

821032-03

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
기술사업화지원사업 2023년도 최종보고서

써코 복합백신의 사업화를
마이코플라즈마

PRRSV의
위한 제품화

단일 개발

최종
보고서

2024

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

발간등록번호

11-1543000-004742-01

써코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발

2024.07.29

주관연구기관 / 우진비앤지(주)
공동연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “씨코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발”(개발기간 : 2021. 04. 01 ~ 2023. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024.07.25.

주관연구기관명 : 우진비앤지(주) (대표자) 강 석 진 (인)
공동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단장 (대표자) 김 재 영 (인)



주관연구책임자 : 김 정 한 (인)
공동연구책임자 : 채 찬 희 (인)



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급			
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		기술사업화지원			
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		[공공기술 사업화 촉진]			
공고번호		제 농축2021-41호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-			
					연구개발과제번호		821032-03			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB. 농림수산식품	20%	LB07. 수의과학	30%	LB0710. 동물 질병예방	50%			
	농림식품과학기술분류	RB. 수의	20%	RB02. 수의예방	30%	RB0201. 동물질병관리	50%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문								
		영문								
연구개발과제명		국문		써코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발						
		영문		Development of PCV2, Mycoplasma, PRRSV single and mixed vaccine for commercialization						
주관연구개발기관		기관명			사업자등록번호		124-81-14283			
		주소			법인등록번호					
		성명		김 정 한		직위				
연구책임자		연락처		직장전화		휴대전화				
				전자우편		국가연구자번호				
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)						
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31 (1년 9개월)				
				2단계		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년 개월)				
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()		합계		연구개발 비외 지원금
		현금		현금		현금		현금		현금
		현물		현물		현물		현물		현물
총계		825,000		6,000		164,000		-		-
		-		-		-		-		-
1단계		225,000		-		50,000		-		-
		-		-		-		-		-
2단계		300,000		-		60,000		-		-
		-		-		-		-		-
1년차		300,000		6,000		54,000		-		-
		-		-		-		-		-
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대 전화		전자우편
		비고		역할		기관유형				
공동연구개발기관		서울대학교 산학협력단		채찬희						공동
연구개발과제 실무담당자		성명		서 병 주		직위				
		연락처		직장전화		휴대전화				
				전자우편		국가연구자번호				

이 연차보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 02 월 26 일

연구책임자: 우진비엔지(주) 김 정 한

주관연구개발기관의 장: 우진비엔지(주) 대표이사 강 석 진

공동연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 김 재 영

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	기술사업화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
내역사업명 (해당 시 작성)	공공기술 사업화 촉진(축산)			연구개발과제번호		821032-03	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB. 농림수산식품	20%	LB07. 수의과학	30%	LB0710. 동물 질병예방	50%
	농림식품 과학기술분류	RB. 수의	20%	RB02. 수의예방	30%	RB0201. 동물질병관리	50%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제명	써코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발						
전체 연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)						
총 연구개발비	총 995,000 천원 (정부지원연구개발비: 825,000 천원, 기관부담연구개발비 : 170,000 천원, 지방자치 단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 작성)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	써코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발					
	전체 내용	<p>○ 돼지호흡기복합질병(porcine respiratory disease complex, PRDC)는 돼지 산업에 지속적으로 중요한 경제적 문제를 야기 함. 특히 돼지써코바이러스 2형(Porcine circovirus, PCV2), 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아(<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>, MH)는 PRDC를 일으키는 가장 중요한 병원균으로 간주되고 있음.</p> <p>- 국내와 동남아시아(태국과 베트남)를 포함한 미국과 유럽 등 전 세계적으로 현재 가장 흔한 돼지 써코바이러스(PCV2)의 유전형은 “2d”형. 따라서 써코바이러스 백신을 개발하려면 PCV2d형을 이용한 백신 개발이 시급한 실정.</p> <p>- 현재 판매되는 써코-마이코플라즈마 복합백신에 함유되어 있는 PCV2의 유전형은 대부분 “2a”형 또는 “2b”형. 그러나 국내와 동남아시아(태국과 베트남)를 포함한 미국과 유럽 등 전 세계적으로 현재 가장 많이 발견되고 있는 돼지써코바이러스(PCV2)의 유전형은 “2d”형. 현재 국내 및 전 세계적으로 유행하는 PCV2 유전형이 “2d” 형인데도 불구하고 최근 시판되고 있는 써코-마이코플라즈마 복합백신의 PCV2 항원이 주로 “2a”형이나 “2b”형이기 때문에 필드의 농장에서 써코바이러스의 감염을 어느 정도 제어(control)할 수 있다고 해도 근본적인 예방책으로는 충분하지 못한 단점이 있음.</p> <p>- PCV2 백신의 경우 백신에 함유된 유전형과 동일한 유전형</p>					

		<p>에 대한 방어 능력이 가장 뛰어난 동족 예방 효과가 실험적으로 확인되었음. 현재 <u>국내 및 전 세계적으로 가장 많이 분포되어 있는 PCV2d 유전형</u>을 예방하기 위한 가장 효과적인 백신은 PCV2d를 함유한 <u>써코바이러스 백신</u>임.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유럽형과 북미형 PRRSV의 가장 큰 차이점은 면역학적으로 교차반응(cross reaction)을 하지 않는다는 점. 유럽형 PRRSV에 감염이 되어서 돼지 체내에서 형성된 항체의 경우 북미형 PRRSV와 반응을 하지 않음. 또한 북미형 PRRSV의 감염에 의해 돼지 체내에서 형성된 항체의 경우 유럽형 PRRSV와 반응을 하지 않기 때문에 북미형 PRRSV의 감염을 예방하기 위해서는 북미형 PRRSV를 이용하여 제작한 백신이 필요하고, 유럽형 PRRSV의 감염을 예방하기 위해서는 유럽형 PRRSV를 이용하여 제작한 백신이 필요함. - 최근 국내에서 한국형 PRRSV로 인한 감염이 문제가 되고 있음. 한국형의 경우 북미형 보다는 유럽형에 가까우나, <u>유럽형 PRRSV에 사용되는 백신이 한국형에는 교차반응이 쉽게 발생하지 않아 국내에는 적합한 백신이 전무한 실정.</u> 이에 <u>국내에서 발생하는 신규한 한국형 PRRSV를 동정하고, 이를 약독화 또는 사독화시켜 제조된 한국형 PRRSV 예방 백신이 절실히 필요한 상황임.</u>
1단계 (해당 시 작성)	<p>목표</p>	<p>국내 양돈장에서 유행하고 있는 돼지호흡기질병의 주요 병원체인 써코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 단일 및 복합 백신의 배양공정개발 및 야외임상시험 진행.</p>
	<p>내용</p>	<p>○ 1차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ [우진비앤지(주)] PRDC 관련 병원체에 대한 대량배양 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type) ■ [서울대] 백신 안전성 및 효능시험 <ul style="list-style-type: none"> - 써코-마이코 복합 백신 실험실 내 효능(공격접종) 시험 - PRRS 생독 백신 안전성 시험 - PRRS 사독 백신 야외임상시험(전반부; 3주령~16주령) <p>○ 2차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ [우진비앤지(주)] PRDC 관련 병원체에 대한 대량배양 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 마이코플라즈마의 대량배양 시스템 개발 ■ [서울대] 백신 안전성 및 효능시험 <ul style="list-style-type: none"> - PRRS 사독 백신 야외임상시험(후반부; 16주령~25주령) - 써코·마이코 복합백신 야외 임상 시험 (전반부: 3주령~16주령 & 후반부: 16주령~25주령)
2단계 (해당 시 작성)	<p>목표</p>	<p>돼지호흡기질병의 주요 병원체인 써코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 복합 백신의 야외임상시험 완료 및 제품화 개발</p>

		내용	<p>○ 3차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ [우진비앤지(주)] 백신 품목허가 및 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - PRRS-NA 허가자료 승인 - PRRS-M 및 DMVac 품목허가에 대한 기술검토의견 보완 - PRRSV (NA type) 생독 백신의 국가검정법 개정 - 시제품(백신 표준품) 생산공정 개발 - 백신 제품홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립 ■ [서울대] 백신 안전성 및 효능 시험 <ul style="list-style-type: none"> - PRRS 생독 백신 야외임상시험 실시 (전반부: 3주령-16주령 & 후반부: 16주령-25주령) - 야외임상시험보고서 작성(허가자료 6번 내용)
--	--	----	---

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> . 기술실시: 2건/ 시제품제작: 3건/ 고용창출: 2명 . 표준화(동물의약품 국가출하승인검정 기준 개정): 1건 . 논문(SCI): 6편/ 학술발표: 3건 . 인력양성: 2명(박사) . 특허출원: 1건/ 특허기탁: 1건 . 홍보실적: 5건
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>○ 연구개발성과의 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 국내 양돈장에서 유행하고 있는 돼지호흡기질병의 주요 병원체인 썬코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 단일 및 복합 백신의 제품화를 통한 돼지호흡기질병의 예방 및 근절. ✓ 돼지호흡기질병에 대한 다국적 기업 백신의 국내 점유율이 90%를 넘고 있는 현실에서 최근 국내분리주로 제조된 백신 제품으로 국내 백신의 시장점유율을 높일 것임. ✓ 동일 질병의 원인체에 대해 약독화된 생백신과 사독백신을 제품화하여 상호 보완해서 사용할 수 있는 백신 프로그램의 개발. ✓ 국내 분리주인 백신주를 이용하여 최근 발병하고 있는 돼지호흡기질병을 진단할 수 있는 진단키트(ELISA kit) 개발에 활용할 계획. ✓ 최근 유행하고 있는 국내분리주로 제작된 사독백신 제품이 없는 실정에서 북미형과 유럽형이 모두 포함된 국내분리주로 제작된 제품의 개발을 통해 국내 내수용 및 수출용으로 판매할 계획. <p>○ 기대효과 : 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 백신주 및 대량배양조건 확립을 통해 구축될 대량생산시스템은 질병원인체에 대한 백신의 산업화를 위해 최적화된 대량배양 원천기술을 제공할 것임. ✓ 국내분리주로부터 백신주를 구축하여 백신 제품화까지의 기술개발을 통한 백신의 산업화를 촉진함. ✓ 백신주를 이용한 질병 원인체 진단용 키트 개발(항원 및 항체 진단용 ELISA kit) 및 이를 활용한 분석법 개발 기술의 확보. ✓ 생독백신과 사독백신이 적용된 백신 시스템을 확립하여 농가에 보급할 계획으로 두 제품 간의 시너지 효과를 낼 수 있을 것임.
---------------------	--

	<p>○ 기대효과 : 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ 국내분리주로부터 백신주를 구축하여 백신 제품화까지의 기술개발을 통해 국내백신산업의 활성화를 유도함. ✓ 백신제조기술 분야의 첨단기술 전문가를 배출할 수 있는 기회를 제공함. ✓ 돼지호흡기질병으로 인한 양돈 농가의 피해를 감소할 수 있으며 양돈 농가의 소득증대를 통해 지역경제를 활성화 할 수 있음. ✓ 돼지호흡기예방 백신의 제품화 및 상용화를 통해 다국적 기업이 차지하고 있는 국내백신시장의 시장점유율을 낮출 수 있을 것이며, 수출을 통해 축산산업의 성장에 기여할 수 있음. ✓ 국내 양돈 농가로부터 국내백신의 품질에 대한 신뢰도를 높일 수 있는 계기가 될 것임. 											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	5	1						생명 정보	생물 자원		정보	실물
국문핵심어 (5개 이내)	돼지호흡기 복합질병		썬코바이러스		돼지 생식기 호흡기 증후군		약독화 생백신		불활화 백신			
영문핵심어 (5개 이내)	porcine respiratory disease complex (PRDC)		Porcine circovirus (PCV2d)		Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRS)		Live attenuated vaccine		Inactivated vaccine			

1. 연구개발과제의 개요

- [우진비앤지(주)] PRDC 관련 병원체에 대한 대량배양 시스템 개발, 품목허가 및 제품화
 - 가. PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type)에 대한 대량배양공정 개발
 - 나. 마이코플라즈마(*Mycoplasma hyopneumoniae*)에 대한 대량배양공정 개발
 - 다. DMVac (PCV2d와 마이코플라즈마 복합백신), PRRS-NA (NA type) 및 PRRS-M (NA 및 EU type)에 대한 시험백신 제조
 - 라. DMVac, PRRS-NA 및 PRRS-M의 야외임상시험 완료
 - 마. PRRS-NA 품목허가 승인 및 DMVac, PRRS-M의 품목허가 보완
 - 바. PRRS-NA의 국가검정시험법 개정
 - 사. 백신 제품 홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립

- [서울대] 백신 안전성 및 효능 평가
 - 가. DMVac (PCV2d와 마이코플라즈마 복합백신) 실험실 내 효능(공격 접종) 시험
 - 나. PRRS-NA 생독백신 안전성 시험
 - 다. PRRS-M 사독백신 야외임상시험 결과(전반부: 3주령~16주령 & 후반부: 16주령~25주령)
 - 라. 써코-마이코 복합백신 야외임상시험 결과(전반부: 3주령~16주령 & 후반부: 16주령~25주령)
 - 마. PRRS 생독백신 야외임상시험 결과(전반부: 3주령~16주령 & 후반부: 16주령~25주령)
 - 사. PRRS-NA, PRRS-M 및 DMVac 야외임상시험보고서 작성(허가자료 6번 내용)

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

[우진비앤지(주)] PRDC 관련 병원체에 대한 대량배양 시스템 개발

가. PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type)에 대한 대량배양공정 개발

1. 써코(PCV2d) 및 마이코플라즈마(MH) 백신주 확보 및 배양공정개발

[제품명: 이뮤니스 디엠백(IMMUNIS® DMVac, 돼지써코바이러스 2형 및 마이코플라즈마성 폐렴 불활화복합백신)]

- PCV2d는 2019년 1월에 경기도 농장에서 의뢰된 10주령 이유자돈에서 분리된 바이러스이다. 이농장의 이유 자돈 중에서 위축이 심한 자돈을 의뢰하였는데, 림프절에서 전형적인 이유 후 전신성 소모성 증후군(PMWS; postweaning multisystemic wasting syndrome)과 관련된 육아종성 염증이 관찰되었으며 PCV2d (SNUVR201901 strain)로 확인되었다. 이뮤니스 써코디 백신주인 PCV2d (strain SNUVR201901)는 PCV2a 한국 분리 바이러스(KF871067)와 95%, 미국 분리 바이러스(AJ223185)와 95.1%, 유럽 분리 바이러스(AJ293868)와 95.1%, 중국 분리 바이러스(FJ870968)와 95.1% 상동성을 가졌다.

- 또한 PCV2d (strain SNUVR201901)는 PCV2b 한국 분리 바이러스(KF871068)와 96.2%, 미국 분리 바이러스(GU799576)와 96.3%, 유럽 분리 바이러스(AY484416)와 96.3%, 중국 분리 바이러스(KX831482)와 96.5%의 상동성을 가졌다. 마지막으로, 이뮤니스 써코디 백신주인 PCV2d (strain SNUVR201901)는 PCV2d 한국 분리 바이러스(KJ437506, KJ133547, KX828221)와 98.9~99%, 미국 분리 바이러스(JX535297, JX535296)와 99.2%, 유럽 분리 바이러스(AY484410)와 98%, 그리고 중국 분리 바이러스(HM038031, HM038030, HM038017)와 98.9~99.1%의 높은 상동성을 보였다(그림 1).

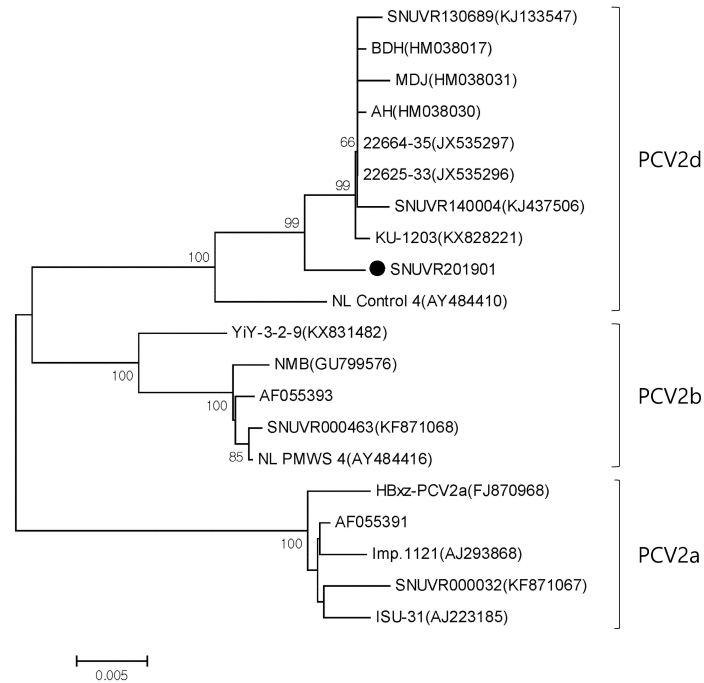


그림 1 . 이뮤니스 써코디 백신주인 PCV2d (strain SNUVR 201901)와 다른 대표적인 PCV2a, PCV2b, PCV2d 바이러스와의 ORF2 nucleotide sequence를 이용한 phylogenetic tree.

- 원종독(WGV-M-PCV2)은 서울대학교 채찬희 교수로부터 분양받은 PCV2 바이러스주를 PK-15가 80%의 세포 단층이 형성되도록 배양하여, MOI ((Multiplicity Of Infection) 0.1이 되게 희석한 후 감염시켰다. 감염 후, 4~5일간 바이러스를 배양 및 채독하여 확보하였고, 생산용 바이러스주는 PCV2 원종독(WGV-W-PCV2)를 원종독과 동일한 방법으로 배양 및 채독하여 바이러스를 확보하였다.

- 써코백신을 개발하는데 있어 가장 어려움 점은 써코바이러스가 세포에서 잘 배양이 되지 않는 점이다. 이로 인해서 대부분의 다국적 기업은 배큘로바이러스(baculovirus)를 이용한 발현 시스템을 사용하여 유전자 재조합 써코백신을 개발하여 판매하고 있다. 하지만 배큘로바이러스를 이용한 유전자 재조합 백신의 경우 생산 단가가 매우 높아 대규모 대량 생산이 아니면 경제성이 없다. 반면 본 연구에서 사용할 PCV2d 백신주의 경우, PK-15 cell에 최적으로 적응하여 세포주를 이용한 배양이 잘되고 있어 실험실에서의 세포배양이 가능하다(그림 2).

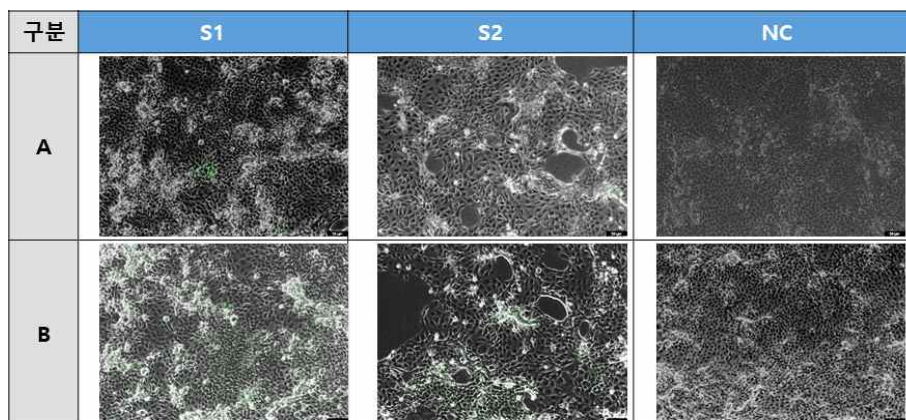


그림 2 . PCV2d (strain SNUVR 201901)의 바이러스 역가 분석(FAID₅₀). A; 세포주에 적응하지 못한 백신 주, B; 세포주에 적응된 백신주.

- 그러나 백신 생산을 위해서는 세포주에 최적화된 고효율 백신주가 필요하고, 이를 위해 백신주로 선정된 PCV2d 분리주를 이용하여 마스터 바이러스은행(MVB)을 확립하였으며, 또한 바이러스 역가를 높이기 위해 다양한 배양방법을 시도하였다.

Infection method 1

- **Media exchange (Control Method)**
- Infection 후 Glucosamine 처리.
- 배양 기간: 5~7일.
- Media exchange 시 total volume의 5% virus 배양액 첨가.
- Total volume: 15 mL.

Infection method 2

- **Subculture 후 Media exchange**
- Infection 후 Glucosamine 처리.
- 배양 기간: 5 ~ 7일.
- 배양 기간이 끝나면 상층액 harvest 후 1×10^5 cells/mL 를 subculture 진행.
- Total volume: 15 mL.

Infection method 3

- **Media exchange (With out Glucosamine)**
- Infection 후 배양.
- 배양 기간: 5 ~ 7일.
- Media exchange 시 total volume의 5% virus 배양액 첨가.
- Total volume: 15 mL.

Infection method 4

- **Direct infection (freezing thawing)**
- 세포 부유액에 virus 10% infection.
- 배양 기간: 5~7일.
- 배양 기간이 끝나면 freezing thawing을 통해 harvest.
- Total volume: 15 mL (3×10^6 cells).

- 세포주에 대한 감염방법 및 배지교환방법에 따라 4가지 배양방법으로 구분해서 진행하였다. 감염방법 중 glucosamine 첨가에 의한 바이러스 감작방법은 썬코바이러스 2형(PCV2)의 바이러스 역가를 상승시키는 것으로 알려져 있다(Journal of Virological Methods, 2013, 187; 368-371). 이를 이용한 방법을 대조군으로 두고, glucosamine 무처리군과 바이러스 감작 없이 직접적으로 감염시키는 배양법을 적용하여 배양하였다. Glucosamine 무처리(Infection method 3) 및 직접적인 바이러스 배양방법(Infection method 4)은 추후 백신 생산 시, 대량배양공정을 효율적으로 수행하기 위한 공정개발을 위해 적용하였다.

- 그 결과, 4가지 배양방법으로 진행된 PCV2d의 바이러스 역가는 대조군과 비슷한 양상을 나타내었으며, glucosamine 은 바이러스 배양에 직접적인 영향을 미치지 않았다. 또한 직접적인 바이러스 배양 방법(Infection method 4)으로 배양된 PCV2d의 바이러스 역가가 대조군에 비해 10배 이상 증가된 것을 Real-time PCR 분석을 통해 확인하였다(그림 3). 이를 통해 효율적인 배양공정을 확립할 수 있었으며, 추후 백신 생산 시, 제조비용 및 제조기간을 크게 단축시킬 것으로 사료된다.

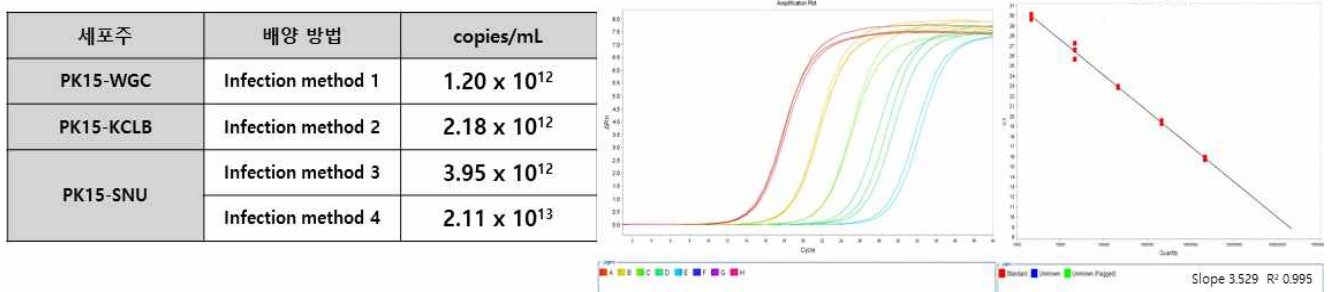


그림 3 . 세포주 및 배양방법에 따른 PCV2d 백신주의 바이러스 역가 분석(Real-time PCR).

