganos (antígeno) y de líquido en cavidades (anticuerpos), principalmente durante el segundo tercio de la gestación.

Al evaluar cada camada se observó que no todos los fetos se afectan simultáneamente, ya que no se logró determinar el antígeno (HA) o identificar anticuerpos (IHA) en todos los fetos. Además de que los úteros gestantes que resultaron positivos presentaron fetos de tamaño irregular. Con lo anterior se concluye que el PVP es capaz de infectar a los fetos en los diferentes estadios de la gestación y sólo a algunos individuos de una misma camada, esto provoca diferentes manifestaciones clínicas. Debido a que el PVP es un agente infeccioso ubicuo, es necesario que en todas las granjas se cuente con programas que incluyan evaluaciones serológicas frecuentes en el pie de cría, así como de los lechones antes de tomar calostro, para determinar la prevalencia de la enfermedad dentro de la granja y el tiempo en que se llevó a cabo la infección, realizar un registro cuidadoso de los parámetros, especialmente dentro de las áreas de servicio, gestación y maternidad (número de repeticiones, porcentaje de fertilidad, número de abortos, porcentaje de momificaciones, número de lechones nacidos total y nacidos vivos, etc.) para instrumentar medidas de control que permitan evitar la infección de las cerdas gestantes y, en consecuencia, las pérdidas en la producción de cerdos, ocasionadas por PVP durante los primeros 70 días de gestación.

Referencias

1. Hunter RHF. Physiological factors influencing ovulation, fertilization, early embryonic development and establishment of pregnancy in pigs. *Br Vet J* 1977;133:461-470.
2. Dhindsa DS, Dziuk PJ. Effect on pregnancy in the pig after killing embryos or fetuses in one uterine horn in early gestation. *Anim Sci* 1968;27:122-126.
3. Dhindsa DS, Dziuk PJ. Influence of varying the proportion of the uterus occupied by embryos on maintenance of pregnancy in the pig. *J Anim Sci* 1968;28:668-672.
4. Hebert B, Dubuc R, Bergeron J, Marsolais G, Tijssen P. Molecular basis of pathogenesis and tropism differences among porcine parvovirus strains. Proceedings of the 14th Congress International Pig Veterinary Society; 1996 July 7-10; Bologna, Italy. Bologna, Italy: International Pig Veterinary Society, 1996:122.
5. Mengeling WL. Porcine parvovirus. In: Leman AD, Glock RD, editors. Diseases of swine. Ames (IA): Iowa State University Press, 1981:352-365.
6. Bergeron J, Jetté R, Montpetit C, Marsolais G, Desco-teaux JP, Tijssen P. Specific detection of porcine parvovirus strains. Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society Congress; 1992 August 17-20; The Hague, Netherlands. The Hague, Netherlands: International Pig Veterinary Society, 1992:99.
7. Lenghaus C, Forman AJ, Hale CJ. Experimental infection of 35, 50 and 60 day old pig fetuses with porcine parvovirus. *Austr Vet J* 1978;54:418-422.
8. Lucas MH, Cartwright SF, Wrathall AE. Genital infection of pigs with porcine parvovirus. *J Comp Path* 1970;84:347-350.
9. Mengeling WL. Porcine parvovirus: frequency of naturally occurring transplacental infection and viral contamination of fetal porcine kidney cell cultures. *Am J Vet Res* 1975;36:41-44.
10. Mengeling WL, Paul PS. Reproductive performance of gilts exposed to porcine parvovirus at 56 or 70 days of gestation. *Am J Vet Res* 1981;42:2074-2076.
11. Sandri GP. Porcine parvovirus (PPV) vaccination of sows, a field trial. 12th Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society Congress; 1992 August 17-20; The Hague, Netherlands. The Hague, Netherlands: International Pig Veterinary Society, 1992:100.
12. Mengeling WL, Cutlip RC. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 1976;37:1393-1400.
13. Vannier P, Cariolet R, Tillon JP. Serological survey of a PPV infection in a pig herd. Circumstances of the onset of the reproductive disorder: Proceedings of the 7th International Pig Veterinary Society Congress; 1982 July 26-31; Mexico (DF). Mexico (DF): International Pig Veterinary Society 1982:190.
14. Chaniago TD, Watson DL, Owen RA, Johnson RH. Immunoglobulins in blood serum of foetal pigs. *Austr Vet J* 1978;54:30-33.
15. Gjerdal F. Age determination of swine foetus. *Acta Vet Scan* 1972;40:1-29.
16. Brugh M Jr. A simple method for recording and analysing serological data. *Avian Dis* 1978;22:362-365.
17. Fisher RA, Yates F. Statistical tables for biological, agricultural and medical research. 6th ed. England (UK): Longman Harlow, 1974.
18. Mengeling WL, Cutlip RC. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 1975;36:1173-1177.

19. Joo HS, Donaldson-Wood CR, Johnson RH. Rapid diagnostic techniques for detection of parvovirus infection in mummified foetues. *Austr Vet J* 1976;52:51.
20. Musilova J, Kubicek O, Kubickuva S. Porcine parvovirus-diagnosis by using DNA probe. *Proceedings of the 12th International Pig Veterinary Society Congress*; 1992 August 17-20; The Hague, Netherlands. The Hague, Netherlands: International Pig Veterinary Society, 1992:98.
21. Mengeling WL, Paul PS, Brown TT Jr. Transplacental infection and embryonic death following maternal exposure to porcine parvovirus near time of conception. *Arch Virol* 1980;65:55-62.