

# 돼지 parvovirus不活化 vaccine 및 中和抗體價測定에 관한 研究

權赫珍 · 芮載吉 · 李昌九

바이엘 動物醫藥研究所

(1988. 1. 20 접수)

## Studies on porcine parvovirus inactivated vaccine and titration of serum neutralizing antibody

Hyock-jin Kwon, Jae-gil Yeh, Chang-koo Lee

Bayer Veterinary Medicine Research Institute

(Received Jan 20, 1988)

**Abstract:** A porcine parvovirus inactivated vaccine was prepared and inoculated to 7 piglets and also 8 guinea-pigs, and their serum antibodies were titrated.

Twenty-two field serum samples of unvaccinated sows were also tested by SN and HI methods. It was observed that SN test was superior over HI test. Therefore, it is suggested that the SN test could well be used in the detection of serum antibody for PPV in vaccinated pigs.

**Key words:** porcine parvovirus, vaccine, neutralizing antibody.

### 緒 論

돼지의 流産 및 死産胎兒로부터 porcine parvovirus (PPV)가 分離報告<sup>1</sup>된 以後 PPV感染症은 全世界의 으로 傳播되어 돼지를 飼育하고 있는 곳에서는 發生되고 있다. PPV에 感染된 돼지는 대체로 臨床症狀은 나타 나지 않으나 初妊豚에 PPV가 感染되면 流産, 死産, 미이라産, 少數分娩 또는 不妊症을 誘發시키는 등 繁殖障 碍를 일으켜 養豚業에 經濟的 損失을 끼치고 있다.<sup>2-5</sup>

PPV는 hemagglutinin을 含有하고 있음으로 이를 利用한 hemagglutination(HA) test를 實施함으로써 PPV의 力價를 推測할 수 있으며, hemagglutination-inhibition(HI) test를 實施하여 PPV의 診斷에 應用하게 되었다. 그러나 많은 研究者들이 이 技法을 應用하여 血中抗體檢査를 實施하였을 때 적지 않은 例에서 非特異反應을 觀察 報告하였다.<sup>6,7</sup> 따라서 PPV에 대한 中和抗體가 없는 돼지라 할지라도 HI test에서는 血清倍數 64로 陽性を 나타내는 例가 허다하다고 指摘되고 있

다. 뿐만 아니라, 돼지 血清中에는 自家凝集素가 存在하고 있기 때문에 中和試驗終了段階에 이르면 培養液을 除去하고 alkaline glycine buffer를 加하여 hemagglutinin를 추출한 후 guinea-pig RBC液을 加한 다음 判讀하여야 하는 欠點이 있다.<sup>8,9</sup> 特異성이 높은 中和反應을 實施하기 위해서는 螢光抗體法을 利用하므로서 血中抗體를 正確히 檢出할 수는 있으나 時間과 努力 그리고 經費가 많이 所要된므로 大衆的인 價値가 없는 것으로 받아들여지고 있다. 著者들은 PPV의 백신개발中, 그와 같은 欠點을 補完하면서 PPV의 力價와 血中抗體價를 容易하게 測定할 수 있는 單純하고 正確한 方法을 確立하였으므로 이에 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

**Virus:** porcine parvovirus strain 9(PPV 9).

**細胞:** 돼지 初代腎臟細胞(SK) 및 돼지 testicle cell line(STL).

**組織培養:** SK는 Paul<sup>8</sup>의 方法에 準하여 培養하였다. 培養液은 Eagle's medium에 fetal bovine serum(FBS)

10%, penicillin 200IU/ml 및 streptomycin 200 $\mu$ g/ml 되게 함유한 것을 사용하였으며 STL細胞의 培養은 위의 medium 中 FBS를 5%로 加한 것을 使用하였다.

**Virus增殖性調査 및 試驗백신製造:** 48時間 培養된 STL細胞에 PPV를 接種하고 37°C에 培養하면서 每日 그 一部를 採毒하여 virus力價를 測定함으로써 增殖性을 調査하였으며 試驗백신은 STL細胞에서 增殖한 PPV를 使用하고, Joo<sup>10</sup>의 方法에 準하여 製造하였다.