- PCV2d의 바이러스 역가를 향상시키기 위해서는 세포주인 PK15가 중요한데, PCV1은 PCV2와 더불어 돼지에 널리 감염되어 있다. 이러한 이유로 돼지 신장세포에서 유래된 PK15 세포주 또한 PCV1에 감염되어있는 경우가 많다(Veterinary microbiology, 2007, 123; 203-209). 비록 PCV1이 비병원성이긴 하

나 PK15 세포주를 이용한 PCV2d의 역가상승에 영향을 줄 것으로 판단되어 PCV1이 제거된 PK15 세포를 확보하고자 하였다. 이를 위해 우선 PK15 세포주 중에서 PCV1에만 감염된 세포주를 아래와 같은 single cell cloning 방법으로 분리하였다(그림 4).

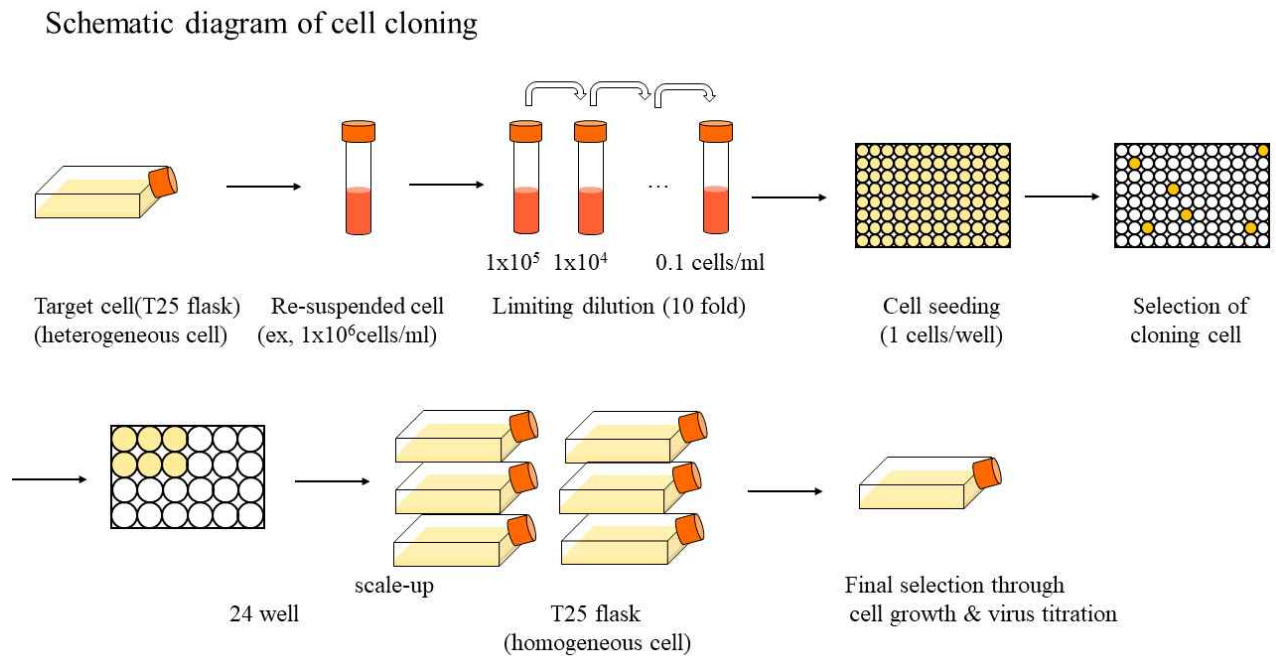


그림 4 . PK15 세포주로부터 PCV1에만 감염된 세포의 분리방법 모식도.

- 그 결과, PK15 세포주 중에서 PCV1 바이러스만을 가지고 있는 세포를 분리하였으며, 이 세포를 대량배양하여 PCV1 바이러스를 채독(harvest) 하였고, 채독된 PCV1을 dilution PCR 방법으로 역가를 분석하였다(그림 5). PCV1이 완전히 제거된 PK15 세포주를 확보하기 위해 확인된 PCV1 바이러스를 그림 6의 방법으로 농축하여 anti-PCV1 항체를 제작하였고, 이를 이용하여 PCV2d에 혼합되어있는 PCV1을 제거한 후 PCV2d 바이러스를 고역가로 배양할 수 있는 PK15 세포주를 확립하였다.

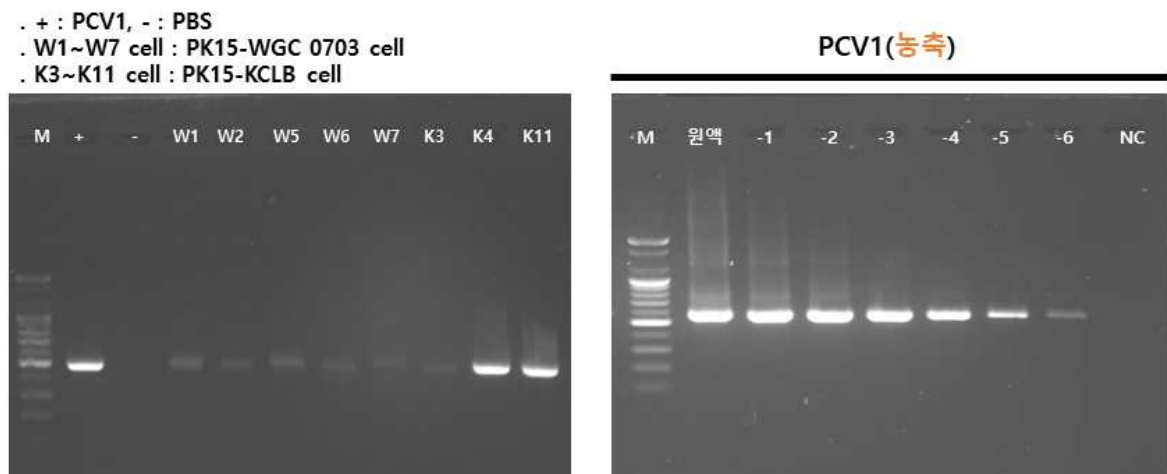


그림 5 . PK15 세포주로부터 분리된 PCV1 바이러스의 역가분석.



그림 6 . PK15 세포주로부터 분리된 PCV1 바이러스의 농축방법 모식도.

- 마이코플라즈마 균주는 서울대학교 수의과대학 병리학 교실에 진단을 위해 의뢰된 돼지 폐장 의 병변으로부터 분리된 마이코플라즈마 균주를 이용하였다. 분리된 마이코플라즈마 균주에 대하여 16s rDNA 분석 결과, GenBank Y00149.1 (ATCC 27719)과 가장 유사(99.4%)한 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)로 확인되었다(그림 7). 현재 Boehringer Ingelheim, MSD, Hipra 등 다양한 백신 회사가 사용 중인 J strain 하고는 명확한 차이가 나는 것으로 확인되었다. 또한 GenBank에 있는 주요한 *M. hyopneumoniae* 하고도 염기서열에서 차이가 있는 것으로 확인되었다(그림 8). 국내 돼지 폐장에서 분리된 마이코플라즈마 균주를 백신주로 사용하였다.

Mycoplasma hyopneumoniae strain ES-2 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP038641.1](#) Length: 956514 Number of Matches: 1

Range 1: 379 to 910 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
937 bits(507)	0.0	524/532(98%)	1/532(0%)	Plus/Plus
Query 6	AAGATAAAATATTGCAGC-TTAATATTAACAATGTTTAAACAAATTTACCTTTAGAAACT	64		
Sbjct 379	AAAATAAAATATTGCAGCTTTAATATTAACAATGTTTAAACAAATTTACCTTTAGAAACT	438		
Query 65	TTATAAAATCAAGTTATAATTTCCAAATTTTGTAGTATTTATGACGCAATAGTCGCAAAAT	124		
Sbjct 439	TTATAAAATCAAGTTATAATTTCCAAATTTTGTAGTATTTATGACGCAATAGTCGCAAAAT	498		
Query 125	CAAGACTAAATTACTCACC AATATTATTTTCAGGACCATCAGGAATGGAAAAACGCATT	184		
Sbjct 499	CAAGACTAAATTACTCACC AATTTTATTTTCAGGACCATCAGGAATGGAAAAACGCATT	558		
Query 185	TTATTAATGCGATCGGAAATTTACTTGTAGAAAAACAGAAGAAAGTTTCTACATTAACG	244		
Sbjct 559	TTATTAATGCGATCGGAAATTTACTTGTAGAAAAACAGAAGAAAGTTTCTACATTAACG	618		
Query 245	ACTATAAAATTTATCAGTTGCGTTTCTTCCTGGATGCAAAATGGTCAAAATGAAAAAATTA	304		
Sbjct 619	ACTATAAAATTTATCAGTTGCGTTTCTTCCTGGATGCAAAATGGTCAAAATGAAAAAATTA	678		
Query 305	GTGAATTTGTTAAACTGATGTCFCAAGTTGACGCTTCTCTATTGATGATATCCAAGTT	364		
Sbjct 679	GTGAATTTTAAACTGATGTCFCAAGTTGACGCTTCTCTTTTGGATGATATCCAAGTT	738		
Query 365	TGGCTAACAAACAACAACTTCAATTGTTGCACCTTGAAATTTTAAATAGATTTATCGAAG	424		
Sbjct 739	TGGCTAACAAACAACAACTTCAATTGTTGCACCTTGAAATTTTAAATAGATTTATCGAAG	798		
Query 425	AGGATAAAACAGTGATAATAACATCTGATAAATCGCCTTCTTTACTTGGTGGATTTGAAG	484		
Sbjct 799	AGGATAAAACAGTGATAATAACATCTGATAAATCGCCTTCTTTACTTGGTGGATTTGAAG	858		
Query 485	AAAGATTTATAACGCGATTTAGTTTCAGGGTTGCACATGAAATTAACACAGCC	536		
Sbjct 859	AAAGATTTATAACGCGATTTAGTTTCAGGGTTGCACATGAAATTAACACAGCC	910		

그림 7 . 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 균주의 염기서열 분석 결과(NCBI Blast)

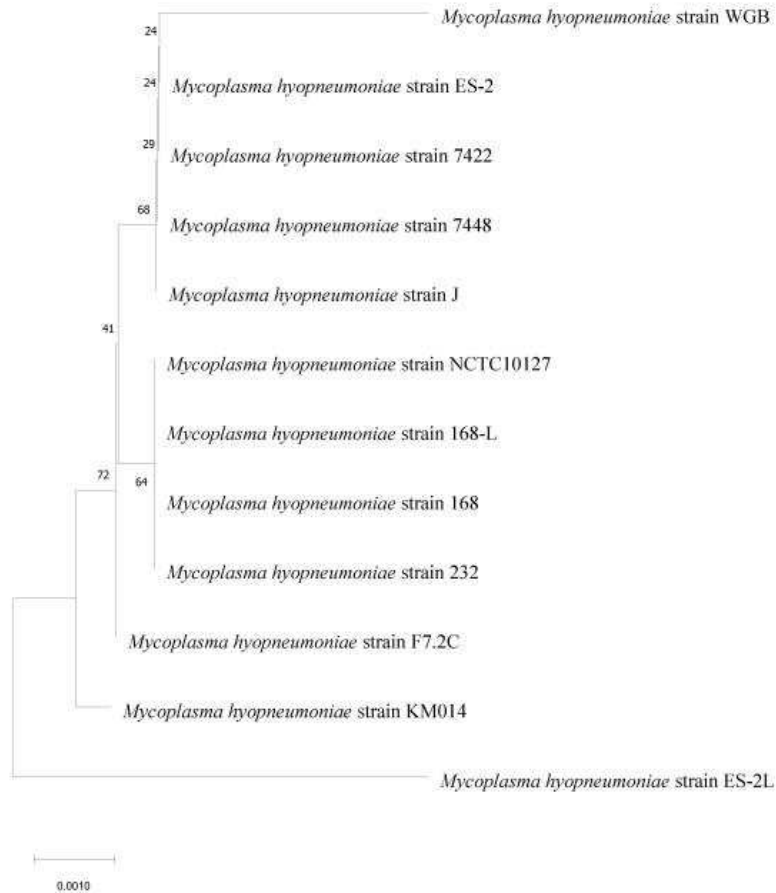


그림 8. 이뮤니스 디엠백 백신주인 *M. hyopneumoniae* (strain WGB-Mhp)와 다른 *M. hyopneumoniae*의 16s rRNA sequence를 이용한 phylogenetic tree.

- 원종독(WGB-M-Mhp)은 서울대학교 채찬희 교수로부터 분양받은 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 균주를 Mhp-medium 4.5 ml에 0.5 ml를 접종하고 37°C, 5% CO₂ 조건으로 2주간 배양하여 확보하였고, 생산용 균주(WGB-W-Mhp)는 원종독을 2주간 배양하면서 매일 배양액의 색변화를 관찰하면서 배양 시작 1주일째에 새로운 Mhp-medium 45.0 ml를 추가로 넣어 배양하였다. 배양 2주 후 새로운 Mhp-medium 50.0 ml를 다시 첨가하여 2주간 37°C, 5% CO₂ 조건으로 재배양하여 제조하였다. 마이코플라즈마의 대량배양을 위한 배양공정개발은 2차년도에 추가적으로 진행할 계획이다.

2. 북미형 및 유럽형 PRRS 바이러스에 대한 백신주 확보 및 배양공정개발

[제품명: 이뮤니스 피알알에스-엔에이(IMMUNIS[®] PRRS-NA, PRRS 북미형 생독백신)]

- 생독 PRRS 백신을 개발하기 위해 서울대에서 분리하여 특허를 취득한 백신주(특허 제 10-1281361호, 북미형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 예방 백신 조성물 및 이를 포함하는 혼합백신 조성물)를 우진비앤지(주)에서 기술이전 받아 개발하였다. 이 백신주는 안전성뿐만 아니라 일반적으로 세포배양이 잘되지 않는 다른 약독화된 백신주와 다르게 세포배양이 잘 되는 장점이 있다. 또한 국내에서 판매 중인 수입 유럽형과 북미형 PRRS 생독백신의 백신주와는 ORF5의 아미노산 배열에서 유전적 상관관계가 전혀 없는 백신주로 향후 백신 개발 후에 특허 분쟁 등을 원천적으로 차단하였다(그림 9).

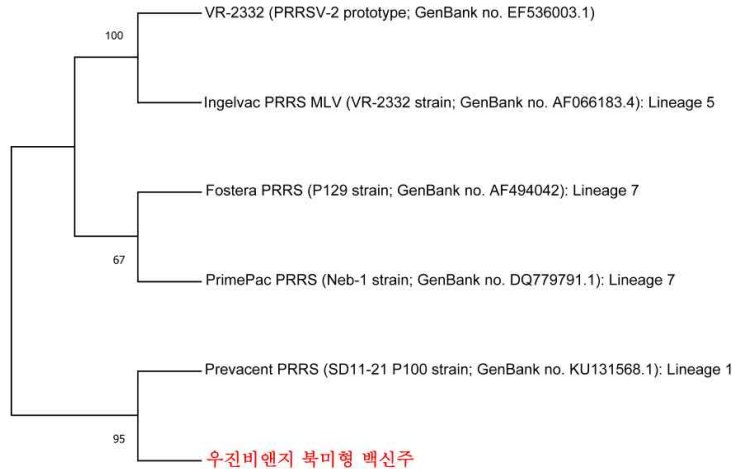


그림 9. 이뮤니스 PRRS-NA 백신주인 북미형 PRRSV (strain KNA090690)와 타회사 제품과의 ORF5 아미노산의 유전적 상관관계.

- 북미형 PRRS 바이러스에 대한 원종독(WGV-M-PRRSV-NA) 확보를 위해 서울대학교 채찬희 교수로부터 분양 받은 PRRS 바이러스주를 175T cell culture flask에 세포단층(monolayer)이 100% 형성된 MARC-145 세포에 MOI 0.01이 되게 감염시켰다. 바이러스 감염 5일 후 세포변성효과(CPE)를 관찰하면서 80%이상 세포변성효과가 일어났을 때 175T flask를 3회 냉/해동한 다음 채독하여 확보하였고, 생산용 바이러스주(WGV-W-PRRSV-NA)는 원종독(WGV-M-PRRSV-NA)과 동일한 방법으로 배양 및 채독하여 바이러스를 확보하였다.

[제품명: 이뮤니스 피알알에스-엠(IMMUNIS® PRRS-M, PRRS 유럽 및 북미형 혼합 사독백신)]

- 북미형과 유럽형 PRRS 혼합 사독백신의 백신주는 서울대학교에서 이미 2009년에 국내 양돈장에서 분리하여 특허를 취득한 백신주(특허 제 10-12450291호, 한국형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 예방 백신 조성물)를 우진비엔지(주)에서 기술이전 받아 개발하였다. 일반적으로 유럽형 PRRS 바이러스는 세포 배양이 잘되지 않기 때문에 돼지폐포 대식세포(PAM; porcine alveolar macrophage)를 이용하여 배양하지만, 이 유럽형 PRRS 바이러스 백신주의 경우 세포배양이 가능하기에 배양공정개발을 통해 백신으로 제조가 가능한 바이러스 역가를 확보하였다.

- 북미형 및 유럽형 PRRS 바이러스에 대한 원종독(WGV-M-PRRSV-NA 및 WGV-M-PRRSV-EU) 확보를 위해 서울대학교 채찬희 교수로부터 분양받은 PRRS 바이러스주를 175T cell culture flask에 세포단층(monolayer)이 100% 형성된 MARC-145 세포에 MOI 0.01이 되게 감염시켰다. 바이러스 감염 5일 후 CPE를 관찰하면서 80%이상 세포변성효과가 일어났을 때에 175T flask를 3회 냉/해동한 다음 채독하여 확보하였고, 생산용 바이러스주(WGV-W-PRRSV-NA 및 WGV-W-PRRSV-EU)는 원종독(WGV-M-PRRSV-NA 및 WGV-M-PRRSV-EU)과 동일한 방법으로 배양 및 채독하여 바이러스를 확보하였다.

- 세포주에 잘 적응할 수 있는 PRRS 바이러스 확보를 위해 다양한 배양조건 및 감염조건을 적용하여 바이러스를 세포주에 계대배양 하였다. 세포주는 원숭이 신장 유래 세포주인 MARC-145 와 MA104 세포를 사용하였고, 두 세포의 교차감염을 통해 바이러스 역가를 증가시켰다. 또한 세포와 바이러스 비율(MOI)을 조절하여 세포주에 대한 감염력이 높은 바이러스를 선별하였고, 이를 통해 바이러스 역가를 높였다. 아래의 실험결과는 두 세포주를 이용한 교차감염 및 MOI 비율 조절을 통해 확인된 PRRS 바이러스(북미형과 유럽형)의 역가이다(그림 10). 바이러스 감염 시, 낮은 MOI를 적용하여 일정한 수준의 바이러스 역가를 유지할 수 있다면, 추후 백신 생산 시 백신 생산효율을 크게 높일 수 있을 것이다. 이 바이러스 배양방법을 이용하여 북미형 PRRS 바이러스는 $10^{4.7}$ TCID₅₀ 에서 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 이상까지 바이러스 역가가 증가되었고, 유럽형 PRRS 바이러스의 경우에는 $10^{2.9}$ TCID₅₀ 에서 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상까지 바이러스 역가가 상승되었다(그림 11). 두 타입(NA 및 EU)의 바이러스 모두 검정기준인 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상임을 확인할 수 있었다.

구분		실험방법정리: 바이러스주 및 세포주별 감염방법																					
NA	Mono layer	Direct	MA_NA	MR_NA	NA_P4 (T175)	NA_5.7 (p3)	NA_5.0 (p5)	MOI 0.1 (p7)	MOI 0.01	MOI 0.001	MOI 0.0001	MA	MR	MA 0.1	MA 0.0001	MR 0.1	MR 0.0001	MR_QCV R_NA	MR_NA	MA_NA	MR_NA (p15)	MR_NA (p12)	
EU	Mono layer	Direct	MA_EU	MR_EU														MR_QCV R_EU	MR_EU	MA_EU	MR_EU (p2)	MA_EU (p2)	

그림 10. 북미형(NA) 및 유럽형(EU) PRRS 바이러스의 배양조건별 역가 분석 및 상승 양상.

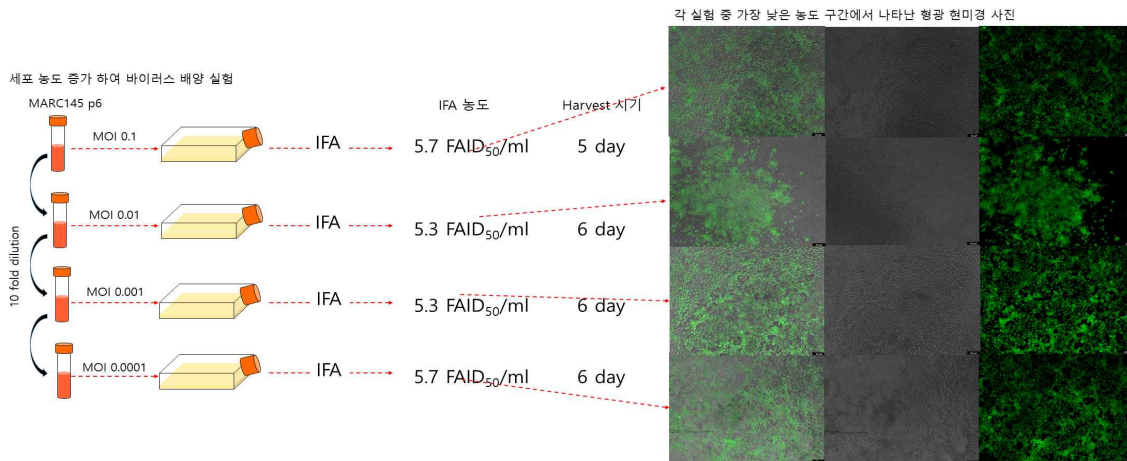


그림 11. PRRS 바이러스의 MOI 비율별 바이러스 역가 분석(FAID₅₀).

- 두 타입의 PRRS 바이러스 중 북미형인 PRRS-NA는 생독 백신으로 개발될 예정으로, 가장 중요한 부분은 안정성이다. 생독 백신의 안정성을 확보하기 위해 100계대 이상의 계대배양을 통해 바이러스의 병원성을 약독화하였고, 또한 여러 세포주를 교차 적용하여 바이러스의 역가를 상승시켰다. 우선, 돼지폐포대식세포주(Porcine Alveolar Macrophage, PAM)를 이용하여 10계대까지 증식시킨 후 MARK-145 및 MA104 세포를 사용하여 교차로 감염시켜 100계대 이상 계대배양을 진행하였다. 그 결과, 바이러스 역가가 $10^{4.2}$ TCID₅₀/mL 에서 $10^{6.3}$ TCID₅₀/mL 까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 12). 이 백신주에 대한 약독화 유무는 시험백신을 제조하여 자돈을 이용한 역계대시험을 통해 확인하였다.

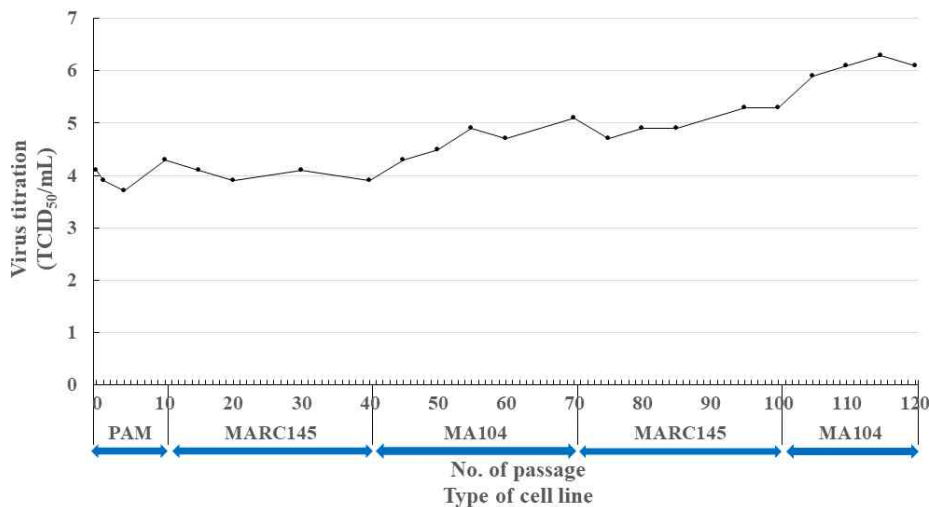


그림 12. 백신주 선정을 위한 여러 세포주에서의 계대 배양별 바이러스 증식능 분석.

나. 마이코플라즈마(*Mycoplasma hyopneumoniae*)에 대한 대량배양공정 개발

1. PCV2 항체-free 마이코플라즈마 대량배양 시스템 개발

- 현재 사용 중인 써코-마이코플라즈마 복합 백신의 경우 600 mL의 마이코플라즈마 하이오뉴모니아(*Mycoplasma hyopneumoniae*)를 배양하기 위해서는 최소 80 mL의 돼지 혈청(porcine serum)을 영양분으로 공급해야 된다. 이로 인해 마이코플라즈마 배양에 사용하는 돼지 혈청에는 PCV2 항체가 함유되어 있고, 마이코플라즈마 항원과 PCV2 항원을 혼합할 때에는 마이코플라즈마 항원 내에 존재하는 PCV2 항체가 써코백신의 효능을 감소시킨다. 따라서 써코-마이코플라즈마 복합백신의 경우 상대적으로 써코백신의 효능이 써코 단일백신 보다 감소된다. 이러한 문제를 극복하기 위해 마이코플라즈마 배양에 사용하는 돼지 혈청에서 PCV2 항체를 제거하는 기술을 개발하여 PCV2 항체가 없는 돼지 혈청을 이용한 마이코플라즈마 대량배양시스템을 개발하였다.



그림 13. PCV2 항체-free 마이코플라즈마 대량배양 시스템 개발.

- 이를 위해 그림 13.과 같은 시스템을 사용하여 PCV2 항체가 감소된 돼지혈청을 제조하여 마이코플라즈마 배양을 진행하였다. 그 결과 기존 돼지혈청에 비해 오히려 마이코플라즈마 성장률이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 현상은 항체에 결합력이 높은 Protein A affinity chromatography를 활용하여 anti-PCV2 IgG를 제거한다고 해도 비특이적인 결합에 의해 항체 외 다른 성장인자들도 같이 감소하기 때문인 것으로 사료된다.

2. 마이코플라즈마 대량배양을 위한 공정개발

1) Real-time PCR 함량 분석법

- 마이코플라즈마 대량배양을 위한 공정개발 시 정확한 함량분석을 위해 Real-time PCR 함량 분석법을 사용하며, 이를 통해 배양조건에 따른 마이코플라즈마의 함량을 분석하였다. 마이코플라즈마는 1차년도에 확보된 백신주(WGB-Mhp)를 사용하였다.

① Real-time PCR 분석 방법

- 시판되는 PowerChek™ *Mycoplasma hyopneumoniae* Real-time PCR Kit(코젠바이오텍)을 사용하여 마이코플라즈마 역가 측정에 사용하였다.

- 배양된 WGB-Mhp는 DNA Extraction kit를 사용하여 DNA를 추출하였으며, Real-time PCR kit 제조사에 따른 방법으로 Real-time PCR 반응액 제조하였다.

Component	Volume (μ l)
Mycoplasma hyopneumoniae Real-time PCR Premix	15
Template DNA	5
Total	20

- Real-time PCR kit 제조사에 따른 방법으로 Real-time PCR 수행은 다음과 같다.

Fluorophore	Target
FAM	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
JOE (VIC or HEX)	IC (Internal control)

Temperature ($^{\circ}$ C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

② Real-time PCR 분석 결과

- 정확한 Real-time PCR 결과를 확인하기 위해 kit에 포함된 양성대조군을 사용하여 Standard curve 측정하였다.

- 제조사의 포함된 양성대조군인 Control DNA (10^5 genomic copy)를 10배씩 희석하여 3번 반복 실험을 수행하였으며, 그 결과를 토대로 최종 standard curve를 확립하였다.

Genomic Copy	희석배수	반복 시험 횟수 (Ct value)			반복 시험 평균 (Ct value)
		1	2	3	
5	0	21.73	21.43	21.57	21.57667
4	10	24.10	24.37	24.63	24.36667
3	100	27.14	27.84	28.38	27.78667
2	1000	31.24	31.62	32.35	31.73667
1	10000	35.39	34.75	35.77	35.30333

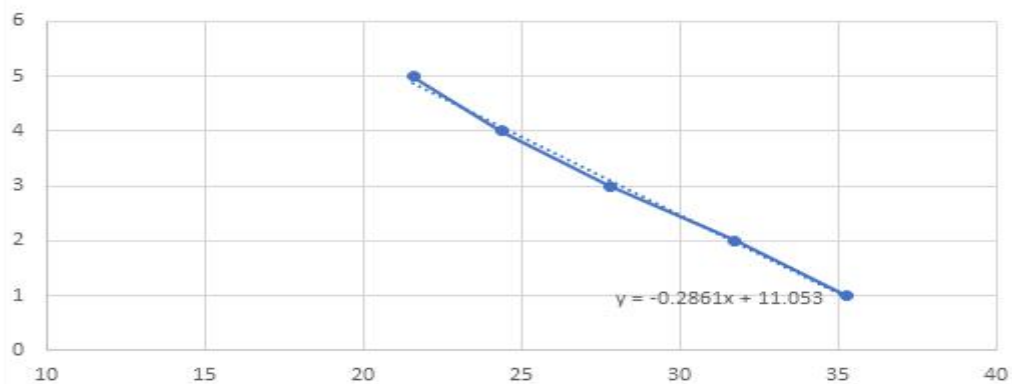


그림 14. 마이코플라즈마 Real-time PCR standard curve ($y = -0.2861x + 11.053$).

2) 배지 조성별 마이코플라즈마 배양 확인

① 기존 배지 조성별 마이코플라즈마 배양 조건

- 마이코플라즈마 배양은 서울대학교 제공 배지(SNU-Mhp medium), 시판 배지 FRIS liquid medium (Millipore, 146180), 참고문헌 배지(Veterinary Microbiology. 195, 158-164 (2016))를 사용하였다.

SNU Medium	
Component	Volume
Hank's balanced salt solution (10x)	25.0 ml
<i>Mycoplasma</i> Broth Base	4.35 g
BHI	4.10 g
Yeast extract powder	5.0 g
2% Thallium acetate	3.3 ml
1. Up to 600.0 ml DW	
2. 위 시약 혼합 후 pH7.2 조절	
3. 멸균	
0.2% Phenol red	2.4 ml
50% Glucose solution	10.0 ml
Horse serum	81.3 ml
Porcine serum	81.3 ml
Ampicillin	6.0 g
4. Filtration 0.2 μm	

참고 문헌(Reference) Medium	
Component	Volume
Sterilized distilled water (D.W)	365.0 ml
Brain Heart Infusion (BHI) broth	1.5 g
PPLO broth	1.6 g
1. 멸균	
Fresh yeast	18.0 ml
A solution [†]	12.5 ml
B solution [‡]	12.5 ml
Horse serum	50.0 ml
Porcine serum	50.0 ml
0.6% Phenol red	1.0 ml
100 mg/ml Azlocillin	25.0 μl
100 mg/ml Flucloxacillin	25.0 μl
2. 위 시약 혼합 후 pH7.4로 조절	

[†] 160.0g/L NaCl, 4.0g/L KCl, 2.0g/L MgSO₄·7H₂O, 2.0g/L MgCl₂·6H₂O, 3.7g/L CaCl₂·2H₂O

[‡] 3.0g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 1.2g/L KH₂PO₄

Veterinary Microbiology. 195, 158-164 (2016)

- 마이코플라즈마 배양 조건은 5% CO₂, 37°C 조건으로 7일간 정지배양으로 수행하였다.

② 기존 배지 조성별 마이코플라즈마 역가 측정

- 3가지 배지 조성에 마이코플라즈마를 접종한 후 7일 배양하였으며, 마이코플라즈마 배양액에서 확보된 DNA를 이용하여 Real-time PCR을 측정한 결과, 각 배지 별 Genomic copy 수는 $10^5 \sim 10^6$ copy 로 확인되었다.

Real-time PCR (Genomic Copy/ml)		
FRIIS medium	SNU Medium	Reference paper Medium
$10^{6.83}$	$10^{5.16}$	$10^{6.73}$

- 3가지 배지 조성으로 마이코플라즈마 배양 결과 참고문헌 배지와 시판배지 (FRIIS medium)에서 높은 역가를 확인할 수 있었다.

- 대량 배양 공정 상 ① 시판배지 (FRIIS medium) 사용, ② 항생제 종류의 다양성, ③ Horse serum, Porcine serum의 농도(각 10%)등 대량 배양 공정의 문제점을 해결하기 위해 새로운 배양 배지를 제조하였다.

③ 기존 배양 조건의 변화에 대한 마이코플라즈마 배양 및 역가 측정

- 마이코플라즈마 배양조건의 변화에 따른 역가 분석을 위해 ① 5% CO₂, 37°C, ② 5% CO₂가 포함되지 않은 37°C로 정치배양으로 구분하여 결과를 확인하였다.

- 배양 조건 변화에 따른 결과, 5% CO₂에 대한 유의미한 차이가 없음을 알 수 있었다.

Culture Condition (Genomic Copy/ml)					
FRIIS medium		SNU Medium		Reference paper Medium	
5% CO ₂	Without 5% CO ₂	5% CO ₂	Without 5% CO ₂	5% CO ₂	Without 5% CO ₂
$10^{7.33}$	$10^{7.21}$	$10^{6.36}$	$10^{6.16}$	$10^{6.93}$	$10^{6.87}$

④ 대량배양 공정 개선을 위한 배지 조성 변경에 대한 마이코플라즈마 배양 조건

- 시판배지 (FRIIS medium), SNU medium, 참고문헌 medium의 각 배지 조성을 변경하여 최적의 대량공정 배양 배지(WGB-Mhp-Medium) 제조하였다. 특히, 2종의 Serum 비율을 감소(기존 10% → 5%)하여 대량배양 공정 단가 절감 효과를 확인하였다.

WGB-Mhp-Medium	
Component	Volume
Sterilized distilled water (D.W)	365.0 ml
Brain Heart Infusion (BHI) broth	1.5 g
PPLO broth	1.6 g
0.6% Phenol red	1.0 ml
1. 멸균	
Fresh yeast	18.0 ml

A solution	12.5 ml
B solution	25.0 ml
Ampicillin	0.25 g
2. 위 시약 혼합 후 pH 7.4로 조절	
bottle top filter 0.2	
Horse serum	25.0 ml
Porcine serum	25.0 ml

† 160.0g/L NaCl, 4.0g/L KCl, 2.0g/L MgSO₄·7H₂O, 2.0g/L MgCl₂·6H₂O, 3.7g/L CaCl₂·2H₂O

‡ 3.0g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 1.2g/L KH₂PO₄

⑤ 대량배양 공정 개선을 위한 배지 조성 변경에 대한 마이코플라즈마 역가 측정

- 5% CO₂가 포함되지 않은 37℃ 정치배양 조건에서 마이코플라즈마 배지 조성을 WGB-Mhp-medium과 다른 배양 배지를 이용하여 역가를 측정하였다.

- 최종 배양된 마이코플라즈마 배양액에서 확보된 DNA를 이용하여 Real-time PCR을 측정한 결과, 각각의 배지별 Genomic copy 수는 대부분 10⁷ copy로 확인되었다.

대량 배양 조건 확립		
Medium	CT value	Genomic Copy/ml
FRIIS Medium	12.08	7.59
Reference Medium	12.97	7.34
WGB-Mhp-Medium	12.16	7.57

- 대량배양조건 확립을 위해 제조된 WGB-Mhp-Medium의 결과 시판되는 FRIIS medium과 역가 차이가 없기에 대량 공정에서 중요한 제조비용의 문제를 해결하고자 WGB-Mhp-Medium을 사용하여 대량 배양을 실시하였다.

⑥ 세균 접종량에 따른 마이코플라즈마 역가 측정

- 확립된 대량배양 배지 조건에서 세균 접종량(Seeding)에 따른 마이코플라즈마 역가 측정을 실시하였다. 세균 접종은 세균체와 배양배지의 혼합량으로 조절하여 접종량의 차이에 대한 마이코플라즈마 배양 역가의 변화를 확인하였다.

- 세균 접종량의 변화에 따른 마이코플라즈마 배양 역가는 1/1000 비율로 접종한 시험구를 제외한 대부분의 시험구에서 마이코플라즈마 역가가 차이가 없는 것으로 확인하였다.

- 따라서, 대량배양 공정 시 세균 접종량을 1/100 으로 확립하게 되었다.

세균 접종량에 따른 배양 조건 확립		
접종량(세균 : 배양배지)	Ct value	Genomic Copy/ml
1 : 1	11.78	7.68
1 : 10	11.98	7.62
1 : 100	12.01	7.61
1 : 1000	14.29	6.96

⑦ 대량 배양 조건 확립에 따른 Small scale 배양 검증 및 역가 측정

- 마이코플라즈마 Bulk 생산을 위해 배양 배지 총량을 1.0 L, 1.5 L, 2.0 L 로 구분하여 최적의 배양 조건 검증하였다. 다른 세균과는 달리 마이코플라즈마 대량 배양은 오염의 문제점이 발생되어 Fermentor 배양이 아닌 대용량 Bottle로 진행하였다.
- 최종 배양액 총량을 달리 하여 마이코플라즈마를 배양 한 결과, 2.0 L bottle에 1.0 ~ 2.0 L 총량을 넣은 모든 시험구에서 유의미한 차이가 없었다.

Small Scale 배양 공정 결과		
배양액 총량 (L)	Ct value	Genomic Copy/ml
1.0 L	14.78	6.82
1.5 L	14.83	6.81
2.0 L	14.93	6.78

⑧ 마이코플라즈마 대량배양조건 확립

- 배지 조성, 배양조건, 세균 접종량, 배양 용기의 배양 총량 등 다양한 대량배양조건을 수행하여 공정을 확립하였다.
- 배양 배지의 경우 2가지 Serum이 5%가 포함된 WGB-Mhp medium으로 확립되었으며, 배양 조건은 5% CO₂가 포함되지 않은 37℃ 정치배양 조건에서 배양 공정이 확립되었다.
- 또한, 세균 접종량의 경우 배양 배지 100 : 세균 1의 비율로 접종하며, 배양 용기의 최대 총량으로 하여 배양하는 조건으로 공정을 확립하였다.

3. 이뮤니스 DMVac의 *M. hyopneumoniae* 에 대한 함량분석법 확인

1) CCU와 O.D_{410nm}와의 상관관계

- 마이코플라즈마 제조 시 함량분석을 위해 사용하는 방법으로 실제 생산 시, 흡광도 값(O.D_{410nm})을 기준으로 함량을 확인합니다.

① 시험백신의 흡광도

1.1. 흡광도 분석 방법

- 흡광도 파장(Wavelengths): 410 nm
- 마이코플라즈마 원액, 10배 희석, 100배 희석, 200배 희석, 400배 희석함.
- 음성대조군 : 마이코플라즈마 증식 Media (WGB-Mhp-Medium).

1.2. 흡광도 결과(평균값)

- 마이코플라즈마 증식 배지의 평균 흡광도 값: 0.345.

희석배수	원액	10배	100배	200배	400배
평균 O.D	1.461	0.660	0.465	0.125	0.072

② 시험백신의 Color Change Unit (CCU)

2.1. CCU 측정방법

- 흡광도 결과 0.12 값이 나온 희석 배수의 마이코플라즈마 희석액 3.0 mL을 Culture media broth 27.0 mL에 혼합하여 10^{-1} 부터 10^{-10} 까지 10진 희석하고 10진으로 단계 희석된 마이코플라즈마 시험백신을 37°C, CO₂ 조건에서 7일간 배양하고 매일 색 변화를 관찰하여 노란색으로 변한 tube의 희석배수 결과를 판정함.

2.2. CCU 분석 결과

- CCU 분석방법은 M.P.N.을 사용하였으며, 10^{-5} 에서 3/3(색 변화된 tube 수/총 3개 tube), 10^{-6} 에서 3/3, 10^{-7} 에서 2/3 tube의 색변화가 관찰됨. 그 결과, 측정값은 1.1×10^8 CCU/mL 로 확인됨(그림 1).

③ O.D_{410nm} 와 CCU의 상관관계

- 시험 백신 제조 후 200배 희석된 샘플에서 O.D_{410nm}의 흡광도 값이 0.12 이상으로 확인됨.

- O.D_{410nm}의 흡광도 값이 0.125 인 시료를 7일 동안 배양하면서 매일 색 변화를 관찰한 결과, 10^{-7} 희석배수까지 노란색으로 색 변화가 관찰됨(그림 1).

- 따라서, O.D_{410nm}의 흡광도 값이 0.12 이상인 경우 마이코플라즈마의 세균수는 1.0×10^8 CCU/ml 이상인 것으로 확인되었고, 이를 통해 백신의 항원함량을 결정할 수 있었음.



그림 15. 마이코플라즈마 하이오뉴모니에(WGB-Mhp)의 CCU 측정 결과.

다. DMVac, PRRS-NA 및 PRRS-M에 대한 시험백신 제조

1. DMVac(싸코바이러스 및 마이코플라즈마 세균 복합 사독 백신)

- PCV2d 및 마이코플라즈마 복합백신인 DMVac은 다음과 같은 방법으로 제작되었다. WGC-W-PK-15 세포주 vial 1개를 원료 입출고 규정에 의거하여 담당자에게 인계받은 후 SOP에 따라 세포를 해동 후 계대배양을 진행하였다. 세포의 계대 배양을 진행하여 2 L Roller bottle에서의 최종 배양 단계가 되면 앞의 과정과 동일한 인계과정을 통하여 싸코바이러스 생산주인 WGV-W-PCV2 1 vial을 MOI 0.1이 되게 바이러스를 희석하여 175T flask에 주입하고 정치배양을 4~5일간 배양한 후 CPE를 관찰하면서 80%의 세포변형효과가 관찰되었을 때, 세포내 바이러스를 확보하기 위해 냉/해동 과정을 3회 실시한 후 채득된 용액을 원심 분리하여 상층액을 무균적으로 확보하였다. 불활화제는 formalin을 사용하여 불활화공정을 진행하였고, 최종 원액의 0.2%를 첨가하여 37℃ 인큐베이터 교반기에서 48시간동안 불활화 처리 과정을 진행한 후 최종적으로 불활화 공정이 종료된 시점에서 4℃ 냉장보관을 진행한 다음 품질시험 결과를 확인하기 전까지 지정된 보관실에서 보관하였다. 불활화된 바이러스 벌크는 무균시험 및 바이러스 불활화시험을 진행하여 이상 없음을 확인하였다.

- 마이코플라즈마 생산용 세균주인 WGB-W-Mhp 1.0 ml/vial을 위에 기술된 방식과 동일하게 인계받은 후 SOP에 따라 세균 배양을 진행하였다. 생산용 세균주 0.5 ml를 Mhp-medium 4.5 ml에 접종하고 37℃, 5% CO₂ 조건으로 1주간 배양하였다(1차 배양). 배양 1주 후 새로운 Mhp-medium 45.0 ml를 넣어 1주간 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다(2차 배양). 2차 배양 후 새로운 Mhp-medium 450.0 ml를 넣어 1주간 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다(3차 배양). 대량배양(본배양)은 2 L Roller battle을 이용하였으며, 3회 계대 배양된 세균주에 새로운 Mhp-medium 4,500.0 ml를 넣어 1주간 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 대량 배양(본배양)을 통해 총 5,0 L 을 생산하였다. 최종 원액에 formalin 0.2%를 첨가하여 37℃ 인큐베이터 교반기에서 4일 동안 불활화 처리 과정을 진행한 후 High centrifuge를 이용하여 cell down 과정을 수행하였으며, 세균 침전물(pellet)에 1x Phosphate-buffered saline (PBS) 5.0 L로 pellet을 재 부유하였다. 불활화 공정이 종료된 시점에서 4℃ 냉장보관을 진행한 다음 품질시험 결과를 확인하기 전까지 지정된 보관실에서 보관하였다. 불활화된 세균 벌크에 대한 무균시험 및 박테리아 불활화시험을 진행하여 이상 없음을 확인하였다(표 1).

- 제도된 싸코 바이러스 벌크와 마이코플라즈마 벌크에 대한 불활화 검사를 완료한 후 바이러스와 세균이 동일하게 혼합된 벌크에 adjuvant를 정해진 혼합비율에 따라 혼합용기에서 균질화가 완료될 때까지 혼합하였다. 혼합이 완료된 벌크는 규정용기에 규정량 소분하여 sealing 한 후, 2~8℃ 냉암소에서 보관하였다. 최종적으로 제조된 시험백신을 협동기관인 서울대 채찬희 교수 연구실에 공급하였으며, 자돈의 방어효능을 확인하기 위해 사용하였다. 이 시험자료를 토대로 야외임상시험을 승인받았다.

표 1. PCV2d와 마이코플라즈마 복합백신인 DMVac 시험백신의 품질시험 평가

구분	품질시험 목록	평가결과
1	특성시험	적합
2	무균시험	적합
3	수소이온농도시험	적합
4	방부제 정량시험	적합
5	불활화 확인시험	적합
6	안전시험: 마우스, 기니픽, 자돈	적합
7	혈청 역가시험	적합

2. PRRS-NA에 대한 시험백신 제조

- PRRS-NA 시험백신은 다음에 기술된 방법에 의해 제작되었다. 우선, working cell bank인 WGC-W-MARC-145 vial 1개를 원료 입출고 규정에 의해 담당자에게 인계받은 후 SOP에 따라 세포를 해동 후 계대배양을 진행하였다. MARC-145 세포주의 계대 배양을 진행하여 최종 배양단계가 되면 앞의 과정과 동일한 인계과정을 통하여 WGV-W-PRRSV-NA 1 vial을 MOI 0.1이 되게 최종 MARC-145 세포와 바이러스를 희석하여 175T flask에 seeding 하였다. 정치배양을 진행하여 4~5일간 배양 후 CPE를 관찰하면서 80%의 세포변성효과가 관찰되었을 때, 세포내 바이러스를 확보하기 위해 냉/해동 과정을 3회 실시한 다음 채득된 용액을 원심분리하여 상층액을 무균적으로 확보하였다. 제조된 바이러스 벌크는 무균시험 및 바이러스 함량시험을 진행하여 이상 없음을 확인하였고(표 2), 품질검사가 완료된 바이러스 벌크를 동결보호제(TPGG, Trehalose+KH₂PO₄+K₂HPO₄+L-glutamate+Gelatin)와 혼합하여 동결건조 한 후 밀봉하여 2~8℃ 냉장소에서 보관하였다.