**Virus力價測定:** SK細胞를 trypsin-versine(TV)液으로 分散시켜 細胞增殖用 medium에 100萬/ml가 되게 浮遊시키고 4分 試驗管에 0.5ml씩 分注하였다. virus는 10進法으로 稀釋하여 各 稀釋液을 SK細胞가 分注되어 있는 5個의 試驗管에 接種하고 37°C에 4日間 靜置培養하였다. 4日後 舊 medium을 除去하고 goat serum albumin(GSA)를 0.2% 加한 medium을 0.5ml씩 加하여 다시 3日間 培養하였다. 여기에 0.6% guinea-pig RBC液 0.5ml를 加하고 잘 混合한 다음 4°C에 1時間 放置한 후 判讀하였다. HA現象을 나타내는 virus 感染細胞를 陽性으로 判讀하고 그 結果를 Reed와 Muench 法으로 計算하여 TCID<sub>50</sub>/ml를 算出하였다.

**血中中和抗體價測定:** 可檢血清을 56°C에 30分間 非動化하고 2倍 또는 10進法으로 稀釋하였다. 여기에 同量의 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml가 含有된 PPV液을 加한 후 37°C에서 2時間 感作시킨 다음 virus力價測定時와 同一한 方法으로 準備한 SK細胞에 接種하고 處理하였다. HA現象을 抑制한 可檢血清의 最高稀釋倍數를 血

中中和抗體價로 算出하였다.

**Hemagglutination(HA) test 및 hemagglutination-inhibition(HI) test:** HA抗原은 STL細胞에서 增殖시킨 PPV를 使用하였으며 稀釋液은 pH 7.2의 Dulbecco 磷酸緩衝液(PBS)를 使用하였다. HA 및 HI test는 Joo<sup>7</sup>의 方法에 準하여 實施하였다.

## 結 果

**Porcine parvovirus의 STL細胞에 대한 增殖性:** 48時間 培養한 STL細胞에 PPV種毒을 10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml가 되게 接種하였던 바 3日後에 virus力價는 10<sup>8.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml로서 最高의 力價에 達하였으나 HA價는 16倍/0.4ml였다. HA價는 4日後에 256倍/0.4ml로 最高의 力價를

**Table 1.** Growth ability of porcine parvovirus in swine testicle cell line culture

| Virus | Inoculum (TCID <sub>50</sub> /ml) | Harvest (day) | Virus titer (TCID <sub>50</sub> /ml) | HA titer (0.4ml <sup>1</sup> ) |
|-------|-----------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| PPV 9 | 10 <sup>6.0</sup>                 | 1             | 10 <sup>5.7</sup>                    | 2                              |
|       |                                   | 2             | 10 <sup>7.9</sup>                    | 16                             |
|       |                                   | 3             | 10 <sup>8.5</sup>                    | 16                             |
|       |                                   | 4             | 10 <sup>8.1</sup>                    | 256                            |
|       |                                   | 5             | 10 <sup>7.5</sup>                    | 256                            |
|       |                                   | 5             | 10 <sup>7.7*</sup>                   | 256                            |

\*: Cell associated virus.

**Table 2.** Immune response of experimental piglet inoculated with trial porcine parvovirus inactivated vaccine

| Experimental animal | Piglet No | Inoculum (ml) /route | Serum antibody titer (weeks after vaccination) |     |    |     |    |     |    |     |    |     |      |     |       |     |      |     |      |     |
|---------------------|-----------|----------------------|--|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|------|-----|-------|-----|------|-----|------|-----|
|                     |           |                      | Pre-vac.*                                      |     | 1  |     | 2  |     | 3  |     | 4  |     | 5    |     | 6     |     | 7    |     | 8    |     |
|                     |           |                      | NT   | HI  | NT | HI  | NT | HI  | NT | HI  | NT | HI  | NT   | HI  | NT    | HI  | NT   | HI  | NT   | HI  |
| Piglet              | 1         | 2/IM                 | <1   | 64  | 4  | 128 | 16 | 256 | 20 | 128 | 20 | 128 | **10 | 128 | 320   | 64  | 500  | 128 | 320  | 128 |
|                     | 2         |                      | <1   | 64  | 2  | 128 | 32 | 256 | 25 | 256 | 20 | 128 | **8  | 128 | 5000  | 128 | 3200 | 256 | 3200 | 512 |
|                     | 3         |                      | <1   | 64  | 3  | 128 | 25 | 512 | 80 | 512 | 80 | 256 | 320  | 512 | 130   | 256 | 80   | 512 | 320  | 256 |
|                     | 4         |                      | <1   | 64  | 4  | 256 | 13 | 512 | 8  | 256 | 6  | 128 | **3  | 128 | 10000 | 128 | 1000 | 256 | 1600 | 64  |
|                     | 5         | 10/IM                | <1   | 64  | 2  | 256 | 25 | 512 | 25 | 512 | 25 | 256 | 13   | 256 | 20    | 512 | 20   | 512 | 20   | 256 |
|                     | 6         | —                    | 2  | 128 | <1 | 128 | <1 | 256 | <1 | 256 | <1 | 128 | <1   | 64  | <1    | 32  | <1   | 64  | <1   | 64  |
|                     | 7         | —                    | <1   | 64  | <1 | 64  | <1 | 128 | <1 | 64  | <1 | 32  | <1   | 32  | <1    | 32  | <1   | 64  | <1   | 8   |

\* first injection.