- 제조된 시험백신을 협동연구기관인 서울대 채찬희 교수 연구팀에 공급하였고, 역계대시험을 통해 자돈에 대한 안정성을 평가하였다. 이 시험자료를 토대로 야외임상시험을 승인받았다.

표 2. 복미형 PRRS 바이러스 생독백신인 PRRS-NA 시험백신의 품질시험 평가

구분	품질시험 목록	평가결과
1	특성시험	적합
2	무균 및 마이코플라스마 부정시험	적합
3	수소이온농도시험	적합
4	미입 바이러스 부정시험	적합
5	안전시험: 마우스, 기니픽, 자돈	적합
6	바이러스 함량시험	적합

3. PRRS-M (NA 및 EU type)에 대한 시험백신 제조

- PRRS 바이러스의 복미형과 유럽형 혼합 백신인 PRRS-M은 다음에 기술된 방법에 의해 제작되었다. 우선, working cell bank인 WGC-W-MARC-145 vial 1개를 원료 입출고 규정에 의해 담당자에게 인계받은 후 SOP에 따라 세포를 해동 후 계대배양을 진행하였다. MARC-145 세포주의 계대 배양을 진행하여 최종 배양단계가 되면 앞의 과정과 동일한 인계과정을 통해 WGV-W-PRRSV-NA 및 WGV-W-PRRSV-EU 각각 1 vial을 MOI 0.1이 되게 최종 MARC-145 세포와 바이러스를 희석하여 175T flask에 seeding 하였다. 정치배양을 진행하여 4~5일간 바이러스를 배양 후 CPE를 관찰하면서 80%의 세포변성효과가 관찰되었을 때, 세포내 바이러스를 확보하기 위해서 냉/해동 과정을 3회 실시한 다음 채득된 용액을 원심분리하여 상층액을 무균적으로 확보하였다. 불활화제는 formalin을 사용하여 불활화공정을 진행하였고, 최종 원액의 0.2%를 첨가하여 37℃ 인큐베이터 교반기에서 48시간동안 불활화 처리 과정을 진행한 다음 최종적으로 불활화 공정이 종료된 시점에서 4℃ 냉장보관을 진행하여 품질시험 결과 통보 전까지 지정된 보관실에서 보관하였다. 불활화된 바이러스 벌크는 무균시험 및 바이러스 불활화시험을 진행하여 이상 없음을 확인하였다(표 3).

- 제조된 시험백신을 협동연구기관인 서울대 채찬희 교수 연구팀에 공급하였고, 야외임상시험계획을 승인 받아 야외임상시험을 진행하였다.


표 3. 북미형 및 유럽형 PRRS 바이러스 혼합 백신인 PRRS-M 시험백신의 품질시험 평가

구분	품질시험 목록	평가결과
1	특성시험	적합
2	무균시험	적합
3	수소이온농도시험	적합
4	방부제 정량시험	적합
5	불활화 확인시험	적합
6	안전시험: 마우스, 기니픽, 자돈	적합
7	혈청 역가시험	적합


라. DMVac, PRRS-M 및 PRRS-NA의 야외임상시험 완료

1. 이뮤니스 디엠백(돼지 썬코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신)의 임상시험계획 승인

개인정보보호! 아무리 강조해도 지나치지 않습니다.



농림축산검역본부



수신 수신자 참조
(경유)

제목 동물용의약품 임상시험계획서(이뮤니스 디엠백) 승인 알림

1. 관련: 동물용의약품 임상시험계획서 승인 신청('20.9.14), 동물약품관리과-14258('20.11.6)호, 보완자료 제출('21.7.22) 및 추가자료 제출('21.9.8)

2. 우진비앤지(주)에서 제출한 "이뮤니스 디엠백"의 임상시험계획서를 불임의 기술검토 의견서의 내용을 반영하는 조건으로 아래와 같이 승인하며, 향후 임상시험 중 변경이 불가피한 경우 그 변경 사유를 우리 본부에 제출하고 변경 내용에 대해 재승인 받아야 함을 알려 드립니다.

업체명	구분	품목명	시험실시기관	비고
우진비앤지(주)	돼지 썬코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신	이뮤니스 디엠백	서울대학교 수의과대학 (시험책임자 채찬희)	'20.9.15 이전 접수건

붙임 1. 동물용의약품등 기술검토의견서 1부.
2. 임상시험계획서 1부. 끝.



농림축산검역본부장

수신자 우진비앤지(주) 귀하, 동물약품평가과장, 세균질병과장, 바이러스질병과장

주무관 **박나래** 수의사무관 **하준일** 동물약품관리과 전임 322.9.13.장 **이연섭**

협조자


시행 동물약품관리과-12019 (2021.9.13.) 접수

우 39660 경상북도 김천시 혁신8로 177 / http://www.qia.go.kr


전화번호 054-912-0542 팩스번호 054-912-0530 / paknale@korea.kr / 비공개(7)

2. 이뮤니스 피알알에스-엠(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신) 임상시험계획 승인

개인정보보호! 아무리 강조해도 지나치지 않습니다.




농림축산검역본부



수신 수신자 참조
(경유)

제목 동물용의약품 임상시험계획서(이뮤니스 피알알에스-엠) 승인 알림

- 관련: 동물용의약품 임상시험계획서 승인 신청('20.8.18), 동물약품관리과-12728('20.9.29)호, 16564('20.12.21)호, 6370('21.5.4)호 및 보완자료 제출
- 우진비엔지(주)에서 제출한 "이뮤니스 피알알에스-엠(돼지 PRRS 예방 백신)"의 임상시험계획서를 승인하며, 향후 임상시험 중 변경이 불가피한 경우 그 변경 사유를 우리 본부에 제출하고 변경 내용에 대해 재승인 받아야 함을 알려 드립니다. 끝.



농림축산검역본부장인


수신자 우진비엔지(주) 귀하, 동물약품평가과장, 바이러스유행관리팀

주무관	박나래	수의사무관	이준일	동물약품관리과	전교자(7.5.장)	이연섭
참조자						
시행	동물약품관리과-9169	(2021. 7. 5.)	접수			
우	39660	경상북도 김천시 혁신8로 177	/ http://www.qia.go.kr			
전화번호	054-912-0542	팩스번호	054-912-0530	/ paknale@korea.kr / 비공개(7)		


1 - 1

3. 이뮤니스 피알알에스-엔에이(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신) 임상시험계획 승인

개인정보보호! 아무리 강조해도 지나치지 않습니다.



농림축산검역본부




수신 수신자 참조
(경유)

제목 동물용의약품 임상시험계획서(이뮤니스 피알알에스-엔에이) 승인 알림

- 관련: 동물용의약품 임상시험계획서 승인 신청('20.9.14), 동물약품관리과-16567('20.12.21)호 및 보완자료 제출('21.8.18)
- 우진비엔지(주)에서 제출한 "이뮤니스 피알알에스-엔에이"의 임상시험계획서를 붙임의 기술검토의견서의 내용을 반영하는 조건으로 아래와 같이 승인하며, 향후 임상시험 중 변경이 불가피한 경우 그 변경 사유를 우리 본부에 제출하고 변경 내용에 대해 재승인 받아야 함을 알려 드립니다.

업체명	구분	품목명	시험실시기관	비고
우진비엔지(주)	돼지의 돼지생식기호흡기증후군 예방 백신	이뮤니스 피알알에스-엔에이	서울대학교 수의과대학(시험책임자 재찬희)	'20.9.15. 이전 접수건

붙임 1. 동물용의약품등 기술검토의견서 1부.
2. 임상시험계획서 1부. 끝.



농림축산검역본부장인

수신자 (주)우진비엔지 귀하, 동물약품평가과장, 바이러스유행관리팀

주무관	박나래	수의사무관	기타	동물약품관리과	전교자(10.21.장)	이연섭
참조자						
시행	동물약품관리과-13454	(2021. 10. 21.)	접수			
우	39660	경상북도 김천시 혁신8로 177	/ http://www.qia.go.kr			
전화번호	054-912-0542	팩스번호	054-912-0530	/ paknale@korea.kr / 비공개(7)		

1 - 1

4. 이뮤니스 디엠크(돼지 썬코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신)의 야외임상시험 완료

- 목적 동물(자돈: 3~4 주령 1 회 2.0 mL 씩 근육접종)에 대한 확대 시험을 통해 안전성 확보와 효과 검증을 위해서 3개 농장을 대상으로 야외임상시험을 실시하였고, 아래의 기술한 부분을 중심으로 백신의 안전성과 효능을 평가하였다[서울대학교 '백신 안전성 및 효능 평가' 내용 참고].

- ① 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무
- ② 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간의 임상증상 발현 비율 차이
- ③ 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석

5. 이뮤니스 피알알에스-엠(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 야외임상시험 완료

- 목적 동물(자돈: 생후 3~4주령 1차 근육접종, 3주 후 2차 근육접종)에 대한 확대 시험을 통해 안전성 확보와 효과 검증을 위해서 3개 농장을 대상으로 야외임상시험을 실시하였고, 아래의 기술한 부분을 중심으로 백신의 안전성과 효능을 평가하였다[서울대학교 '백신 안전성 및 효능 평가' 내용 참고].

- ① 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무
- ② 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간의 임상증상 발현 비율 차이
- ③ 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석


6. 이뮤니스 피알알에스-엔에이(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 야외임상시험 완료

- 목적 동물(자돈: 생후 3주령 이상에서 1차 접종)에 대한 확대 시험을 통해 안전성 확보와 효과 검증을 위해서 3개 농장을 대상으로 야외임상시험을 실시하였고, 아래의 기술한 부분을 중심으로 백신의 안전성과 효능을 평가하였다[서울대학교 '백신 안전성 및 효능 평가' 내용 참고].

- ① 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무
- ② 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간의 임상증상 발현 비율 차이
- ③ 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석


마. PRRS-NA 품목허가 승인 및 DMVac, PRRS-M의 품목허가 보완

1. 이뮤니스 피알알에스-엔에이(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 품목허가 승인


제 26 - 192 호		
동물용의약품	[■] 제조 [] 수입	품목 허가증
1. 업 체 명:	우진비앤지(주)	
2. 업 종:	동물용의약품등 제조업	
3. 제 품 명:	이뮤니스 피알알에스-엔에이	
4. 구 분:	동물용의약품	
5. 허가 조건:	재심사 대상: 신청기간 2029.03.17.~2029.06.16.	
6. 허가(신고)번호:	제 26 - 192 호	
7. 최초 허가(신고)연월일:	2023.03.17	
8. 부 표:	별 정	
동물용의약품등취급규칙 제 11 조 및 제 16 조 제 4 항 따라 위와 같이 허가(신고)합니다.		
2023년 3월 17일		
농림축산검역본부 		

2. 이뮤니스 피알알에스-엠(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 품목허가 보완(진행중)

개인정보보호! 아무리 강조해도 지나치지 않습니다.



농림축산검역본부




수신 우진비앤지(주)
(경유)

제목 동물용의약품 제조품목(이뮤니스 피알알에스-엠) 허가 기술검토 결과 알림

- 관련: 동물용의약품 제조품목 허가 신청('23.5.17., 접수번호 3753) 및 동물약품관리과-11858('23.9.22.)호
- 귀사에서 동물용의약품 제조품목 허가 신청한 아래 품목에 대한 기술검토 결과 불임과 같이 보완이 요구되니, 「동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정」에 따라 보완사항을 포함하여 관련 자료를 **60일 이내**에 동물약품관리과로 제출하여 주시기 바랍니다.

품목명	구분	기술검토 결과
이뮤니스 피알알에스-엠	돼지의 PRRS 예방 백신	보완

불임 동물용의약품 기술검토의견서 1부, 끝.



농림축산검역본부장인


주무관 **장예숙** 수의사무관 **김문환** 동물약품관리과장 **신강(2023.10.13.)**
 협조자 **김성규**

시장 동물약품관리과-12668 (2023. 10. 13.) 접수


우 39660 김천시 혁신로 177 / http://www.qia.go.kr
 전화번호 054-912-0542 팩스번호 054-912-0530 / hschang2019@korea.kr / 비공개(7)

3. 이뮤니스 디엠백(돼지 쉐코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신)의 품목허가 보완(진행중)

개인정보보호! 아무리 강조해도 지나치지 않습니다.



농림축산검역본부




수신 우진비앤지(주)
(경유)

제목 동물용의약품 제조품목(이뮤니스 디엠백 백신) 허가 기술검토 결과 알림

- 관련: 동물용의약품 제조품목 허가 신청('23.5.31., 접수번호 4193)
- 귀사에서 동물용의약품 제조품목 허가 신청한 아래 품목에 대한 기술검토 결과 불임과 같이 보완이 요구되니, 「동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정」에 따라 보완사항을 포함하여 관련 자료를 **60일 이내**에 동물약품관리과로 제출하여 주시기 바랍니다.

품목명	구분	기술검토 결과
이뮤니스 디엠백 백신	돼지의 쉐코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신	보완

불임 동물용의약품 기술검토의견서 1부, 끝.



농림축산검역본부장인

주무관 **장예숙** 수의사무관 **김문환** 동물약품관리과장 **신강(2023.10.11.)**
 협조자 **김성규**

시장 동물약품관리과-12566 (2023. 10. 11.) 접수

우 39660 김천시 혁신로 177 / http://www.qia.go.kr
 전화번호 054-912-0542 팩스번호 054-912-0530 / hschang2019@korea.kr / 비공개(7)

바. PRRS-NA의 국가검정시험법 개정

1. 이뮤니스 피알알에스-엔에이(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 국가검정시험법 개발

<p>차. 혈청 역가시험 바이러스 환량시험을 실시한 때에는 혈청 역가시험을 생략할 수 있다.</p> <p>1) 동 물 체중 8~10 kg(4~6주령)의 PRRSV 항체음성 건강한 돼지 4마리를 사용한다.</p> <p>2) 시 험 2마리의 돼지에 1두분을 근육접종하고 35일 후에 대조군과 함께 증파 항체가를 측정한다. 재혈한 혈청을 56℃, 30분간 비등화 한 후 2진 희석한다. 희석액 MEM(PRRSV 항체음성 2% FBS 함유, pH 6.5~7.0)을 사용하여 표준 PRRSV 200 TCID₅₀을 희석혈청과 동량 혼합하여 37℃, 90분 동안 증파시킨 후 PRRSV균주에 감수성 있는 MARC-145 세포 또는 이와 동등한 세포에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 세포변성효과를 관찰한다. 세포변성효과가 억제된 혈청의 최고 희석배수의 역수를 증파 항체가로 한다.</p> <p>3) 관 결 1두분 접종군의 증파 항체가는 4배 이상이어야 하며 대조군은 음성이어야 한다.</p> <p>카. 검정의 반복 "가"항에서 "차"항까지 시험에서 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당시험을 반복한다.</p>	<p>5) KNA09.06.90 주</p> <p>가) 재 료 백신을 백신접종 규격량이 되도록 세포배양배지에 용해한 것을 시험재료로 한다.</p> <p>나) 시 험 용해한 시험재료를 10진 희석한 후 분유된 MARC-145, MA104 세포(1x10⁵ cells/ml)에 접종하여 37℃, 5~6일간 CO₂배양기에서 배양한 다음 이를 고정시킨다. 감염 세포 단층배양물에 PRRSV 특이항체를 이용하여 염색하고 형광 현미경을 통해 관찰하여 특이형광의 나타나는 것을 감염자로 하여 TCID₅₀을 산출한다.</p> <p>다) 관 결 바이러스환량은 1두분당 10^{5.0} TCID₅₀ 이상이어야 한다.</p> <p>차. 혈청 역가시험 바이러스 환량시험을 실시한 때에는 혈청 역가시험을 생략할 수 있다.</p> <p>1) 동 물 체중 8~10 kg(4~6주령)의 PRRSV 항체음성 건강한 돼지 4마리를 사용한다.</p> <p>2) 시 험 2마리의 돼지에 1두분을 근육접종하고 35일 후에 대조군과 함께 증파 항체가를 측정한다. 재혈한 혈청을 56℃, 30분간 비등화 한 후 2진 희석한다. 희석액 MEM(PRRSV 항체음성 2% FBS 함유, pH 6.5~7.0)을 사용하여 표준 PRRSV 200 TCID₅₀을 희석혈청과 동량 혼합하여 37℃, 90분 동안 증파시킨 후 PRRSV균주에 감수성 있는 MARC-145 세포 또는 이와 동등한 세포에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 세포변성효과를 관찰한다. 세포변성효과가 억제된 혈청의 최고 희석배수의 역수를 증파 항체가로 한다.</p> <p>3) 관 결 1두분 접종군의 증파 항체가는 4배 이상이어야 하며 대조군은 음성이어야 한다.</p> <p>카. 검정의 반복 "가"항에서 "차"항까지 시험에서 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당시험을 반복한다.</p>
--	--

사. 백신 제품 홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립

1. 백신 제품 카탈로그 제작 및 외국 거래처 홍보

- 당사는 동물약품인 생균제, 인체의약품인 소염제, 친환경 농자재 및 백신 등의 제품으로 현재 18개국 60개 거래처에 공급하고 있다. 본 연구과제를 통해 개발된 백신 제품의 홍보 및 해외 판매를 위해 당사의 유통경로를 이용하고자 백신 제품의 카탈로그를 제작하였다.
- 제작된 백신 카탈로그는 우선 돼지 소비량이 높은 국가(중국, 태국, 베트남 등)와 돼지 호흡기질병에 대한 백신에 관심이 높은 거래처를 중심으로 제공할 예정이다.
- 또한 국내 수의학회 및 한국양돈수의사회 세미나, 그리고 해외 동물용의약품 박람회에 부스를 설치하여 직접적으로 백신 제품에 대한 홍보도 진행할 계획이다.

2. 이뮤니스 피알알에스-엔에이(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신) 제품 카탈로그 제작



IMMUNIS[®] PRRS-NA

Composition (Per 1 Dose) Live attenuated PRRSV NLT 10⁸5.0 TCID₅₀
(KNA090690)

Efficacy To alleviate symptoms in piglets caused by North American-type Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus infection

Dosage Vaccination scheme
Dilute the vaccine (freeze-dried material) with the enclosed diluent and administer 1 dose (1ml) intramuscularly into the neck muscles behind the ear

3. 이뮤니스 디엠백(돼지 썬코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신) 제품 카탈로그 제작



IMMUNIS[®] DMVac

Composition (Per 1 Dose) Porcine circovirus 2d (SNUVR201901) NLT 1 x 10⁸5.0 FAID₅₀
Mycoplasma hyopneumoniae OD 0.12 at 410nm (NLT 10⁸8 CCU)
(WGB-Mhp)

Efficacy To prevent porcine diseases caused by Porcine Circovirus Type 2 and Mycoplasma hyopneumoniae

Dosage Vaccination scheme
· Piglets: 1 dose of 2.0 ml at 3-4 weeks of age
Vaccination site and dose: intramuscularly, 2.0 ml per pig

- 해외시장진출을 위해 3개 백신(이뮤니스 디엠백, 이뮤니스 피알알에스-엔에이, 이뮤니스-엠)에 대한 국내 품목허가 완료 후 해외 거래처를 통해 수출국의 품목허가 절차를 진행할 예정입니다. 이를 위해 우선 해외 수출대상국(태국 및 베트남)에서 안전성 및 효능평가를 25년 상반기에 진행할 예정입니다.

4. 국내외 시장 동향 파악 및 대응방안 수립

○ 국내 썬코-마이코플라즈마 복합 백신 시장 규모

- 현재 썬코바이러스 백신 시장은 국내 동물용 백신 시장 중 최대 규모로 단일 백신만 연간 350억원에 달하며 썬코-마이코 복합백신을 더하면 연간 500억원 이상으로 거대시장을 형성하고 있다. 이 거대시장에서 다국적기업이 차지하는 비중은 90% 이상이며 국내기업의 백신이 차지하는 비중은 극히 낮은 실정이다(축산신문, 2020.09.09).

회사	회사명	제품명	2020년 매출액 (천원)
수입백신 회사	베링거인겔하임	썬코-마이코플렉스	27,000,000
	조에티스	포스테라 PCV MH	726,000
	MSD	포실리스 PCV M Hyo	9,992,000
총액			27,718,000
출처) 한국동물약품협회			

- 2019년 글로벌 돼지 백신 시장에서 돼지 썬코바이러스(PCV2) 백신이 차지하는 비중은 31.1%로 가장 높은 점유율을 나타냈다. 2014년 영국왕립수의대학의 한 연구결과에 따르면 환경 스트레스 요인(높은 온도 및 과밀도)은 PCV2의 발생률을 증가시킬 가능성이 높다고 한다. 이로 인해 돼지 썬코바이러스 백신 시장은 2025년까지 매년 증가 추세를 보일 것으로 예측되며, 돼지 폐렴을 유발하는 원인균인 마이코플라즈마에 대한 백신 또한 2025년까지 매년 증가 추세를 보일 것으로 판단된다.
- 본 과제에서 개발된 이뮤니스 디엠백은 외국 백신보다 생산 수율이 10배 이상 높기 때문에 판매가격 또한 10% 이상 저렴하게 공급될 예정으로 타사의 국내 백신에 비해 시장진입에 유리한 장점을 가지고 있다.

표 47 2018-2025년 질병별 돼지용 백신 시장(100만 USD)

질병	2018년	2019년	2020년	2025년	CAGR(2020-2025년)
돼지 썬코바이러스 2	650.3	683.5	718.7	971.5	6.2%
PRRS	311.9	326.9	342.9	460.2	6.1%
돼지 파보바이러스	263.9	274.6	285.9	369.8	5.3%
돼지 인플루엔자	226.0	233.6	241.7	302.4	4.6%
돼지 폐렴	193.4	198.9	204.8	250.0	4.1%
기타 돼지 질병	469.0	480.2	492.1	587.4	3.6%
총계	2,114.5	2,197.6	2,286.1	2,941.3	5.2%

출처: WSPA, AHI, APPA, FAO, OIE, 축산부, MOAC, FAVA, TVMA, 연례 보고서, 언론 보도, 투자 설명회, 전문가 면담, MarketsandMarkets 분석

○ 국내 PRRS 생독백신 시장 현황

- 현재 국내 PRRS 백신 시장은 아래 표에서 확인되듯이 다국적기업이 국내 시장의 90% 이상을 차지하고 있다. 특히 다국적기업은 5~6년 전부터 북미형(베링거인겔하임 및 조에티스)과 유럽형(MSD 및 히프라)으로 대결구도를 형성하여 치열한 기술경쟁을 펼치고 있었으며, 그 시장 규모는 2배 가까이 증가하였다. 이러한 상황임에도 불구하고 아직까지 국내 업체 중 PRRS 생독백신을 제품으로 출시된 곳은 없다. 대성미생물연구소와 고려비앤피가 각각 국내에서 분리한 북미형 PRRS 바이러스로 생독백신을 개발하였으나 품목허가를 받지 못했다(축산신문, 2019.04.12).