\*\* booster injection.

IM: intramuscular injection.

HI: hemagglutination-inhibition antibody titer.

NT: serum neutralizing antibody titer.

나타냈으나 virus力價는  $10^{8.1}$ TCID<sub>50</sub>/ml를 維持하고 있었으며 HA價는 5日後에도 256倍/0.4ml를 나타냈으나 virus力價는  $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml로 약간 下降하였다. 細胞와 함께 採毒한 후 凍結融解하여 抽出한 virus의 力價는  $10^{7.7}$ TCID<sub>50</sub>/ml로 液相 virus의 力價보다 약간 높았다.

**試驗백신의 免疫原性:** 試驗백신 bulk의 不活化前 virus力價는  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml였으며 이 bulk로 製造한 試驗백신을 3個月齡 抗體陰性豚에 接種하고 週別로 採血하여 血中中和抗體 및 HI抗體價를 測定하여 돼지에 대한 免疫原性を 調査하였다. 1週後에 백신 接種豚은 中和抗體價 2~4倍(HI抗體價 128~256倍)로 上昇하였다. 4週後에는 中和抗體價 6~80倍(HI抗體價 128~256倍)를 維持하고 있었다. 5週後에 中和抗體價 10, 8 및 3倍를 維持하고 있던 1, 2 및 4號豚에 試驗백신을 booster接種하였던 바 1週後에 中和抗體價가 各各 320, 5,000 및 10,000倍로 急上昇하여 booster效果가 優秀하였으나 HI抗體價는 64~128倍를 維持하고 있었다.

試驗백신을 中和抗體陰性(HI抗體價 (8~32倍)의 체중 350g인 guinea-pig에 接種하였던 바 4週後의 中和抗體價는 100~32,000倍(HI抗體價 256~1,024倍)로 上昇하였다. 非接種 對照 guinea-pig의 中和抗體價는 陰性이었으나 HI抗體價는 32배의 높은 非特異反應을 나타냈다.

**試驗백신의 自然感染耐過豚에 대한 免疫原性:** 自然感染耐過豚으로 認定되는 中和抗體價  $10^{1.5}$ ~ $10^{3.5}$ 倍(HI抗體價 128~256倍)를 保有한 3個月齡 仔豚에 試驗백신을 接種하였던 바 1週後의 中和抗體價는  $10^{5.5}$ ~ $10^{6.0}$ 倍(HI抗體價 128~1,024倍)로 急上昇하였다. 4週後에도 中和抗體價  $10^{4.7}$ ~ $10^{6.5}$ 倍(HI抗體價 128~256倍)를

**Table 3.** Immune response of guinea-pig inoculated with trial porcine parvovirus inactivated vaccine

| Guinea-pig No | Inoculum (ml) /route | Serum antibody titer |    |                           |       |
|---------------|----------------------|----------------------|----|---------------------------|-------|
|               |                      | Pre-vaccination      |    | 4 weeks after vaccination |       |
|               |                      | NT                   | HI | NT                        | HI    |
| 1             |                      | <1                   | 32 | 320                       | 1,024 |
| 2             |                      | <1                   | <8 | 3,200                     | 512   |
| 3             | 2/SC                 | <1                   | 32 | 16,000                    | 256   |
| 4             |                      | <1                   | 16 | 3,200                     | 256   |
| 5             |                      | <1                   | <8 | 32,000                    | 1,024 |
| 6             |                      | <1                   | 32 | 100                       | 256   |
| 7             | —                    | <1                   | 16 | <1                        | 32    |
| 8             | —                    | <1                   | 32 | <1                        | 32    |

SC : subcutaneous injection.

維持하고 있어 試驗백신은 自然感染耐過豚에 대한 免疫原성이 매우 優秀하였다.