회사	회사명	제품명	2020년 매출액 (천원)
수입백신 회사	베링거인겔하임	인겔백 PRRS MLV	9,520,000
	조에티스	포스테라 PRRS	1,181,000
	MSD	포실리스 PRRS	460,000
	히프라	UNISTRAIN PRRS	2,166,000
총액			13,327,000
출처) 한국동물약품협회			

○ **국내 백신회사 최초의 내수용 북미형 PRRS 생독백신 개발**

- 현재 국내 백신회사 중에서 내수용 생독 백신을 개발한 회사는 없다. 한국동물약품협회의 자료에 의하면 국내 제조사인 고려비엔피의 수출용 힘백 돈호방-피알알에스 생백신만이 있으며, 2020년 실적은 단지 13,000,000원에 불과하다. 이미 안전성이 확보된 백신주를 이용하여 국내에서 처음으로 내수용 PRRS 생독 백신을 개발하고자 한다. 현재 국내 PRRS 생독백신의 시장 규모는 한국동물약품 협회의 2020년 판매액을 보면 130억원 규모이며, 이중 북미형 PRRS 생독백신 판매 규모가 106억원이기 때문에 사업성 및 시장 규모는 충분하다고 볼 수 있다.
- 본 과제를 통해 품목허가 받은 이뮤니스 피알알에스-엔에이는 최근 국내 양돈 농가에 유행하고 있는 북미형 PRRS NADC34-Like와 유사한 백신주로 효과적인 방어 효과를 가진 백신으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 외국 백신보다 생산 수율이 10배 이상 높기 때문에 판매가격이 10% 이상 저렴하게 공급될 예정으로 다국적기업의 백신과 충분한 경쟁력을 예 비해 시장에서의 진입에 유리한 장점을 가지고 있다.

○ **국내 PRRS 사독백신**

- 생독백신과 달리 국내 PRRS 사독백신 시장은 10분의 1 수준도 안 되는 상황이다. 생독백신 시장에 비해 상대적으로 사독백신 시장이 적게 형성된 이유는 다국적기업에서 변이가 심한 PRRS 바이러스에 능동적으로 대응하기 위해 생독백신을 강조했던 이유가 크다. 그러나 PRRS 사독백신만의 장점이 있다. 실례로 생독백신으로 안전화한 후 면역력을 유지하려는 농장이나 생독백신에 특별히 효과를 보지 못한 감염농장 등에서 유용하게 활용할 수 있다. 또한 비감염농장에서는 생독백신이 아닌 사독백신을 사용해야하므로 농장에서는 사독백신도 필요하다.
- 2018년에서 2022년까지 PRRS 사독백신의 국내 및 수출 판매액을 분석해보면 국내시장은 2019년 소폭 감소하였으나 2018년도에 비해 2022년 50% 이상 신장하였다. 이러한 이유는 최근 다국적기업(세바)의 제품 출시 및 판매에 의한 것으로 국내에서 사독백신의 판매액은 기존 양돈 농가들이 PRRS 생백신의 안전성에 대한 인식 변화로 인해 늘어날 전망이다. 또한 해외 수출시장은 매년 큰 폭으로 성장하고 있다.
- 이런 국내외 상황을 반영하였을 때, 본 과제를 통해 곧 출시 예정인 이뮤니스 피알알에스-엠 사독백신의 국내외 시장진입 및 점유율 확대 전망은 매우 밝다고 하겠다.

국내 및 해외 PRRS 사독백신 매출 현황 (백만원)

시장	2018년	2019년	2022년	비고
국내	64	52	93	세바 프로그레시스 PRRS 사독백신(유럽형) 판매액
수출	65	211	300	-
총액	129	263	393	-
출처) 한국동물약품협회				

[서울대학교] 백신 안전성 및 효능 시험

가. 써코 마이코 복합백신 실험실 내 효능(공격 접종) 시험

1. 시험 디자인

공격 접종 시험은 크게 2개 그룹(백신군, 대조군)으로 시험 디자인을 아래와 같이 설정하여 시행하였다.

표 4. 시험 디자인

그룹	실험두수	백신접종 (3주령)	공격접종 (6주령)	부검 (9주령)
백신군PM	5	O (2.0 mL)	PCV2d + Mhp	O
백신군P	5	O (2.0 mL)	PCV2d	O
백신군M	5	O (2.0 mL)	Mhp	O
양성대조군PM	5	X	PCV2d + Mhp	O
양성대조군P	5	X	PCV2d	O
양성대조군M	5	X	Mhp	O
음성대조군	5	X	X	O

2. 평가 항목

백신은 임상, 면역학적, 바이러스학적, 병리학적 평가 등 4가지 항목에 관하여 평가하였다. 각각의 평가 항목에 대한 검사법을 실시하였다.

표 5. 평가 항목

평가 항목	검사방법	비고
임상학적 평가	직장 체온 측정	
	임상증상 관찰	
	일당 증체량 측정	
면역학적 평가	PCV2 항체 검사(IgG ELISA)	
	PCV2 중화 항체 검사	
	PCV2-인터페론-감마 분비 세포	
	Mhp 항체 검사 (IgG ELISA)	
	Mhp-인터페론-감마 분비 세포	
바이러스학적 평가	혈중 PCV2 바이러스 항원 정량분석	
	비강 Mhp 항원 정량 분석	
병리학적 평가	PCV2에 의한 림프절 병변 분석	
	림프절에서 PCV2 항원 분포 분석	
	Mhp에 의한 폐렴 병변 분석	

3. 공시돈 선정 및 백신 접종

(1) 사육 환경

공시돈은 23~24℃, 습도 60%가 유지되는 사육실에서 사육하였다. 사육 기간 동안 음수는 무제한으로 공급하였다.

(2) 공시돈의 PCV2, 마이코플라즈마, PRRS 바이러스 음성 확인 방법

공시돈의 PCV2, 마이코플라즈마, PRRS 바이러스 항체 음성 여부는 상업용 키트로 판정한다. Ingenasa INgezim Circo IgG ELISA 키트를 이용하여 PCV2 항체 여부를 확인하고, *M. hyopneumoniae* (*M. hyo.* Ab test, IDEXX Laboratories Inc.)를 이용하여 마이코플라즈마 항체 여부를 확인하며, PRRS 바이러스(PRRS X3 Ab test, IDEXX Laboratories Inc.)를 이용하여 검사하였다.

(3) 공시돈 선정 및 백신 접종

PCV2, PRRS 바이러스, 마이코플라즈마의 항체 음성인 건강한 3주령 자돈 35두를 공시한 후 백신군PM, 백신군P, 백신군M의 각각 5두씩에는 3주령에 디엠백 백신을 2.0 mL를 이근부에 접종하였다. 양성대조군PM, 양성대조군P, 양성대조군M과 음성대조군은 PBS를 2.0 mL를 이근부에 접종하였다.

4. 공격 접종 방법

(1) 공격 접종용 PCV2d 병원체 정보

① 공격 접종에 사용한 PCV2d 분리 정보

돼지 공격접종에 사용한 PCV2d는 서울대학교 수의과대학 병리학실에 병성감정 의뢰된 소모성 증후군 증상의 이유자돈의 림프절에서 분리한 PCV2d(strain SNUVR140004; d형타입, GenBank no. KJ437506)를 사용하였다.

② 공격 접종에 사용한 PCV2d 병원성

이번 공격접종에 사용한 PCV2d는 이번 공격접종에 사용한 마이코플라즈마와 혼합감염을 실시하면 림프절에서 전형적인 소모성 증후군 병변을 유발하는 것이 확인되었다. 따라서 이 복합 감염 실험 모델을 이용하면 써코바이러스2형과 마이코플라즈마(*Mycoplasma hyopneumoniae*) 예방 복합백신인 이유니스 디엠백 백신의 실험실내 효능 분석에 이용하여 정확한 효능 판정이 가능하다.

③ PCV2d 바이러스 접종량 결정

감염 실험에서 6주령 돼지에서 PCV2d를 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/mL로 마이코플라즈마(*Mycoplasma hyopneumoniae*)와 함께 접종 하면 돼지에서 위축 및 소모성 증후군 증상이 나타나는 것을 확인하였다. 이를 근거로 이번 실험에서도 동일한 양을 사용하였다.

④ PCV2d 바이러스 접종 방법

접종을 위하여 PCV2d를 $1 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/mL로 준비한다. 바이러스의 접종은 마지막 백신을 접종한 후 3주가 경과한 6주령 시점에서 실시하였다. 미리 준비된 양의 PCV2d를 3.0 mL씩 비강에 접종하였다. 바이러스 공격 접종은 백신군PM, 백신군P, 양성대조군PM, 양성대조군P의 총 20두에 시행하였다.

(2) 공격 접종용 Mhp 병원체 정보

① 공격 접종에 사용할 Mhp 분리

돼지 접종실험에 사용할 *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp; SNU98703)는 서울대학교 수의과대학 병리학실에 병성감정 의뢰된 호흡기 증상이 매우 심한 이유자돈에서 분리한 마이코플라즈마균을 사용하였다.

② 공격 접종에 사용할 Mhp 병원성 자료

본 실험에 사용할 마이코플라즈마 균주를 이유자돈에 접종하면 마른기침 등의 호흡기 증상과 전형적인 병리 조직학적 병변으로 기관지와 세기관지 주위에 림프구의 비후(peribronchial & peribronchiolar lymphoid tissue hyperplasia)가 관찰되었다. 따라서 본 실험에 사용할 마이코플라즈마 균주는 병원성이 높기 때문에 백신 효능 평가에 사용하기에 적합하다.

③ Mhp 접종량 결정

Mhp의 접종량은 본 시험에서 검사하는 백신과 유사한 썬코바이러스 2d형과 마이코플라즈마 복합백신의 공격 접종에서 사용한 Mhp의 접종량은 동일하게 7.0 mL의 1×10^7 color changing units (CCU)/mL를 사용한다. 이 접종량을 돼지에게 접종하면 전형적인 기관지와 세기관지 주위에 림프구의 비후(peribronchial & peribronchiolar lymphoid tissue hyperplasia)가 관찰되는 마이코플라즈마성 폐렴이 유발되는 것을 확인하였다.

④ Mhp 접종 방법

Mhp는 Friis medium에 배양하여 1×10^7 color changing units (CCU)/ml의 7.0 mL를 준비한다. Mhp의 접종방법은 기관지내 접종(intratracheal inoculation)을 실시하는데, xylazine hydrochloride (2.2 mg/kg), tiletamine hydrochloride (2.2 mg/kg), zolasepam hydrochloride (2.2 mg/kg)를 이용하여 마취를 실시한 다음 기관지내로 7.0 mL를 접종시킨다. 마이코플라즈마 공격 접종은 백신군PM, 백신군M, 양성대조군PM과 양성대조군M의 총 20두를 대상으로 시행하였다.

5. 관찰 및 시료 채취

(1) 채혈

21, 42, 49, 56, 63일령에 채혈을 실시하여 혈청을 분리한 후 검사 시점까지 4°C에 보관하였다.

(2) 비강 면봉 채취

21, 42, 49, 56, 63일령에 비강으로부터 면봉을 이용하여 분비물을 채취하고 검사 시점까지 4°C에 보관하였다.

6. 임상학적 평가

(1) 직장 체온 측정

① 체온 측정 시간

백신 접종 후 7일간 체온을 측정하여 기재하였다.

② 그룹별 체온 측정 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P 값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ 직장 체온 측정 결과

백신 접종 후 0일, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 백신군PM, 백신군P, 백신군M, 양성대조군PM, 양성대조군P, 양성대조군M, 음성대조군과의 체온을 비교하면 유의성이 없었다.

표 6. 그룹별 직장 체온

일령	그룹별 직장 체온 (평균±표준편차)						
	백신군PM	백신군P	백신군M	양성 대조군PM	양성 대조군P	양성 대조군M	음성 대조군
0일	38.7±0.1	38.7±0.1	38.8±0.2	38.8±0.2	38.9±0.1	38.8±0.2	38.7±0.2
1일	38.7±0.2	38.7±0.2	38.9±0.1	38.8±0.2	38.9±0.2	38.9±0.2	38.7±0.2
2일	38.8±0.2	38.6±0.2	38.7±0.2	38.9±0.1	38.8±0.1	38.6±0.1	38.8±0.2
3일	38.7±0.2	38.7±0.2	38.8±0.2	38.9±0.1	38.7±0.1	38.8±0.2	38.8±0.2

4일	38.8±0.1	38.7±0.2	38.8±0.3	38.6±0.1	38.6±0.1	38.8±0.2	38.8±0.1
5일	38.6±0.1	38.8±0.1	38.7±0.2	38.8±0.2	38.7±0.2	38.8±0.1	38.7±0.2
6일	38.7±0.2	38.8±0.1	38.8±0.2	38.8±0.1	38.9±0.2	38.8±0.2	38.8±0.2
7일	38.7±0.1	38.7±0.2	38.8±0.2	38.8±0.1	38.8±0.1	38.8±0.2	38.8±0.2

(2) 임상 증상

① 임상 증상 평가 방법

공시돈의 임상 증상은 표 III-6-3의 임상증상 점수의 기준에 따라 동일하게 매주 1회씩 관찰하고, 공격 접종 후 개체에 따른 임상 증상 변화를 기록하였다.

표 7. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

② 임상 증상 통계 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ 임상 증상 결과

양성대조군P와 양성대조군M이 각각 백신군P와 백신군M 보다 49일령 및 63일령에서 임상증상이 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군PM이 백신군PM보다 56일령과 63일령에서 임상증상이 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 8. 그룹별 임상 증상^(a,b: 유의성 의미)

일령	그룹별 임상 증상 (평균±표준편차)						
	백신군PM	백신군P	백신군M	양성대조군PM	양성대조군P	양성대조군M	음성대조군
21일	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
42일	0.2±0.4	0.0±0.0	0.2±0.4	0.0±0.0	0.2±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0
49일	0.4±0.5	0.4±0.5^b	0.4±0.5^b	1.0±0.7	1.0±0.0^a	1.0±0.0^a	0.0±0.0

56일	1.0±0.0 ^b	0.8±0.4 ^a	0.8±0.4 ^a	1.6±0.9 ^a	1.2±0.4 ^a	1.4±0.5 ^a	0.0±0.0
63일	1.6±0.5 ^b	0.8±0.4 ^b	1.2±0.4 ^b	4.4±0.9 ^a	2.4±0.9 ^a	3.2±1.1 ^a	0.0±0.0

(3) 체중

① 체중 측정

21(백신 접종), 42(백신 접종 3주후; 공격접종 시기), 63일령(부검)에 공시돈의 체중을 측정하여 주당 증체량을 비교하였다.

② 체중 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 체중 변화

백신군PM과 음성대조군이 양성대조군PM 보다 체중이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 9. PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 체중^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 체중 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21일 (백신접종)	5.58±0.15	5.68±0.29	5.78±0.16	
42일 (공격접종)	8.80±0.25	8.70±0.26	8.60±0.28	
63일	20.44±0.55 ^b	14.46±1.16 ^c	21.16±0.25 ^a	41.36%

④ PCV2d 공격 접종 그룹 체중 변화

백신군P, 양성대조군P, 음성대조군에서 체중이 63일령에서 유의성이 없었다.

표 10. PCV2d 공격 접종 그룹 체중^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 체중 (평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 증가율
21일 (백신접종)	5.62±0.27	5.62±0.18	5.78±0.16	
42일 (공격접종)	8.70±0.29	8.66±0.21	8.60±0.28	
63일	20.64±0.65	19.90±0.48	21.16±0.25	

⑤ Mhp 공격 접종 그룹 체중 변화

백신군M과 음성대조군이 양성대조군M 보다 체중이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 10. Mhp 공격 접종 그룹 체중^(a,b: 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 체중 (평균±표준편차)			
	백신군M	양성 대조군M	음성 대조군	양성대조군M 대비 백신군M 증가율
21일 (백신접종)	5.76±0.15	5.70±0.20	5.78±0.16	
42일 (공격접종)	8.68±0.19	8.60±0.37	8.60±0.28	
63일	20.72±0.65 ^a	18.74±0.34 ^b	21.16±0.25 ^a	10.57%

(5) 일당증체량

① 일당 증체량 계산

21, 42, 63일령에 체중을 측정하여 21~42일령, 42~63일령, 21~63일령의 일당 증체량을 계산하였다.

② 일당 증체량 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 일당 증체량 변화

백신군PM과 음성대조군이 양성대조군PM 보다 일당증체량이 42~63일령, 21~63일 사이에 유의성 (P<0.05) 있게 높았다.

표 11. PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 일당 증체량^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 일당 증체량 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21~42일	153.33±18.87	143.81±16.88	134.29±14.05	
42~63일	554.29±23.95 ^b	274.29±49.63 ^c	598.10±17.04 ^a	102.08%
21~63일	353.81±15.49 ^a	209.05±25.39 ^b	366.19±4.88 ^a	69.25%

④ PCV2d 공격 접종 그룹 일당 증체량 변화

백신군P, 양성대조군PM, 음성대조군에서 일당증체량의 유의성(P<0.05)이 없었다.

표 12. PCV2d 공격 접종 그룹 일당 증체량^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 일당 증체량 (평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 증가율
21~42일	146.67±10.32	144.76±12.63	134.29±14.05	
42~63일	568.57±42.14	535.24±26.36	598.10±17.04	
21~63일	357.62±21.59	340.00±14.42	366.19±4.88	

⑤ Mhp 공격 접종 그룹 일당 증체량 변화

백신군M과 음성대조군이 양성대조군M 보다 일당증체량이 42~63일령, 21~63일 사이에 유의성 (P<0.05) 있게 높았다.

표 13. Mhp 공격 접종 그룹 일당 증체량^(a,b: 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 일당 증체량 (평균±표준편차)			
	백신군M	양성 대조군M	음성 대조군	양성대조군M 대비 백신군M 증가율
21~42일	139.05±12.33	138.10±13.04	134.29±14.05	
42~63일	573.33±30.04 ^a	482.86±31.33 ^b	598.10±17.04 ^a	18.74%
21~63일	356.19±16.72 ^a	310.48±10.46 ^b	366.19±4.88 ^a	14.72%

7. PCV2 면역학적 평가

(1) PCV2 IgG Ab 측정

① ELISA 검사

21, 42, 49, 56, 63일령에 채취한 혈액을 이용하여 PCV2에 대한 특이적인 항체는 상업화된 Ingenasa INgezim Circo IgG ELISA 키트를 이용하여 측정하였다. 사용한 Ingenasa INgezim Circo IgG ELISA 키트는 민감도가 93.2%이고 특이도는 100%이다.

② 검사방법

검사할 혈청을 1:200 으로 희석하여 Ingenasa INgezim Circo IgG ELISA 키트의 plate well에 100 μl 씩 분주하고, 양성 대조군 및 음성 대조군 샘플을 각 2개의 well에 100 μl씩 분주한다. 검사할 각 well을 필름으로 덮고 실온에서 1시간 동안 보관하여 반응 시킨 후 세척액으로 4회 반복 세척한다. Peroxidase가 표지된 conjugate 용액을 100 μl씩 각 well에 분주하고 실온에서 30분 동안 보관한다. 각 well을 6회 세척한 후 substrate (TMB)를 각 well에 100 μl씩 분주하고 빛을 차단 한 후 10분간 상온에서 보관한다. 반응 중지 용액(Stop solution)을 100 μl 분주하여 반응을 멈추고 5분 이내에 450 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정한다. 양성대조군의 OD 값이 0.70 이상, 음성 대조군의 OD 값이 0.35 이하 일 때 유효한 값으로 간주한다. 음성 Cut off는 음성 대조군 OD 값 + 0.20 이며 이보다 낮은 샘플은 음성으로 판정하고, 양성 Cut off는 음성 대조군 OD 값 + 0.25 이며 이보다 높은 샘플은 양성으로 판정한다. 두 개의 Cut off 사이의 결과를 갖는 샘플은 의심으로 판정한다.

③ PCV2 IgG 항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약

통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

④ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 PCV2 IgG 항체 변화

백신군PM이 양성대조군PM과 음성대조군 보다 PCV2 IgG 항체가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군PM이 음성대조군 보다 PCV2 IgG 항체가 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 14. PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 PCV2 IgG (a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 PCV2 IgG 항체 (평균±표준편차) (ELISA 판정 기준; 양성: ≥0.30, 음성: <0.30)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21일 (백신접종)	0.12±0.01	0.14±0.03	0.17±0.02	
42일 (공격접종)	0.39±0.01 ^a	0.14±0.01 ^b	0.14±0.01 ^b	178.57%
49일	0.43±0.05 ^a	0.17±0.03 ^b	0.15±0.03 ^b	152.94%
56일	0.66±0.04 ^a	0.27±0.06 ^b	0.19±0.05 ^c	144.44%
63일	0.90±0.07 ^a	0.52±0.05 ^b	0.21±0.06 ^c	73.08%

⑤ PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 IgG 항체 변화

백신군P이 양성대조군P과 음성대조군 보다 PCV2 IgG 항체가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군P이 음성대조군 보다 PCV2 IgG 항체가 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 15. PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 IgG (a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 IgG 항체 (평균±표준편차) (ELISA 판정 기준; 양성: ≥0.30, 음성: <0.30)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 증가율
21일 (백신접종)	0.13±0.02	0.16±0.01	0.17±0.02	
42일 (공격접종)	0.36±0.02 ^a	0.15±0.02 ^b	0.14±0.01 ^b	140.00%
49일	0.40±0.04 ^a	0.15±0.03 ^b	0.15±0.03 ^b	166.67%
56일	0.66±0.07 ^a	0.23±0.02 ^b	0.19±0.05 ^b	186.96%
63일	0.83±0.11 ^a	0.49±0.05 ^b	0.21±0.06 ^c	69.39%

(2) PCV2 중화항체 측정

① PCV2 중화항체 검사

채취한 혈액의 PCV2에 대한 특이적인 중화항체 검사는 기존에 발표된 방법으로 시행한다.

② 중화항체 검사에서 사용한 Anti PCV2 polyclonal antibody

중화항체 검사 측정 할 때 필요한 anti PCV2 polyclonal antibody는 Veterinary Diagnostic laboratory, Iowa State University, Ames, Iowa, USA를 사용하였다.

③ 중화항체 검사에서 사용한 양성 대조군 혈청

중화항체 검사 측정용 양성 대조군 혈청으로 사용한 양성대조군은 PCV2d를 접종하여 중화항체를 형성한 혈청을 양성 대조군으로 사용하였다.

④ 검사방법

검사 전에 60℃에서 40분간 Heat inactivation 하여 혈청 내 바이러스를 모두 불활화 시킨다. 또한 실험의 최적화를 위해 접종 바이러스의 양을 100, 200, 400 TCID₅₀ 으로 나누어 시행하고 접종 시간도 36, 48, 72시간으로 나누어 시행하여 최적 조건을 잡는다.

먼저 96 well plate에 검사할 혈청을 2¹~2¹²까지 2배씩 DMEM 배지로 [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% l-glutamine, 10,000 U/ml of penicillin, 50μg/ml streptomycin and 3% non-essential amino acids] 희석하여 분주한다. 접종할 PCV2d strain (SNUVR140004)을 위에 기술한 TCID₅₀ titer 대로 50 μl씩 각 well에 분주하고 1시간 배양한 후, 2×10⁴ freshly trypsinised Swine Kidney (SK) cell을 각 well에 분주한다. 36, 42, 72 시간동안 각각 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양한다. 세포는 PBS로 2회 washing 하고 4% Paraformaide를 50 μl씩 분주하여 30분간 고정시킨다. 이 후 다시 PBS로 2회 washing 한 뒤 0.1% Triton X-100을 50 μl씩 분주하고 10분간 상온에서 배양시킨다. Anti-PCV2 polyclonal antibody 200배 희석액 [phosphate-buffered saline 포함 0.1% Tween 20 (PBS-Tween)]을 각 well에 분주하고 37℃에서 1시간 배양한다. 다시 PBS로 2회 washing 후, anti-rabbit polyclonal antibody (AP)를 분주하고 37℃에서 1시간 배양한다. 이후 최종적으로 Fast red 시약을 이용하여 발색을 확인한다. 각각의 혈청샘플은 정확성을 위해 2개씩 실험하며 확실한 PCV2 중화항체가 포함된 샘플을 양성대조군으로 둔다. 또 DMEM 배지만을 음성대조군으로 둔다. 바이러스 접종액은 미리 titer를 정량화하여야한다. 판독을 위해 100배 현미경을 이용한다. 무작위로 well상의 3군데를 선정하여 세포의 핵 혹은 세포질 혹은 핵과 세포질 모두가 염색된 세포의 개수를 수량화한다.