**野외母豚의 PPV에 대한 中和 및 HI抗體價의 比較測定:** 6個 養豚場의 母豚 22頭의 PPV에 대한 中和抗體價 및 HI抗體價를 比較調査하였던 바 10~16號 母豚의 中和抗體價는 陰性이었으나, HI抗體價는 32~8,192倍의 非特異抗體를 보여 주었다. 1~9號 및 17~22號 母豚은 中和抗體價 5~5,000倍(HI抗體價 32~8,192倍)를 나타내고 있으며, 이 母豚들은 모두 PPV백신의 接

**Table 4.** Immune response of naturally infected field piglet inoculated with trial porcine parvovirus inactivated vaccine

| Piglet No | Inoculum (ml) | Serum antibody titer (week after vaccination) |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |     |     |     |     |
|-----------|---------------|---|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
|           |               | Pre-vac                                       |     | 1   |      | 2   |     | 3   |     | 4   |     | 5   |     | 6   |    | 7   |     | 8   |     |
|           |               | NT  | HI  | NT  | HI   | NT  | HI  | NT  | HI  | NT  | HI  | NT  | HI  | NT  | HI | NT  | HI  | NT  | HI  |
| 1         |               | *1.9  | 128 | 5.5 | 256  | 5.5 | 256 | 6.2 | 128 | 5.2 | 128 | 4.0 | 256 | 4.2 | 64 | 3.7 | 128 | 4.7 | 128 |
| 2         | 2             | 2.5   | 128 | 5.5 | 256  | 5.5 | 256 | 6.2 | 128 | 4.7 | 128 | 5.5 | 256 | 5.0 | 64 | 4.5 | 128 | 5.5 | 64  |
| 3         |               | 3.5   | 256 | 5.5 | 256  | 5.5 | 512 | 6.5 | 128 | 6.5 | 128 | 5.2 | 256 | 6.5 | 64 | 4.5 | 128 | 5.5 | 256 |
| 4         | 10            | 1.5   | 128 | 6.0 | 1024 | 7.0 | 512 | 6.0 | 256 | 5.5 | 256 | 4.2 | 256 | 5.2 | 8  | 4.5 | 256 | 6.5 | 512 |

\* : log of the highest dilution to neutralize 100 TCID<sub>50</sub>/0.1ml.

HI : hemagglutination-inhibition antibody titer.

NT : serum neutralizing antibody titer.

**Table 5.** Comparison of hemagglutination-inhibiting and serum neutralizing antibody titers of unvaccinated sow to porcine parvovirus

| Piggery  | Sow No | Parturition (time) | Serum antibody titer |       | Remark |
|----------|--------|--------------------|----------------------|-------|--------|
|          |        |                    | NT                   | HI    |        |
| S. A.    | 1      | 2                  | 320                  | 256   |        |
|          | 2      | 3                  | 5                    | 64    |        |
|          | 3      | 5                  | 320                  | 128   |        |
|          | 4      | 6                  | 160                  | 1,024 |        |
| G. P.    | 5      | 1                  | 1,600                | 128   |        |
|          | 6      | 1                  | 1,000                | 256   |        |
|          | 7      | 2                  | 3,200                | 64    |        |
|          | 8      | 3                  | 3,200                | 128   |        |
|          | 9      | 4                  | 500                  | 256   |        |
| S. L.    | 10     | 1                  | <1                   | 1,024 |        |
|          | 11     | 2                  | <1                   | 32    |        |
|          | 12     | 3                  | <1                   | 256   |        |
|          | 13     | 4                  | <1                   | 256   |        |
| M. Y.    | 14     | ?                  | <1                   | 8,192 |        |
|          | 15     | ?                  | <1                   | 1,024 |        |
| W. M. E. | 16     | ?                  | <1                   | 64    |        |
|          | 17     | 1                  | 5                    | 4,096 |        |
|          | 18     | 2                  | 5,000                | 8,192 |        |
| D. G.    | 19     | 1                  | 100                  | 1,024 |        |
|          | 20     | 5                  | 320                  | 128   |        |
|          | 21     | 5                  | 160                  | 64    |        |
|          | 22     | 3                  | 320                  | 32    |        |

HI : hemagglutination-inhibiting antibody titer.  
NT : serum neutralizing antibody titer.

種을 받은 經歷이 없기 때문에 自然感染되어 產生된 抗體價로 생각되었다.

### 考 察

著者 등이 改良한 SK細胞를 利用하여 PPV를 測定하는 方法은 感染細胞가 나타내는 CPE出現 與否를 觀察하기 爲하여 일일히 試驗管을 鏡檢하여야 하는 方法보다 신속하게 判讀할 수 있었다. 細胞의 維持狀態가 좋지 못하여 CPE의 觀察로 判讀이 어려운 境遇에도 이 方法을 利用하여 容易하게 PPV의 力價를 正確하게 判讀할 수 있었다. 이 方法을 應用하여 中和試驗法을

改良하였으며, 改良한 中和試驗法으로 PPV에 대한 中和抗體價를 測定할 수 있었다.

Joo et al<sup>11</sup>은 PPV가 STL細胞에서 잘 增殖하다는 報告를 하였으며 virus의 力價는 HA test를 實施하여 推定하였다. Paul과 Mengeling<sup>8</sup>은 螢光抗體(FA)法으로 PPV의 力價를 測定하였으며 이때 HA test로도 比較測定하였던 바 FA法에 依한 細胞感染價는 10<sup>6.0</sup>CCID<sub>50</sub>/ml였으나, HA價는 64/0.4ml였다.

著者 등은 STL細胞에 PPV를 接種하고 著者 등이 發展시킨 方法으로 virus力價를 測定하고 同時に HA價를 比較測定하여 PPV의 增殖을 調査하였던 바 virus力價는 10<sup>3.7</sup>TCID<sub>50</sub>/ml로서 比較的 높았으나 HA價는 2倍以下였다는 것을 감안할 때 HA價만을 가지고 PPV의 力價를 推定하기는 어렵다는 것을 알 수 있었다. STL細胞에서 增殖시킨 PPV로 製造한 試驗백신을 接種한 돼지의 2週後의 中和抗體價는 13~32倍로 上昇하였고, HI價는 256~512倍로 上昇하였다. 이 HI價는 Joo et al<sup>11</sup>이 報告한 PPV 不活化백신을 接種받은 돼지의 2週後의 HI價 112倍보다 약간 높은 편이었다. 試驗백신 接種 5週後의 中和抗體價 3~10倍(HI抗體價 128倍)를 保有하고 있던 3頭의 돼지에 試驗백신을 booster 接種하였던 바 中和抗體價는 320~10,000倍로 急上昇한데 反해 HI價는 약간 下降하였거나 變動이 없었다. 以上の 結果로 보아 HI抗體價만을 測定하여서는 PPV 不活化백신의 돼지에 대한 免疫原性的 경향치는 알 수 있다고 생각되나 正確한 免疫狀態를 파악하려면 中和抗體價를 測定하여야 한다는 것을 알 수 있었다.

한편 試驗백신의 guinea-pig에 대한 免疫原성은 백신 接種前에 中和抗體價는 陰性인데 反해 HI價는 <8~32倍의 非特異抗體를 保有하고 있었다. 4週後 中和抗體價 100~32,000倍(HI種 256~1,024倍)로 急上昇하여 이는 試驗백신 接種에 의해 나타난 抗體反應임을 알 수 있었다. 그러나 中和抗體價 100倍인 guinea-pig의 HI價가 256倍인가 하면, 中和抗體價 16,000倍인 guinea-pig의 HI價도 256倍로 中和抗體價와 HI價는 一致하지 않음을 알 수 있었다.

또한 中和抗體價 10<sup>1.5</sup>~10<sup>3.5</sup>倍(HI價 128~256倍)를 保有하고 있던 野外感染耐過豚에 試驗백신을 接種하였던 바 1週後 中和抗體價는 10<sup>5.5</sup>~10<sup>6.0</sup>倍로 急上昇하였으나 HI價는 256~1,024倍로 약간 上昇하였을 뿐이었다. 여기에서도 中和抗體價와 HI價와는 큰 차이를 나타냄을 알 수 있었다.

1~6產 經歷이 있는 野外可檢豚血清의 PPV에 대한 中和抗體價와 HI價를 比較測定한 結果, 中和抗體價 陰性인 돼지의 HI價는 32~8,192倍를 나타내었다. 또한

野外可檢血清에 있어서는 中和抗體價와 HI價와의 차이는 더욱 크다는 것을 알 수 있었다.

돼지 血清中에는 非特異自家凝集素를 含有하고 있는 것이 있기 때문에 Joo et al<sup>9</sup>은 中和試驗終了日 判讀하기 前에 미리 調査하여 非特異自家凝集素를 包含하고 있을 때는 舊 medium을 除去하고 alkaline glycine buffer를 加하여 hemagglutinin을 抽出한 후 guinea-pig RBC液를 加한 다음 判讀하였다. 이러한 缺點을 排除한 것이 著者 등이 發展改良한 中和試驗法이며 이 方法으로 PPV의 特異中和抗體價를 容易하고 신속하게 測定할 수 있음을 報告하는 바이다.