⑤ 중화항체 판정 기준

$\%VN = [1 - (\text{두개의 동일 혈청샘플 분주 well에서 측정된 양성 세포수의 평균} / \text{음성 대조군에서 측정된 양성 세포수})] \times 100$

%VN이 50 이상을 양성인 최대 혈청역가로 정하고 이때 가장 희석된 배수의 역수를 중화항체가로 정해 VNT₅₀이라 칭한다.

이 실험은 다음의 세 가지 기준을 부합해야 유효하다. 첫째 양성 대조군은 예상되는 항체가와 2배 이상 차이가 나면 안 된다. 둘째, 각 Plate의 12개 음성 대조군은 차이가 20% 이하이어야 한다. 셋째, 접종의 바이러스는 100~500 TCID₅₀/well 사이의 titer 이어야한다.

⑥ 중화항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

⑦ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 PCV2 중화항체 변화

백신군PM이 양성대조군PM보다 PCV2 중화항체가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성 (P<0.05) 있게 높았다. 음성대조군에서는 PCV2 중화항체가 검출되지 않았다.

표 16. PCV2d와 Mhp 공격접종 그룹 PCV2 중화항체^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 PCV2 중화항체 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21일 (백신접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일 (공격접종)	2.40±0.00 ^a	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일	4.60±0.55 ^a	0.00±0.00	0.00±0.00	
56일	6.20±0.45 ^a	1.80±0.45 ^b	0.00±0.00	244.44%
63일	6.80±0.84 ^a	2.60±0.55 ^b	0.00±0.00	161.54%

⑧ PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 중화항체 변화

백신군P가 양성대조군P 보다 PCV2 중화항체가가 42일령, 49일령, 56일령 및 63일령에서 유의성 (P<0.05) 있게 높았다. 음성대조군에서는 PCV2 중화항체가 검출되지 않았다.

표 17. PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 중화항체^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 중화항체 (평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 증가율
21일 (백신접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일 (공격접종)	2.20±0.00 ^a	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일	4.40±0.58 ^a	1.20±0.45 ^b	0.00±0.00	266.67%
56일	6.00±0.71 ^a	2.40±0.55 ^b	0.00±0.00	150%
63일	6.40±0.89 ^a	2.80±0.45 ^b	0.00±0.00	128.57%

⑨ 중화항체의 방어수준 판단 기준

본 실험의 디엠백의 경우 유사한 다른 종류의 써코-마이코 복합백신과의 비교에서 백신 접종 후 3주가 경과된 시점에서 디엠백과 CircoMycoGard(국내등록 타사백신 / 제조사 : 미국 팜게이트사) 모두 비슷한 2.2~2.4 Log₂ 수치를 보였으며, 공격접종 후 3주가 경과된 시점에서 이들 2개의 백신은 또한 유사하게 6.8~7.0 Log₂ 수치를 나타냈다. 따라서 이러한 비교를 통하여 써코-마이코 복합백신의 경우 백신 접종 후 3주가 경과된 시점에서 2.2~2.4 Log₂ 중화항체가 형성되면 공격접종 전에 방어가 가능한 충분한 방어항체 수준으로 판단이 되며, 공격접종 후 3주가 경과된 시점에서 6.8~7.0 Log₂ 중화항체를 형성하면 공격접종 한 PCV2를 예방하는 방어수준으로 판단된다.

표 18. 써코-마이코 복합백신의 PCV2 중화항체

일령	써코-마이코 복합백신 PCV2 중화항체		
	디엠백	CircoMycoGard	CircoMycoGard 대비 디엠백 증가율
백신접종 3주 후	2.4 Log ₂	2.2 Log ₂	9.09%
공격접종 3주 후	6.8 Log ₂	7.0 Log ₂	-2.86%

(3) PCV2 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정

① 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

21, 42, 49, 56, 63일령에 채취한 혈액을 이용하여 EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 희석한다. 희석한 혈액 4.0 ml를 15.0 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3.0 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나누게 한다. 18~20°C에서 400 g의 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll 층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용하였다.

② IFN- γ 분비 세포 수 측정

PCV2 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시한다. 분리된 말초혈액 단핵구를 PCV2d 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 μ g/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1×10^7 cell/ml의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1×10^6 cell/ml 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 PCV2 항원 4.0 μ g/ml의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μ l 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBST로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μ l씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μ l씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

③ IFN- γ -SC 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P 값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

④ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 PCV2 IFN- γ -SC 변화

백신군PM이 양성대조군PM과 음성대조군보다 PCV2 IFN- γ -SC가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군PM이 음성대조군보다 PCV2 IFN- γ -SC가 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 19. PCV2d와Mhp 공격접종그룹 PCV2 IFN- γ -SC^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d와Mhp 공격접종그룹 PCV2 IFN- γ -SC (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21일 (백신접종)	7.80±1.64	7.20±2.39	6.00±3.46	
42일 (공격접종)	29.40±8.91 ^a	11.20±2.77 ^b	6.60±4.22 ^b	162.50%
49일	48.20±7.36 ^a	29.80±9.34 ^b	9.00±6.96 ^c	61.75%
56일	97.80±20.58 ^a	37.60±7.02 ^b	9.20±6.72 ^c	160.11%
63일	108.20±9.39 ^a	55.40±10.90 ^b	11.40±7.54 ^c	95.31%

⑤ PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 IFN- γ -SC 변화

백신군P이 양성대조군P과 음성대조군보다 PCV2 IFN- γ -SC가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군P이 음성대조군보다 PCV2 IFN- γ -SC가 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 20. PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 IFN- γ -SC^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 PCV2 IFN- γ -SC (평균±표준편차)			
	백신군P	양성대조군P	음성대조군	양성대조군P 대비 백신군P 증가율
21일 (백신접종)	5.60±2.61	8.60±0.55	6.00±3.46	
42일 (공격접종)	30.20±4.44 ^a	11.80±2.68 ^b	6.60±4.22 ^b	155.93%
49일	47.00±10.34 ^a	27.60±3.91 ^b	9.00±6.96 ^c	70.29%
56일	92.00±21.64 ^a	39.20±7.89 ^b	9.20±6.72 ^c	134.69%
63일	103.20±9.76 ^a	49.20±8.81 ^b	11.40±7.54 ^c	109.76%

⑥ IFN- γ -SC의 방어수준 판단 기준

본 실험의 디엠백의 경우 유사한 다른 종류의 써코-마이코 복합백신과의 비교에서 백신 접종 후 3주가 경과된 시점에서 디엠백과 CircoMycoGard 모두 비슷한 $24\sim 29 \times 10^6$ PBMC/mL 수치를 보였으며, 공격접종 후 3주가 경과된 시점에서 이들 2개의 백신은 또한 유사하게 $62\sim 108 \times 10^6$ PBMC/mL 수치를 나타냈다. 따라서 이러한 비교를 통하여 써코-마이코 복합백신의 경우 백신 접종후 3주가 경과된 시점에서 $24\sim 29 \times 10^6$ PBMC/mL 정도의 인터페론-감마 분비세포를 유도하면 공격접종 전에 방어가 가능한 충분한 방어항체 수준으로 판단이 되며, 공격접종 후 3주가 경과된 시점에서 $62\sim 108 \times 10^6$ PBMC/mL 정도의 인터페론-감마 분비세포를 유도하면 공격접종 한 PCV2를 예방하는 방어수준으로 판단된다.

표 21. 써코-마이코 복합백신의 PCV2 IFN- γ -SC (10^6 PBMC/mL)

일령	써코-마이코 복합백신의 PCV2 IFN- γ -SC		
	디엠백	CircoMycoGard	CircoMycoGard 대비 디엠백 증가율
백신접종 3주 후	29	24	120.83%
공격접종 3주 후	108	62	174.19%

8. Mhp 면역학적 평가

(1) Mhp IgG 항체 측정

① ELISA 검사

채취한 혈액의 마이코플라즈마에 대한 특이적인 항체는 상용화된 Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test Kit (The herdChek M.hyo, Westbrook, ME, USA)로 측정하였다.

② 검사 방법

측정하기 10~20분 전에 Mhp ELISA kit를 미리 상온에 둔다. 항원이 흡착된 plate에 원액의 양성대조혈청 및 음성대조혈청을 100 μ l씩 각 2개의 well에 분주하고, 가검물 혈청을 40배 희석하여 각각 100 μ l씩 분주한다. 실온(18~25°C)에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 350 μ l씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척한다. 세척 후에 HRP anti-porcine IgG conjugate를 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 350 μ l씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척한다. 세척 후에 TMB 발색제를

각 well에 100 μ l씩 분주하고 15분간 실온에서 반응시킨다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 1.0 ml씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 650nm의 흡광도로 측정한다. 결과는 S/P값이 0.4 이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 S/P값의 변화 추이를 비교한다.

③ 마이코플라즈마 ELISA 검사항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

④ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IgG 항체 변화

백신군PM이 양성대조군PM과 음성대조군 보다 Mhp IgG 항체가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군PM이 음성대조군 보다 Mhp IgG 항체가 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 22. PCV2d와 Mhp 공격 접종그룹 Mhp IgG 항체^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IgG 항체 (평균±표준편차) (ELISA 판정 기준; 양성: ≥0.4, 음성: <0.4)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21일 (백신접종)	0.15±0.02	0.16±0.03	0.17±0.03	
42일 (공격접종)	0.48±0.05 ^a	0.21±0.06 ^b	0.22±0.08 ^b	128.57%
49일	0.81±0.16 ^a	0.42±0.13 ^b	0.15±0.03 ^c	92.86%
56일	0.99±0.14 ^a	0.60±0.12 ^b	0.15±0.03 ^c	65.00%
63일	1.31±0.15 ^a	0.93±0.17 ^b	0.24±0.10 ^c	40.86%

⑤ Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IgG 항체 변화

백신군M이 양성대조군M과 음성대조군 보다 Mhp IgG 항체가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군M이 음성대조군 보다 Mhp IgG 항체가 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 23. Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IgG 항체^(a,b: 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IgG 항체 (평균±표준편차) (ELISA 판정 기준; 양성: ≥0.4, 음성: <0.4)			
	백신군M	양성 대조군M	음성 대조군	양성대조군M 대비 백신군M 증가율
21일 (백신접종)	0.14±0.02	0.20±0.09	0.17±0.03	
42일 (공격접종)	0.50±0.10 ^a	0.20±0.03 ^b	0.22±0.08 ^b	150.00%
49일	0.79±0.26 ^a	0.36±0.15 ^b	0.15±0.03 ^c	119.44%
56일	0.91±0.20 ^a	0.53±0.18 ^b	0.15±0.03 ^c	71.70%
63일	1.15±0.22 ^a	0.88±0.14 ^b	0.24±0.10 ^c	30.68%

(2) Mhp 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정

① 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution (HBSS)과 희석한다. 희석한 혈액 4.0 ml를 15.0 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3.0 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18~20°C에서 400 g의 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll 층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용하였다.

② IFN- γ 분비 세포 수 측정

Mhp 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시한다. 분리된 말초혈액 단핵구를 Mhp 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot)분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 μ g/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1×10^7 cell/ml의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1×10^6 cell/ml 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 Mhp 항원 4.0 μ g/ml의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μ l 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBST로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μ l씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μ l씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

③ IFN- γ -SC 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P 값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

④ PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IFN- γ -SC 변화

백신군PM이 양성대조군PM과 음성대조군보다 Mhp IFN- γ -SC가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군PM이 음성대조군보다 Mhp IFN- γ -SC가 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 24. PCV2d와 Mhp 공격접종그룹 Mhp IFN- γ -SC^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격접종그룹 Mhp IFN- γ -SC (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 증가율
21일 (백신접종)	7.40±2.51	11.20±2.86	10.20±2.77	
42일 (공격접종)	25.40±3.05 ^a	11.40±4.72 ^b	8.60±5.03 ^b	122.81%
49일	36.20±5.45 ^a	18.60±1.82 ^b	9.00±1.87 ^c	94.62%
56일	57.00±7.58 ^a	23.60±4.88 ^b	9.60±1.14 ^c	141.53%
63일	59.60±6.99 ^a	27.40±7.64 ^b	8.80±2.59 ^c	117.52%

⑤ Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IFN- γ -SC 변화

백신군M이 양성대조군M과 음성대조군보다 Mhp IFN- γ -SC가 42일령, 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다. 양성대조군M이 음성대조군보다 Mhp IFN- γ -SC가 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 높았다.

표 25. Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IFN- γ -SC^(a,b): 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 Mhp IFN- γ -SC (평균±표준편차)			
	백신군M	양성대조군M	음성대조군	양성대조군M 대비 백신군M 증가율
21일 (백신접종)	10.00±2.00	8.60±3.36	10.20±2.77	
42일 (공격접종)	28.00±1.58 ^a	9.00±1.87 ^b	8.60±5.03 ^b	211.11%
49일	31.00±6.20 ^a	17.00±2.55 ^b	9.00±1.87 ^c	82.35%
56일	58.00±1.58 ^a	20.40±1.95 ^b	9.60±1.14 ^c	184.31%
63일	63.00±7.84 ^a	28.40±3.58 ^b	8.80±2.59 ^c	121.83%

⑥ IFN- γ -SC의 방어수준 판단 기준

본 실험의 디엠백의 경우 유사한 다른 종류의 써코-마이코 복합백신과의 비교에서 백신 접종 후 3주가 경과된 시점에서 디엠백과 CircoMycoGard 모두 비슷한 16~25 × 10⁶ PBMC/mL 수치를 보였으며, 공격접종 후 3주가 경과된 시점에서 이들 2개의 백신은 또한 유사하게 43~60 × 10⁶ PBMC/mL 수치를 나타냈다. 따라서 이러한 비교를 통하여 써코-마이코 복합백신의 경우 백신 접종 후 3주가 경과된 시점에서 16~25 × 10⁶ PBMC/mL 정도의 인터페론-감마 분비세포를 유도하면 공격접종 전에 방어가 가능한 충분한 방어항체 수준으로 판단이 되며, 공격접종 후 3주가 경과된 시점에서 43~60 × 10⁶ PBMC/mL₂ 정도의 인터페론-감마 분비세포를 유도하면 공격접종 한 마이코플라스마(*Mycoplasma hyopneumoniae*)를 예방하는 방어수준으로 판단된다.

표 26. 써코-마이코 복합백신의 Mhp IFN- γ -SC (10⁶ PBMC/mL)

일령	써코-마이코 복합백신의 Mhp IFN- γ -SC		
	디엠백	CircoMycoGard	CircoMycoGard 대비 디엠백 증가율
백신접종 3주 후	25	16	56.25%
공격접종 3주 후	60	43	36.53%

9. 혈중 PCV2 항원 미생물학적 평가

(1) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응으로 채취한 혈액에서 PCV2d를 정량 분석하였다.

(2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시한다. PCV2d ORF2를 확인하기 위하여 Primer 쌍(전방향: 5' GTATCAAAGGGCAGTGGAGG, 역방향: 5' GCACC ATCGTTATACTGTCAAGAAA)과 PCV2d에 특이적인 Probe (FAMTM 5'CAT CATGTCCACATTCCAG)을 이용한다. TOPcloner Blunt kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCV2d ORF2를 vector (Enzynomics)에 삽입 후 spectrophotometer를 이용하여 표준커브(Standard curve)를 구한다. PCR은 96-well

plate를 이용한다. 시료에서 추출한 DNA 2.5 μl 를 주형으로, 12.5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 10 μM 농도의 두 종류의 primer 각각 1.0 μl , 10 μM 농도의 probe 0.5 μl , 그리고 7.5 μl 증류수를 혼합하여 최종 25 μl 를 만든다. 반응은 universal 조건으로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 총 40회 반복하여 반응시킨다. 각 반응마다 양성대조물과 음성대조물을 샘플과 함께 반응시킨다. 반응 종료 후 PCR의 특이도를 확인하기 위하여 각 반응 산물의 해리곡선(melting curve)을 측정한다. 샘플의 cycle threshold level이 40 미만이라면 양성으로 판단한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct값을 표준곡선(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml을 산정한다.

(3) 혈중 PCV2 항원 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(4) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 혈중 PCV2 항원 수준 변화

백신군PM이 양성대조군PM 보다 혈중 PCV2 항원수준이 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 27. PCV2d와 Mhp 공격접종그룹 혈중 PCV2항원^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와Mhp 공격접종그룹 혈중 PCV2 항원 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
21일 (백신접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일 (공격접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일	3.66±0.16 ^b	5.21±0.22 ^a	0.00±0.00	97.18%
56일	3.60±2.03 ^b	6.03±0.16 ^a	0.00±0.00	99.63%
63일	4.17±0.61 ^b	6.74±0.23 ^a	0.00±0.00	99.73%

(5) PCV2d 공격 접종 그룹 혈중 PCV2 항원 수준 변화

백신군P이 양성대조군P 보다 혈중 PCV2 항원수준이 49일령, 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 28. PCV2d 공격 접종 그룹 혈중 PCV2 항원^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 혈중 PCV2 항원 수준 (평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 감소율
21일 (백신접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일 (공격접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일	2.60±2.38 ^b	5.09±0.27 ^a	0.00±0.00	99.68%
56일	3.31±1.86 ^b	5.50±0.48 ^a	0.00±0.00	99.35%
63일	3.28±1.86 ^b	5.96±0.66 ^a	0.00±0.00	99.79%

10. 비강 Mhp 항원 미생물학적 평가

(1) 실시간 중합효소 연쇄반응

실시간 중합효소 연쇄반응으로 비강 면봉의 Mhp를 정량 분석하였다.

(2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 primers와 probes는 이미 발표된 논문을 참고하여 진행한다. 이 논문에서 *Mycoplasma hyopneumoniae*를 탐지하기 위한 primer 및 probe는 Primer Express™ (Applied Biosystems) software를 이용하여 디자인한다. Classical TaqMan™ probe는 5'쪽에 FAM™-dye를, 3'쪽에 TAMRA™-dye로 표지되어 있는데 실험에 사용할 probe (5' TGTCCACTGCTGCAAATATTCGATTCTTGAA 3'; nucleotides 790~821)와 프라이머(전방향 5' TTGACTGCTATCTTTGCACGATAAG 3', nucleotides 740~764; 역방향 5' ACAATAATTGCTGACCGTGGC 3', nucleotides 843~821)를 이용한다. ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)을 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행한다. TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 25 µl reaction mixture에 최적화된 primer 농도인 300 nM를 Forward와 Reverse로 각각 분주하고, TaqMan™ probe의 100 nM을 분주시킨다. 양성 대조군으로서 AB (Applied Biosystems)에서 제공하는 TaqMan™ Exogenous Positive Control reagents를 모든 반응실험에 사용한다. 각각의 실험은 standard TaqMan™ thermal cycling parameters를 이용하여 측정하며, The Sequence Detection System 1.7 software (Applied Biosystems)를 결과자료 분석을 위해 이용한다.

(3) 실시간 중합효소 연쇄반응 판정 기준

*Mycoplasma hyopneumoniae*의 chromosomal DNA의 1 femtogram이 1개의 genome을 의미한다. 본 시험에서 사용한 *M. hyopneumoniae*에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응의 민감도는 1.4 femtogram까지 검출할 수 있다. 따라서 *M. hyopneumoniae*의 chromosomal DNA의 1.4 femtogram을 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하였을 때 Ct값 '38'이 되어 이 수치를 기준으로 38 이상이면 음성으로 하고, 이하이면 genomic copy 수를 계산하였다.

(4) 비강 마이코플라즈마 항원 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다.

만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(5) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 비강 Mhp 항원 수준 변화

백신군PM이 양성대조군PM 보다 비강 Mhp 항원수준이 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 29. PCV2d와 Mhp 공격접종그룹 비강 Mhp항원^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d와Mhp 공격접종그룹 비강 Mhp 항원수준 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
21일 (백신접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일 (공격접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
56일	2.12±1.21 ^b	3.47±0.34 ^a	0.00±0.00	95.53%
63일	2.94±0.42 ^b	4.17±0.27 ^a	0.00±0.00	94.11%

(6) Mhp 공격 접종 그룹 비강 Mhp 항원 수준 변화

백신군M이 양성대조군M 보다 비강 Mhp 항원수준이 56일령, 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 30. Mhp 공격 접종 그룹 비강 Mhp 항원^(a,b): 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 비강 Mhp 항원 수준 (평균±표준편차)			
	백신군M	양성대조군M	음성대조군	양성대조군M 대비 백신군M 감소율
21일 (백신접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일 (공격접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
56일	1.89±1.07 ^b	3.32±0.50 ^a	0.00±0.00	96.28%
63일	2.72±0.31 ^b	3.81±0.43 ^a	0.00±0.00	91.87%

11. 방어능 분석

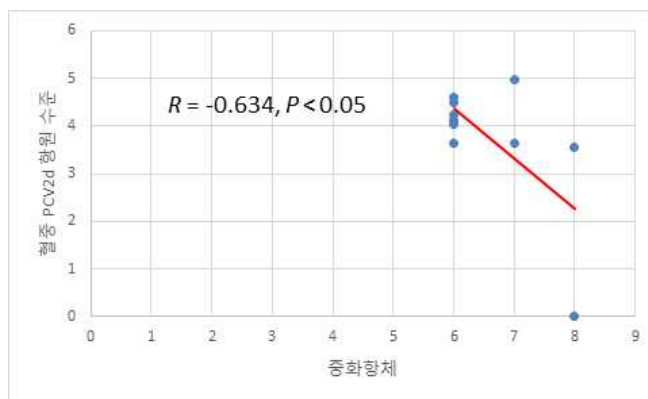
(1) PCV2d 방어능 분석 방법

① 통계 분석 방법

PCV2 방어능을 분석하기 위해서 혈중 PCV2d 항원 수준과 중화항체의 상관관계를 Pearson's correlation coefficient를 이용하여 분석하였다. 또한 혈중 PCV2d 항원 수준과 인터페론-감마 분비세포의 상관관계를 Pearson's correlation coefficient를 이용하여 분석하였다.

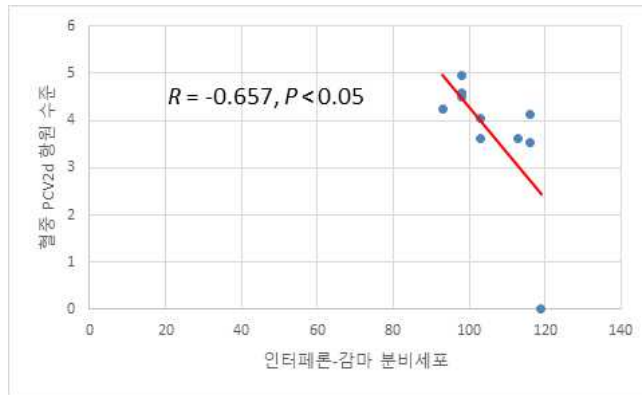
② 혈중 PCV2d 항원 수준과 중화항체의 방어능 분석 결과

혈중 PCV2d 항원 수준과 중화항체의 상관관계를 분석한 결과 통계학적으로 유의성 (P < 0.05) 있는 음의 상관관계(R = -0.634)가 확인되었다. 따라서 중화항체 수준이 높을수록 혈중 PCV2d 항원 수준은 감소함을 확인하였다.



③ 혈중 PCV2d 항원 수준과 인터페론-감마 분비세포의 방어능 분석 결과

혈중 PCV2d 항원 수준과 인터페론-감마 분비세포의 상관관계를 분석한 결과 통계학적으로 유의성 (P < 0.05) 있는 음의 상관관계(R = -0.657)가 확인되었다. 따라서 인터페론-감마 분비세포 수준이 높을수록 혈중 PCV2d 항원 수준은 감소함을 확인하였다.



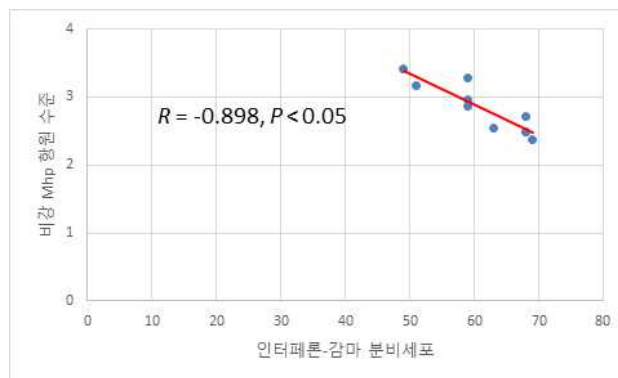
(2) Mhp 방어능 분석 방법

① 통계 분석 방법

Mhp 방어능을 분석하기 위해서 비강 Mhp 항원 수준과 과 인터페론-감마 분비세포의 상관관계를 Pearson's correlation coefficient를 이용하여 분석하였다. 9주령 결과를 가지고 분석하였다. PCV2d와 Mhp를 공격 접종한 백신군PM 5두와 Mhp만 공격 접종한 백신군M 5두의 자료 등 총 10두를 이용하여 분석하였다.

② 비강 Mhp 항원 수준과 인터페론-감마 분비세포의 방어능 분석 결과

비강 Mhp 항원 수준과 인터페론-감마 분비세포의 상관관계를 분석한 결과 통계학적으로 유의성 ($P < 0.05$) 있는 음의 상관관계($R = -0.898$)가 확인되었다. 따라서 인터페론-감마 분비세포 수준이 높을 수록 비강 Mhp 항원 수준은 감소함을 확인하였다.



12. 병리학적 평가

(1) 병리조직 샘플

공격 접종 3주가 경과된 시점인 약 9주령에 부검을 실시하여 각 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 림프절, 편도 중 2개 부위에서 주요 장기를 10% 포르말린에 고정하였다.

(2) PCV2와 관련된 병리조직학적 관찰 및 평가

포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 또한 서혜림프절은 임파구의 감소(lymphoid depletion) 정도에 따라 0~5등급으로 구분하여: 스코어 5 = 매우 심하고 육아종성 염증을 동반한 경우; 스코어 4 = 매우 심한(severe) 경우; 스코어 3 = 아주 심한(severe) 경우; 스코어 2 = 중등도(moderate)의 경우; 스코어 1 = 경미한(mild)의 경우; 스코어 0 = 전혀 병변이 없는 경우 등으로 표시한다. 각각의 4개 그룹간의 병변을 기록하고 Kruskal-Wallis 방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 4개 그룹간의 병리조직학적 임파구 감소(lymphoid depletion) 병변의 차이를 비교하였다.

(3) Mhp와 관련된 병리조직학적 관찰

Mhp에 의한 폐렴의 병변은 병변의 정도에 따라 0~6 등급으로 구분한다. 등급 개체별로 H&E 슬라이드 5장씩 제작하여 이들 슬라이드에서, 폐포벽의 비후정도, 폐포강의 염증 정도, 세기관지와 기관지 주의 림프구의 비후를 종합적으로 분석하여 0 ~ 6등급으로 결과를 판독하였는데, 정상인 경우 ‘스코어 0’, 경미한 다발성(mild multifocal)의 경우 ‘스코어 1’, 경미한 미만성(mild diffuse)의 경우 ‘스코어 2’, 중증도 다발성(moderate multifocal)의 경우 ‘스코어 3’, 중증도 미만성(moderate diffuse)의 경우 ‘스코어 4’, 심한 다발성(moderate multifocal)의 경우 ‘스코어 5’, 심한 미만성(severe diffuse)의 경우 ‘스코어 6’으로 표시한다. 각 개체별로 서로 다른 5장의 슬라이드를 제작하여 병변을 위에 언급한 0 ~ 6등급으로 판정하여 병변 수치의 평균값을 최종적으로 개체의 병변 등급으로 하여 분석하였다.

(4) 병리조직학적 병변 통계 분석 방법

그룹별 PCV2와 관련된 림프절 병변과 마이코플라즈마와 관련된 폐렴 병변을 비교하기 위해서는 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(5) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 림프절 병변 변화

백신군PM이 양성대조군PM보다 림프절 병변이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 31. PCV2d와 Mhp 공격접종그룹 림프절 병변^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종그룹 림프절 병변 수준 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
63일	1.96±0.64 ^b	4.52±0.46 ^a	0.00±0.00	56.64%

(6) PCV2d 공격 접종 그룹 림프절 병변 변화

백신군P이 양성대조군P 보다 림프절 병변이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 32. PCV2d 공격 접종 그룹 림프절 병변^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 림프절 병변 수준 (평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 감소율
63일	1.48±0.41 ^b	4.08±0.67 ^a	0.00±0.00	63.73%

(7) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 육안 폐렴 병변 변화

백신군PM이 양성대조군PM보다 육안 폐렴 병변이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 33. PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 육안 병변^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종그룹 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
63일	10.50±7.16 ^b	36.50±18.17 ^a	0.00±0.00	71.23%

(8) Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 육안 병변 변화

백신군M이 양성대조군M보다 육안 폐렴 병변이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 34. Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 육안 병변^(a,b): 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)			
	백신군M	양성 대조군M	음성 대조군	양성대조군M 대비 백신군M 감소율
63일	9.00±7.42 ^b	33.50±6.98 ^a	0.00±0.00	73.13%

(9) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 병리조직학적 폐렴 병변 변화

백신군PM이 양성대조군PM보다 병리조직학적 폐렴 병변이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 35. PCV2d와 Mhp 공격접종그룹 폐렴 조직 병변^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종그룹 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
63일	2.56±0.38 ^b	4.04±0.84 ^a	0.00±0.00	36.63%

(10) Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 병리조직학적 병변 변화

백신군M이 양성대조군M보다 병리조직학적 폐렴 병변이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 36. Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 조직 병변^(a,b): 유의성 의미)

일령	Mhp 공격 접종 그룹 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)			
	백신군M	양성 대조군M	음성 대조군	양성대조군M 대비 백신군M 감소율
63일	2.28±0.94 ^b	3.68±0.64 ^a	0.00±0.00	38.04%

13. 림프절과 편도 PCV2 항원 수준 평가

(1) 림프절 병변에서 PCV2 항원 검출

면역조직화학법을 이용한 서혜림프절에서 PCV2의 증식정도를 측정하는 방법은 돼지 쉐코바이러스 예방 백신의 효능 실험에서 널리 사용하는 방법이다. 백신이 효과적이면 시험 종료 시점에 채취한

서혜림프절에서 PCV2 항원 양성인 세포가 감소하는 것을 확인할 수 있다.

(2) 면역조직화학법 검사 방법

면역염색법은 이미 많은 문헌에서 사용한 PCV2에 대한 다클론성 항체 (polyclonal antibody)를 사용한다. 면역조직화학법의 실시 방법도 이미 발표되어 있는 방법대로 시행한다. 슬라이드 상의 조직 절편을 xylene으로 탈파라핀 후, 100%, 70%, 50% 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 1분, PBST (0.1% Tween 20이 포함된 PBS) 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K (Promega)를 37°C 에서 25분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제제를 위해 5% normal goat serum을 15 분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBST에 1:200으로 희석된 polyclonal rabbit anti-PCV2 1차 항체를 조직을 덮을 정도로 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBST로 세척 후, alkaline phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit (Dako) 2차 항체를 PBST에 1:250으로 희석하여 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBST로 세척하고, Fast red tablet (Roche)으로 발색하여 PCV2 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's Hematoxylin으로 배경을 염색하고 crystal mount로 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

(3) PCV2 항원 분석 방법

PCV2를 접종한 그룹에서 채취한 서혜림프절로 면역염색법을 실시한다. 분석방법은 이미 문헌에 보고된 방법을 사용한다. 면역조직화학법을 종료한 서혜림프절 조직을 현미경상에서 임의로 0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 PCV2 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세고, 각 그룹간 PCV2에 대한 양성감염세포수를 통계 처리하여 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

(4) 림프절과 편도에서 PCV2 항원 통계 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성 이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(5) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 림프절 PCV2 항원 수준 변화

백신군PM이 양성대조군PM 보다 림프절 PCV2 항원 수준이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 37. PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 림프절 PCV2 항원^(a,b: 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종그룹 림프절 PCV2 항원 수준 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
63일	10.27±2.56 ^b	40.27±12.94 ^a	0.00±0.00	74.50%

(6) PCV2d 공격 접종 그룹 림프절 PCV2 항원 수준 변화

백신군P이 양성대조군P보다 림프절 PCV2 항원 수준이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 38. PCV2d 공격 접종 그룹 림프절 PCV2 항원^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 림프절 PCV2 항원 수준(평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 감소율
63일	8.80±1.82 ^b	29.67±12.33 ^a	0.00±0.00	70.34%

(7) PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 편도 PCV2 항원 수준 변화

백신군PM이 양성대조군PM보다 편도 PCV2 항원 수준이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 39. PCV2d와 Mhp 공격 접종 그룹 편도 PCV2 항원^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d와 Mhp 공격 접종그룹 편도 PCV2 항원 수준 (평균±표준편차)			
	백신군PM	양성 대조군PM	음성 대조군	양성대조군PM 대비 백신군PM 감소율
63일	10.80±3.22 ^b	39.53±13.35 ^a	0.00±0.00	72.68%

(8) PCV2d 공격 접종 그룹 편도 PCV2 항원 수준 변화

백신군P이 양성대조군P보다 편도 PCV2 항원 수준이 63일령에서 유의성(P<0.05) 있게 낮았다.

표 40. PCV2d 공격 접종 그룹 편도 PCV2 항원^(a,b): 유의성 의미)

일령	PCV2d 공격 접종 그룹 편도 PCV2 항원 수준(평균±표준편차)			
	백신군P	양성 대조군P	음성 대조군	양성대조군P 대비 백신군P 감소율
63일	8.73±2.22 ^b	31.60±11.46 ^a	0.00±0.00	72.37%

나. PRRS-NA 생독 백신 안전성(역계대) 시험결과

1. 공시돈 선정

PRRS 바이러스의 항원과 항체가 없는 3주령 이유자돈을 사용하여 역계대와 바이러스의 번이 여부를 확인하였다.

2. 시험 디자인

생독백신 안전성 시험은 총 5번 계대 접종 실험으로 구성하였다. 계대(Passage; P) 1에서 4까지와 계대 5그룹의 A, D, F 그룹은 접종 후 21일 동안 관찰하였다. 계대 5의 B, C, E 그룹은 접종 후 42일 동안 관찰하였다.

계대	군	개체수	기간	접종액	접종방법
P1	P1	5	21	PRRSV 백신	IM
P2	P2	5	21	P1 조직유제액	IM
P3	P3	5	21	P2 조직유제액	IM
P4	P4	5	21	P3 조직유제액	IM
P5	A	5	21	P4 조직유제액	IM
	B	5	42	P4 조직유제액	IM
	C	5	42	PRRSV 백신	IM
	D	3	21	조직배양액	IM
	E	3	42	조직배양액	IM
	F	2	21	없음	-
	G	2	21	없음	-

3. 바이러스 백신주 접종 계대 방법

접종 7일 전 IgG ELISA 검사를 통해 PRRSV 항체 음성 돼지를 선별한다. 바이러스 접종은 위 표의 내용대로 실시하며, 모든 군에서 근육 내로 2.0 mL 접종한다. 먼저, P1 군에 PRRS 바이러스 백신주를 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL의 역가로 이근부에 접종한다. 이후 P2, P3, P4, P5 군에 각각 직전 계대군에 해당하는 돼지의 부검조직 유제액을 이근부에 $10^{5.0}$ TCID₅₀/mL 로 접종한다. P1, P2, P3, P4, P5A, P5D, P5F 그룹은 바이러스 및 조직유제액 접종 후 21일에 안락사를 진행하고, P5B, P5C, P5E 그룹은 접종 후 42일에 안락사를 진행한다. P1, P2, P3, P4 군의 돼지에서 tonsil, tracheal bronchial lymph nodes, spleen, lungs, peripheral blood lymphocyte, bronchial alveolar fluid (BAL Fluid)를 채취하여 실시간 중합 효소 연쇄반응 검사를 실시한다. 이 중 바이러스 역가가 가장 높은 조직의 유제액을 다음 계대군에 접종한다.

4. 평가항목

역계대 시험에서 아래와 같은 평가항목을 평가하였다.

표 41. 평가 항목

평가 항목	검사방법	비고
임상학적 평가	임상증상	
	체중	
면역학적 평가	PRRS 항체 검사(IgG ELISA)	
	PRRS 중화 항체 검사	
	PRRS-인터페론-감마 분비 세포	
바이러스학적 평가	PRRS 바이러스 항원 정량분석	
병리학적 평가	간질성 폐렴 육안 및 조직 폐렴 병변 분석	

5. 임상학적 평가

(1) 임상증상 평가

임상증상 관찰은 매일 이루어지며 체온, 임상증상 스코어를 기록한다. 임상증상은 호흡기 증상, 운동성 및 외모평가 등을 기록한다. 호흡기 증상은 기침, 호흡이상 등을 기준으로 0(정상) ~ 6(폐사)로 기록한다. 운동성은 0 ~ 4점으로 점수를 부여하며, 외모평가는 1 ~ 5점까지 부여하여 1점은 매우 마름, 3점은 정상, 5점은 고도비만으로 표기한다. 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 체온을 측정한다.

(2) 호흡기 증상

① 호흡기 증상 관찰 일정

호흡기 증상은 모든 계대의 돼지에서 매일 측정하여 기록하였다.

② 호흡기 증상 관찰 결과

모든 계대의 돼지에서 관찰한 호흡기 증상 결과는 주간단위로 21일령(접종), 28일령, 35일령, 42일령(접종 21일후), 49일령, 56일령, 63일령(접종 42일후)의 평균 호흡기 증상 결과를 기술하였다. 분석결과 역계대 별로 임상 증상이 관찰되지 않았다. 또한 역계대 사이에 임상증상의 유의성은 관찰되지 않았다.

표 42. 역계대 그룹별 호흡기 증상 결과

일령	역계대 그룹별 호흡기 증상 결과 (평균±표준편차)			
	P1	P2	P3	P4
21일령 (접종)	1.20±0.45	1.20±0.45	1.20±0.45	1.00±0.71
28일령 (접종 7일후)	0.60±0.55	0.40±0.55	0.20±0.45	0.40±0.55
35일령 (접종 14일후)	0.40±0.55	0.60±0.55	0.40±0.55	0.40±0.55
42일령 (접종 21일후)	0.20±0.45	0.60±0.55	0.60±0.55	0.60±0.55

표 43. 역계대 그룹별 호흡기 증상 결과

일령	역계대 그룹별 호흡기 증상 결과 (평균±표준편차)			
	P5A	P5B	P5C	P5D
21일령 (접종)	0.80±0.45	0.40±0.55	1.40±0.55	0.67±0.58
28일령 (접종 7일후)	0.80±0.45	0.60±0.55	0.20±0.45	0.67±0.58
35일령 (접종 14일후)	0.80±0.45	0.40±0.55	0.40±0.55	0.67±0.58
42일령 (접종 21일후)	0.20±0.45	0.80±0.45	0.60±0.55	0.34±0.58
49일령 (접종 28일후)		0.60±0.55	0.40±0.55	
56일령 (접종 35일후)		0.20±0.45	0.80±0.45	
63일령 (접종 42일후)		0.20±0.45	0.40±0.55	

표 44. 역계대 그룹별 호흡기 증상 결과

일령	역계대 그룹별 호흡기 증상 결과 (평균±표준편차)			
	P5E	P5F	P5G	
21일령 (접종)	0.34±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	
28일령 (접종 7일 후)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	
35일령 (접종 14일 후)	0.67±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	
42일령 (접종 21일 후)	0.67±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	
49일령 (접종 28일 후)	0.34±0.58			
56일령 (접종 35일 후)	0.00±0.00			
63일령 (접종 42일 후)	0.34±0.58			

(3) 운동성 관찰

① 운동성 관찰 일정

운동성 관찰은 모든 계대의 돼지에서 매일 측정하여 기록하였다.

② 운동성 관찰 결과

모든 계대의 돼지에서 관찰한 운동성 관찰 결과는 주간단위로 21일령(접종), 28일령, 35일령, 42일령(접종 21일 후), 49일령, 56일령, 63일령(접종 42일 후)의 평균 운동성 관찰 결과를 기술하였다. 분석결과 역계대 별로 운동성은 정상으로 활발하였으며, 역계대 사이에 운동성의 유의성은 관찰되지 않았다.

표 45. 역계대 그룹별 운동성 관찰 결과

일령	역계대 그룹별 운동성 관찰 결과 (평균±표준편차)			
	P1	P2	P3	P4
21일령 (접종)	2.60±0.55	2.40±0.55	2.60±0.55	2.40±0.55
28일령 (접종 7일 후)	3.20±0.45	3.60±0.55	3.40±0.55	3.40±0.55
35일령 (접종 14일 후)	3.60±0.55	3.60±0.55	3.60±0.55	4.00±0.00
42일령 (접종 21일 후)	3.60±0.55	3.60±0.55	3.40±0.55	3.20±0.45

표 46. 역계대 그룹별 운동성 관찰 결과

일령	역계대 그룹별 운동성 관찰 결과 (평균±표준편차)			
	P5A	P5B	P5C	P5D
21일령 (접종)	3.00±0.00	2.80±0.45	2.40±0.55	2.34±0.58
28일령 (접종 7일 후)	3.60±0.55	3.20±0.45	3.40±0.55	3.67±0.58
35일령 (접종 14일 후)	3.40±0.55	3.40±0.55	3.80±0.45	3.67±0.58
42일령 (접종 21일 후)	3.60±0.55	3.40±0.55	3.40±0.55	3.34±0.58
49일령 (접종 28일 후)		4.00±0.00	3.20±0.45	
56일령 (접종 35일 후)		3.00±0.00	3.80±0.45	
63일령 (접종 42일 후)		3.40±0.55	3.40±0.55	

표 47. 역계대 그룹별 운동성 관찰 결과

일령	역계대 그룹별 운동성 관찰 결과 (평균±표준편차)			
	P5E	P5F	P5G	
21일령 (접종)	2.34±0.58	3.50±0.71	3.50±0.71	
28일령 (접종 7일 후)	3.67±0.58	3.50±0.71	3.50±0.71	
35일령 (접종 14일 후)	4.00±0.00	3.50±0.71	3.50±0.71	
42일령 (접종 21일 후)	3.34±0.58	3.00±0.00	4.00±0.00	
49일령 (접종 28일 후)	3.67±0.58			
56일령 (접종 35일 후)	3.34±0.58			
63일령 (접종 42일 후)	3.34±0.58			

(4) 외모 관찰

① 외모 관찰 일정

외모 관찰은 모든 계대의 돼지에서 매일 측정하여 기록하였다.

② 외모 관찰 결과

모든 계대의 돼지에서 관찰한 외모 관찰 결과는 주간단위로 21일령(접종), 28일령, 35일령, 42일령(접종 21일 후), 49일령, 56일령, 63일령(접종 42일 후)의 평균 외모 관찰 결과를 기술하였다. 분석결과 역계대 별로 외모는 정상이었으며, 역계대 사이에 외모의 유의성은 관찰되지 않았다.

표 48. 역계대 그룹별 외모 관찰 결과

일령	역계대 그룹별 외모 관찰 결과 (평균±표준편차)			
	P1	P2	P3	P4
21일령 (접종)	2.60±0.55	3.00±0.00	2.60±0.55	3.20±0.45
28일령 (접종 7일 후)	2.80±0.45	2.80±0.45	2.40±0.55	3.20±0.45
35일령 (접종 14일 후)	2.60±0.55	2.80±0.45	2.60±0.55	3.20±0.45
42일령 (접종 21일 후)	3.00±0.00	2.80±0.45	2.80±0.45	3.40±0.89

표 49. 역계대 그룹별 외모 관찰 결과

일령	역계대 그룹별 외모 관찰 결과 (평균±표준편차)			
	P5A	P5B	P5C	P5D
21일령 (접종)	2.60±0.55	2.60±0.55	2.60±0.55	3.00±0.00
28일령 (접종 7일 후)	2.60±0.55	2.80±0.45	2.80±0.45	2.67±0.58
35일령 (접종 14일 후)	3.20±0.45	2.80±0.45	3.00±0.00	3.00±0.00
42일령 (접종 21일 후)	2.60±0.55	2.80±0.45	2.80±0.45	2.67±0.58
49일령 (접종 28일 후)		2.80±0.45	3.00±0.71	
56일령 (접종 35일 후)		3.00±0.00	2.80±0.45	
63일령 (접종 42일 후)		2.80±0.45	2.80±0.45	

표 50. 역계대 그룹별 외모 관찰 결과

일령	역계대 그룹별 외모 관찰 결과 (평균±표준편차)			
	P5E	P5F	P5G	
21일령 (접종)	3.00±0.00	2.50±0.71	2.50±0.71	
28일령 (접종 7일 후)	3.00±0.00	2.50±0.71	3.00±0.00	
35일령 (접종 14일 후)	3.00±0.00	3.00±0.00	3.50±0.71	
42일령 (접종 21일 후)	3.00±0.00	3.00±0.00	2.50±0.71	
49일령 (접종 28일 후)	2.67±0.58			
56일령 (접종 35일 후)	2.67±0.58			
63일령 (접종 42일 후)	3.00±1.00			

(5) 체온 측정

① 체온 측정 일정

접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 체온을 측정하였다.

② 체온 측정 결과

분석결과 역계대 별로 체온은 정상이었으며, 역계대 사이에 체온의 유의성은 관찰되지 않았다.

표 51. 역계대 그룹별 체온 측정 결과

접종 후	역계대 그룹별 체온 측정 결과 (평균±표준편차)			
	P1	P2	P3	P4
30분	38.92±0.31	38.86±0.32	38.74±0.23	38.84±0.24
1시간	38.76±0.36	38.80±0.25	39.02±0.25	38.88±0.33
2시간	38.62±0.22	38.86±0.27	39.06±0.17	38.72±0.13
4시간	38.90±0.32	38.70±0.29	38.74±0.32	38.94±0.21
8시간	38.68±0.36	39.02±0.16	38.86±0.29	38.86±0.23
12시간	38.90±0.25	38.96±0.22	38.68±0.32	38.74±0.35
24시간	38.74±0.27	38.76±0.30	38.88±0.27	38.98±0.25

표 52. 역계대 그룹별 체온 측정 결과

접종 후	역계대 그룹별 체온 측정 결과 (평균±표준편차)			
	P5A	P5B	P5C	P5D
30분	38.84±0.29	38.82±0.30	39.06±0.27	38.87±0.35
1시간	38.98±0.31	39.02±0.26	38.92±0.22	38.87±0.38
2시간	39.04±0.28	38.84±0.26	38.80±0.23	39.03±0.06
4시간	38.72±0.22	38.90±0.25	38.74±0.32	38.77±0.25
8시간	39.12±0.13	38.84±0.30	38.76±0.30	39.13±0.15
12시간	38.92±0.36	39.14±0.18	38.84±0.25	39.07±0.25
24시간	38.80±0.20	38.98±0.30	38.88±0.13	39.13±0.15

표 53. 역계대 그룹별 체온 측정 결과

일령	역계대 그룹별 체온 측정 결과 (평균±표준편차)		
	P5E	P5F	P5G
30분	38.90±0.10	38.90±0.57	38.85±0.21
1시간	39.00±0.26	38.85±0.35	38.55±0.07
2시간	38.83±0.29	38.75±0.35	39.10±0.14
4시간	38.80±0.10	38.85±0.07	38.65±0.21
8시간	38.77±0.15	39.05±0.35	38.60±0.14
12시간	38.93±0.20	38.80±0.28	38.65±0.07
24시간	38.80±0.30	38.55±0.07	39.05±0.35

(6) 체중 측정

① 체중 측정 일정

체중은 모든 계대의 돼지에서 매일 측정하여 기록하였다.