### 結 論

SK細胞의 浮遊液을 試驗管에 分注와 同時에 PPV를 接種하고 一定期間 培養한 후 GSA가 含有된 medium으로 交換하고 다시 一定期間 培養한 다음 guinea-pig의 RBC液를 加함으로써 感染細胞에서 觀察되는 HA反應을 利用하여 STL細胞에서의 PPV의 增殖性を 調査하였고 이 現象을 利用한 中和試驗法으로 PPV不活化 백신의 試驗動物에 대한 免疫原性を 調査하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. PPV는 STL細胞에서  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml(HA價 16/0.4ml)의 力價를 나타내면서 잘 增殖하였으며 HA價는 最高 256/0.4ml까지 上昇하였다.

2. 不活化前  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 virus力價를 含有한 bulk로 製造된 試驗백신을 接種한 돼지들은 1週後에 中和抗體價 2~4배(HI價 64~256배)로 上昇하였고, 4週後에도 中和抗體價 6~80배(HI價 128~256배)를 維持하고 있었다.

3. 試驗백신 接種 5週後에 中和抗體價 3~10배(HI價 128배)를 維持하고 있던 試驗豚에 booster接種을 한 結果 一週後 中和抗體價는 320~10,000배로 急上昇하여 試驗 백신의 booster效果는 良好하였으나 HI價는 64~128배를 나타냈다.

4. 中和抗體價陰性(HI價 <8~32배)인 guinea-pig에 試驗백신을 接種한 結果, 4週後 中和抗體價 100~32,000배(HI價 256~1,024배)로 上昇하였다.

5. 中和抗體價  $10^{1.5}$ ~ $10^{3.5}$ 배(HI價 128~256배)를 保有한 自然感染耐過豚에 試驗백신을 接種하였던 바 中和抗體價는  $10^{5.5}$ 배로 急上昇하여 自然感染耐過豚에 대한 免疫原성이 優秀하였으나 HI價는 256배를 維持하고 있었다.

6. 野外에서 收集한 PPV백신을 接種받은 經歷이 없는 1~6産의 經産豚 22頭의 血清에 대하여 中和抗體價와 HI價를 比較調査한 結果, 7頭의 母豚은 中和抗體價

陰性이었으나 HI價는 32~8,192배를 나타냈다.

### 參 考 文 獻

1. Cartwright SF, Huck RA. Virus isolation in association with herd infertility, abortion and stillbirths in pigs. *Vet Rec* 1967; 81:196~197.
2. Bachmann PA, Sheffy, Vaughan JT. Experimental *In utero* infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. *Infect Immun* 1975; 12:455~460.
3. Cropper M, Dunne HW, Leman AD, et al. Prevalence of antibodies to porcine enteroviruses and porcine parvovirus in body fluids of fetal pigs from small vs large litters. *J Am Vet Med Ass* 1976; 168:233~235.
4. Joo HS, Donaldson-Wood CR, Johnson RH. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. *Arch Virol* 1976; 51:123~129.
5. Mengeling WL. Prevalence of porcine parvovirus induced reproduct failure; an abattoir study. *J Am Vet Med Ass* 1984; 172:1291~1294.
6. Huygelen C, Peetermans J. Isolation of a hemagglutinating picornavirus from a primary swine kidney cell culture. *Arch Ges Virusforsch* 1976; 20:260.
7. Joo HS, Donaldson-Wood CR, Johnson RH. A Standardised hemagglutination-inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Aust Vet J* 1976; 52:422~424.
8. Paul PS, Mengeling WL. Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *Am J Vet Res* 1980; 41:2007~2010.
9. Joo HS, Donaldson-Wood CR, Johnson RH. A microneutralization test for the assay of porcine parvovirus antibody. *Arch Virol* 1975; 47:337~341.
10. Joo HS. An inactivated vaccine for porcine parvovirus infection in pigs. *The Research Reports of the Office of Rural Development* 1980; 22:114~117.
11. Joo HS, Molitor TW, Leman AD. Antibody responses of guinea-pigs, rabbits and pigs to inactivated porcine parvovirus vaccines. *Vet Micro* 1934; 9:27~33.