② 체중 측정 결과

모든 계대의 돼지에서 측정한 체중은 별주간단위로 21일령(접종), 28일령, 35일령, 42일령(접종 21일 후), 49일령, 56일령, 63일령(접종 42일후)의 평균 체중을 기술하였다. 분석결과 역계대 사이에 체온의 유의성은 관찰되지 않았다.

표 54. 역계대 그룹별 체중

일령	역계대 그룹별 체중 (평균±표준편차)			
	P1	P2	P3	P4
21일령 (접종)	5.30±0.20	5.54±0.15	5.18±0.16	5.42±0.13
28일령 (접종 7일 후)	6.66±0.15	6.64±0.24	6.34±0.18	6.68±0.16
35일령 (접종 14일 후)	8.06±0.15	8.00±0.21	7.76±0.15	7.92±0.15
42일령 (접종 21일 후)	9.50±0.14	9.48±0.25	9.34±0.17	9.52±0.48

표 55. 역계대 그룹별 체중

일령	역계대 그룹별 체중 (평균±표준편차)			
	P5A	P5B	P5C	P5D
21일령 (접종)	5.28±0.22	5.26±0.19	5.22±0.11	5.27±0.21
28일령 (접종 7일 후)	6.42±0.19	6.42±0.20	6.40±0.14	6.43±0.15
35일령 (접종 14일 후)	7.78±0.19	7.78±0.19	7.80±0.10	7.80±0.17
42일령 (접종 21일 후)	9.42±0.19	9.46±0.23	9.42±0.16	9.37±0.21
49일령 (접종 28일 후)		12.58±0.25	12.40±0.65	
56일령 (접종 35일 후)		16.64±0.30	16.60±0.45	
63일령 (접종 42일 후)		20.60±0.34	20.32±0.54	

표 56. 역계대 그룹별 체중

일령	역계대 그룹별 체중 (평균±표준편차)			
	P5E	P5F	P5G	
21일령 (접종)	5.26±0.06	5.25±0.21	5.15±0.07	
28일령 (접종 7일 후)	6.47±0.06	6.45±0.21	6.40±0.14	
35일령 (접종 14일 후)	7.80±0.10	7.80±0.14	7.75±0.07	
42일령 (접종 21일 후)	9.40±0.10	9.45±0.21	9.35±0.21	
49일령 (접종 28일 후)	12.03±0.25			
56일령 (접종 35일 후)	16.73±0.21			
63일령 (접종 42일 후)	20.86±0.35			

6. 바이러스학적 평가

(1) 샘플 채취

① 혈액 채취

P1, P2, P3, P4, P5A 군에서 접종 후 7일과 14일에 채혈한 혈청으로 실시간 중합 효소 연쇄반응을 통하여 바이러스 검출 및 역가 측정을 실시하였다.

② 폐장 채취

총 17마리의 돼지(P1, P5A, P5D, P5F, P5G) 폐의 조직으로부터 실시간 중합 효소 연쇄반응을 통하여 바이러스 검출 및 역가 측정을 실시하였다.

(2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다. ORF7의 172bp(GenBank Accession: SNU090690/851)을 확인하기 위한 Primer 쌍 (전방향: 5'-TGTGCCAGATGCTGGGTAAGATCA, 역방향: 5'-ATTGACGACAGACACAATTGCCGC)을 이용하여 PCR을 수행한다(T_m : 60°C). 증폭된 PCR product를 cloning vector (TOPcloner™ TA kit, Enzymomics)에 삽입하고 10^8 에서 10^1 개/mL 로 10^{-1} 씩 단계별로 희석한 후, 위의 primer를 이용하여 real time PCR을 수행하여 standard curve를 측정한다. 시료에서 추출된 DNA 1.0 μ l를 주형으로, 2x SYBR green reaction mix (Applied Biosystems) 10 μ l, primers 0.5 μ M, 증류수 8.5 μ l 와 혼합하여 최종 20 μ l로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 다시 60°C에서 30초간 총 40회 반복하여 반응시킨다. 모든 반응이 끝난 후 60°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선(dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준커브(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/mL를 산정한다.

(3) 혈액 PRRS 바이러스 항원 수준

역계대별 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준은 접종 7일령에서는 유의성이 없었다. 접종 14일령에서는 역계대 P1와 P2가 P5A보다 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준은 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다. 또한 접종 14일령에서는 역계대 P1, P2, P3, P4에서 유의성이 없었다.

표 57. 혈액 PRRS 바이러스 항원 수준

접종 후	혈액 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)				
	P1	P2	P3	P4	P5A
7일	2.59±0.46	2.57±0.13	2.22±0.24	2.00±0.34	2.25±0.30
14일	3.84±0.24 ^a	3.58±0.45 ^a	3.22±0.57 ^{ab}	2.99±0.62 ^{ab}	2.59±0.39 ^b

a,b: 유의성 의미

(4) 폐장 조직 PRRS 바이러스 항원 수준

역계대별 폐장 조직 PRRS 바이러스 항원수준의 유의성은 없었다.

표 58. 폐장 조직 PRRS 바이러스 항원 수준

접종 후	폐장 조직 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)				
	P1	P5A	P5D	P5F	P5G
21일	2.73±0.39	3.02±0.86	2.48±0.67	1.84±1.09	1.70±0.51

7. 면역학적 평가

(1) 혈액 채취 시가

P5B, P5C, P5E 그룹에서 접종 후 0, 7, 14, 21, 28, 42 일에 채혈하였다.

(2) PRRS 바이러스 IgG 항체

① PRRS 바이러스 IgG 항체 역가 측정 검사방법

검사할 혈청을 1:40 으로 희석하여 상업화된 ELISA (HerdChek PRRS, IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, ME, USA) 키트의 PRRS well과 NHC well에 각각 100 μ l씩 분주하고, 양성 대조군 및 음성 대조군 샘플을 각각 2개의 PRRS well과 2개의 NHC well, 총 4개의 well에 100 μ l씩 분주한다. 검사할 각 well을 필름으로 덮고, 실온(18~25°C)에서 30분 동안 보관하여 반응 시킨 후 세척액을 이용하여 5회 반복하여 세척한다. Anti-porcine:HRPO conjugate 용액을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온(18~25°C)에서 30분 동안 보관한다. 각 well을 동일하게 세척한 후 발색제(TMB substrate solution)를 100 μ l씩 분주하고 빛을 차단하여 실온(18~25°C)에서 15분간 반응 시킨다. 반응 중지 용액을 100 μ l씩 분주하여 반응을 멈추고 650 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정한다. NHC well의 양성 대조군의 OD 평균값이 0.120 이하, NHC well의 음성 대조군의 OD 평균값이 0.250 이하 일 때 유효한 값으로 간주하며, 검사 혈청의 S/P ratio가 0.4 미만인 경우 음성으로, 0.4 이상인 경우 양성으로 판정한다.

② PRRS 바이러스 IgG 항체 역가 측정 결과 통계 분석 방법

ELISA 항체가의 경우 보통 S/P 비율이나 titer 값을 분석에 이용한다. 일반적으로 측정값이 정규분포를 이루기 때문에 분산분석(ANOVA)을 통하여 전체적인 시험군 사이의 유의성 여부를 확인하고, 만약 시험군 사이에 유의성이 있으면 사후 검정으로 Tukey 방법을 이용하여 각 시험군 사이의 유의적인 차이를 정확히 분석한다. ELISA IgG 항체가 이용에 응집반응 또는 혈구응집반응 등을 이용한 항체수치도 모두 이러한 방법을 이용하여 통계학적 분석을 시행한다.

③ PRRS 바이러스 IgG 항체 수준

역계대 P5B, P5C, P5E에서 접종 후 0일, 7일, 14일, 21일, 28일, 42일에서 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준은 유의성이 없었다.

표 59. PRRS 바이러스 IgG 항체 수준

접종 후	PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차) (ELISA 판정 기준; 양성: ≥ 0.40 , 음성: < 0.40)			
	P5B	P5C	P5E	
0일	0.03±0.05	0.05±0.07	0.03±0.04	
7일	0.17±0.03	0.18±0.04	0.16±0.04	
14일	0.47±0.05	0.50±0.04	0.45±0.06	
21일	0.79±0.14	0.74±0.14	0.66±0.05	
28일	0.92±0.18	0.98±0.14	0.82±0.12	
42일	1.26±0.24	1.31±0.19	1.03±0.08	

(3) PRRS 바이러스 중화항체

① PRRS 바이러스 중화항체 역가 측정 검사방법

PRRS 중화항체 역가 측정 검사방법은 기존의 방법에 준하여 실시한다. 모든 혈청 sample을 검사 시작 전에 45분 동안 56°C에서 heat inactivation시킨다. Inactivation되어 있는 혈청을 RPMI 1640 배지(10% FCS, 20 mM L-glutamine, antibiotic-antimycotic mixture-100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL

streptomycin, 50µg/mL gentamycin, 0.25 mg/mL amphotericin B)와 2배 씩 차례로 희석시킨다. 그리고 각각의 희석된 혈청을 100 µl 씩, 미리 준비된 10³ TCID 50/mL 100 µl와 섞어 37°C에서 한 시간 동안 incubation 시킨 후 전날 미리 배양해 둔 monolayer 상태의 Marc-145 cell에 접종한다. 37°C에서 한 시간 배양한 후 모든 접종액은 제거한다. 그리고 RPMI 배양액 200 µl로 대체한다. 37°C에서 배양하면서 매일 cytopathic effect (CPE)를 확인한다. 5일 간 배양한 후 각 well 의 CPE를 확인한다. CPE가 없는 well은 SDOW 17 항체를 이용한 염색을 통해 바이러스의 성장을 확인한다. 중화항체 역가(titer)는 바이러스의 성장의 징후가 전혀 없는 가장 높은 희석배수의 역수를 산출한다.

② PRRS 바이러스 중화항체 역가 측정 결과 통계 분석 방법

ELISA 항체가의 경우 보통 S/P 비율이나 titer 값을 분석에 이용한다. 일반적으로 측정값이 정규분포를 이루기 때문에 분산분석(ANOVA)을 통하여 전체적인 시험군 사이의 유의성 여부를 확인하고, 만약 시험군 사이에 유의성이 있으면 사후 검정으로 Tukey 방법을 이용하여 각 시험군 사이의 유의적인 차이를 정확히 분석한다. ELISA IgG 항체가 이용에 응집반응 또는 혈구응집반응 등을 이용한 항체수치도 모두 이러한 방법을 이용하여 통계학적 분석을 시행한다.

③ PRRS 바이러스 중화항체 수준

역계대 P5B, P5C, P5E에서 접종 후 0일, 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일에서 PRRS 바이러스 중화항체는 검출되지 않았다.

표 60. PRRS 바이러스 중화항체 수준

접종 후	PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (중화항체 판정 기준; 양성: ≥2.00, 음성: <2.00)		
	P5B	P5C	P5E
0일	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7일	0.20±0.45	0.00±0.00	0.00±0.00
14일	0.20±0.45	0.00±0.00	0.00±0.00
21일	0.00±0.00	0.20±0.45	0.00±0.00
28일	0.80±1.10	1.00±1.00	0.33±0.58
42일	1.20±0.84	1.40±0.89	0.33±0.58

(4) PRRS 바이러스 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정

① 말초혈액 단핵구와 공배양한 바이러스

말초혈액 단핵구와 공배양한 바이러스는 공격접종에 사용한 북미형 PRRS 바이러스 strain SNUVR090851 (GenBank no. JN315685)를 사용한다.

② 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 HBSS에 희석한다. 희석한 혈액 4.0 mL를 15 mL tube에 준비한 Ficoll-Paque 3.0 mL 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나누게 한다. 18~20°C에서 400 g 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫으로 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

③ INF-γ 분비 세포 수 측정

PRRS 바이러스의 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시한다

[7]. 분리된 말초혈액 단핵구를 PRRS 바이러스 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA) 에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1×10^7 cell/mL의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1×10^6 cell/mL 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 PRRS 바이러스 항원 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μl 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBST로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μl 씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μl 씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

④ PRRS 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 통계분석 방법

일반적으로 인터페론-감마-분비세포는 전체 $10^5 \sim 10^6$ 개의 세포 중에서 인터페론-감마-분비세포의 개수를 측정하여 분석에 이용한다. 측정값이 정규 분포를 이루기 때문에 분산분석(ANOVA)을 통하여 전체적인 시험군 사이의 유의성 여부를 확인하고, 만약 시험군 사이에 유의성이 있으면 사후 검정으로 Tukey 방법을 이용하여 각각의 시험군 사이의 유의적인 차이를 정확히 분석한다.

⑤ PRRS 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 분석 결과

역계대 P5B, P5C, P5E에서 접종 후 0일, 7일, 14일, 21일, 28일, 35일, 42일에서 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준은 유의성이 없었다.

표 61. PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준

접종 후	PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)			
	P5B	P5C	P5E	
0일	11.60±5.46	13.00±4.06	6.00±2.65	
7일	10.40±3.91	8.00±5.43	8.67±3.06	
14일	15.40±5.03	13.20±4.76	10.00±5.57	
21일	16.40±5.50	15.00±2.74	16.00±3.61	
28일	24.20±2.95	23.80±1.79	20.67±4.16	
42일	32.80±4.71	27.40±1.95	30.00±4.58	

8. 병리학적 평가

(1) 관찰 대상 그룹

총 17마리의 돼지(P1, P5A, P5D, P5F, P5G) 폐의 조직을 검사하였다.

(2) 육안 폐렴 병변 평가

① 육안 폐렴 병변 분석

부검을 실시하여 폐장의 육안병변 정도를 이미 발표되어 있는 방법을 이용하여 분석한다. 아래 그림과 같이 전체 폐장을 100으로 하여 각각의 엽마다의 부피를 근거로 각각의 점수를 배분 한 후에 각각의 폐장의 육안 병변 여부를 분석한다.

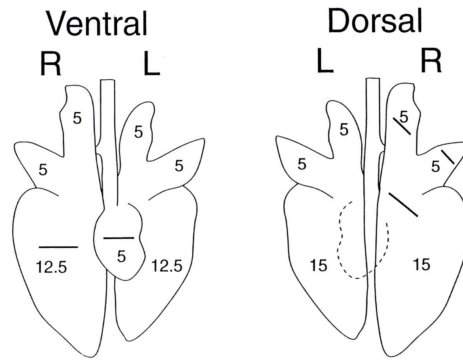


그림 16. 폐장의 엽단위의 점수

② 육안 폐렴 병변 분석 결과

역계대 P1, P5A, P5D, P5F, P5G에서 접종 후 21일에서 육안 폐렴 병변은 유의성이 없었다.

표 62. 육안 폐렴 병변

접종 후	육안 폐렴 병변 (평균±표준편차) (병변 스코아 범위: 0~100)				
	P1	P5A	P5D	P5F	P5G
21일	4.20±2.39	4.40±2.61	3.33±4.04	1.50±2.12	1.00±1.41

(2) 병리조직학적 분석

① 샘플처리

처치군에서 접종한 바이러스의 병원성 발현여부를 파악하기 위해 병리조직학적 분석을 실시한다. 포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다.

② 병리조직학적 폐렴 병변 분석 방법

폐장에서의 간질성 폐렴(interstitial pneumonia)의 정도는 이미 발표된 논문에 의거하여 병변이 없으면 0점, 경미한 간질성 폐렴(mild interstitial pneumonia)은 1점, 중간정도 다발성 간질성 폐렴(moderate multifocal interstitial pneumonia)은 2점, 중간정도 미만성 간질성 폐렴(moderate diffuse interstitial pneumonia)은 3점, 매우 심한 간질성 폐렴(severe interstitial pneumonia)는 4점으로 구분하여 표시한다.

③ 병리조직학적 폐렴 병변 분석 결과 통계 분석

병리조직학적 병변의 경우에는 병변의 종류 및 정도에 따라서 개체별로 점수를 부여하기 때문에 비모수 통계 분석 방법을 이용하는 것이 타당하다. 통계분석은 먼저 Kruskal-Wallis 방법을 통하여 각각의 그룹 사이의 유의성 여부를 분석하여 유의성이 나타나면 사후 검정 분석으로는 Mann-Whitney 방법을 이용한다.

④ 병리조직학적 폐렴 병변 분석 결과

역계대 P1, P5A, P5D, P5F, P5G에서 접종 후 21일에서 병리조직학적 폐렴 병변은 유의성이 없었다.

표 63. 병리조직학적 폐렴 병변

접종 후	병리조직학적 폐렴 병변 (평균±표준편차) (병변 스코아 범위: 0~4)				
	P1	P5A	P5D	P5F	P5G
21일	0.64±0.30	0.48±0.41	0.47±0.12	0.00±0.00	0.00±0.00

9. 유전자 염기서열 분석 평가

(1) 분석 평가 방법

계대별로(P1, P2, P3, P4, P5A) 접종 7일 후에 채혈하여 각 군별로 혈청을 합친다(pooling). Plaque assays를 실시하여 각 계대 군 별로 15개의 plaque를 선별하였다. 이후, cell culture를 통해 증폭시킨 후 ORF5와 NSP2 유전자의 염기를 분석하였다.

(2) ORF5 유전자 분석 방법

① 중합효소 연쇄반응을 통한 ORF5 유전자 분석 방법

이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신주의 유전자를 추출하여 reverse transcription을 진행하였다. 이 뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신주의 ORF5의 nucleotide sequence 분석을 위해 여러 개의 전방향, 역방향 프라이머를 백신주 ORF5를 참고하여 프라이머 디자인 프로그램(NCBI Primer-BLAST)을 통해 디자인하였다. 이들 프라이머로 PCR을 수행하여 아가로오스겔에 전기영동 한 다음 nucleotide sequence 분석이 가능한 프라이머 조합을 확인하였다. 실험에 사용한 프라이머는 이미 염기서열이 보고된 VR2332 (US Strain, Genbank accession number. EF536003)를 참고하였으며 정방향 프라이머(5': CATGTCAAGGAG TTTACCCAAC), 역방향 프라이머(5': ATCACTGGCGTGTAGGTAATAGA)(Tm : 60℃)를 사용하였다. (주)바이오팩트(Biofact)에 PCR 산물의 nucleotide sequence 분석을 의뢰하였고 결과를 받아 BioEdit Sequence Alignment Editor 프로그램을 이용해 비교하였다.

② 중합효소 연쇄반응을 통한 ORF5 유전자 분석 결과

계대별로(P1, P2, P3, P4, P5A) 접종 7일 후에 채혈하여 선별된 바이러스를 세포 배양을 통해서 증폭한 후에 유전자 분석을 실시한 결과 5대에 걸친 역계대에서 ORF5의 nucleotide sequence의 변화가 없었다. 분석 결과 ORF5의 nucleotide sequence은 아래와 같았다.

```

1  atgttgggga aatgctgac cgcggttgt tgctcgcaat cgctttttt gtggtgtatc
61  gtgccgttct gttttgctgc gctcgcaac gccagcaaca acagcagctc ccatttacag
121  ttgattata acttgacgat atgcgagctg aatggcacag actggctagc ggcaaggttt
181  gactgggcag tggaaacttt cgttatcttt cctgtgctga ctcacattgt ttctatggc
241  gccctacca ccagccactt cctcgacacg gttggcctag tcaccgtgtc caccgccgga
301  tattaccatg ggcggtatgt cttgagtagc atctatgctg ttgcgccctt ggctgcgtta
361  acttgctttg ccattaggtt gataaaaaac tgtatgtcct ggcgctactc gtgtactaga
421  tacactaact tccttttggg caccaagggc agactctatc gctggcgatc accagtcac
481  atagagaaag gggtaaggt tgaggtcgga ggtcacctga tcgacctcaa aagagtcgtg
541  cttgatggct ccgcggaac cctgtaac aaagtttcgg cggaacaatg gggtcgtccc
601  tag
    
```

(3) NSP2 유전자 분석 방법

① 중합효소 연쇄반응을 통한 NSP2 유전자 분석 방법

이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신주의 유전자를 추출하여 reverse transcription을 진행하였다. 이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신주의 NSP2의 nucleotide sequence 분석을 위해 여러 개의 전방향, 역방향 프라이머를 백신주 ORF5를 참고하여 프라이머 디자인 프로그램(NCBI Primer-BLAST)을 통해 디자인하였다. 이들 프라이머로 PCR을 수행하여 아가로오스겔에 전기영동 한 다음 nucleotide sequence 분석이 가능한 프라이머 조합을 확인하였다. 실험에 사용한 프라이머는 이미 염기서열이 보고된 VR2332 (US Strain, Genbank accession number. EF536003)를 참고하였으며 정방향 프라이머(5': GTGATTGAGGACTGCTGCT GTTC), 역방향 프라이머(5': GAGCTGAGTATTTTGGGCGTG) (Tm : 58.5°C)를 사용하였다. (주)바이오팩트(BioFact)에 PCR 산물의 nucleotide sequence 분석을 의뢰하였고 결과를 받아 BioEdit Sequence Alignment Editor 프로그램을 이용해 비교하였다.

② 중합효소 연쇄반응을 통한 NSP2 유전자 분석 결과

계대별로(P1, P2, P3, P4, P5A) 접종 7일후에 채혈하여 선별된 바이러스를 세포 배양을 통해서 증폭한 후에 유전자 분석을 실시한 결과 5대에 걸친 역계대에서 NSP2의 nucleotide sequence의 변화가 없었다. 분석 결과 NSP2의 nucleotide sequence은 아래와 같았다.

```
1 atgcttgatc aggctcgaga aagctcgccc gccaaagcgca ttagacacct cctttgattg
61 ggatgttgta ctccctgggtg ttggggcggc tgctcaaaca acaaaactgt ccctcaccaa
121 tcagtgtcac gctccagtca ccgttggtgc tcaaaggctt cgcgccgaag ttctgcctcg
181 aaaaacgaag tctgttaaga gctaccgga gagcaggcct ctccccacc cccgcagaag
241 gactagatcc agctgtggta gtccgatttc atcaggtagc aattcccctg acggctggga
301 aggcttgccc ggaagttctc ttgattttcc aaccttgctt gagtctgtga cacatttgag
361 taggcctgtg cccgtcccctg caccgcgagg ggccgtgtcc caattagtgt catcaccggc
421 agtgtcgacc cctgtgcca caccacgaca taagtttcgg caggtggagg gaacaaattt
481 aacagcagtt atcccagcag ctcaggacga gctcctcgat ttgtctgcat cctcacagac
541 tgaatatgag gcttccccct tggcattacc gcagggtgag aatgttctgg cgggtggagag
601 acgagaagct gaggataccc tgagtgaaat ctcgagtatg tcagaaggcg tcagatcggc
661 gcccgcatta tcaagcagct ccctgtcaag cgtggagatc acacgcccaa aactctcagc
```

다. PRRS-M 사독 백신 야외임상시험 결과

(전반부: 3주령~16주령/ 후반부: 16주령~25주령)

1. 목적

목적 동물에 대한 확대 시험을 통한 안전성 확보와 효과 검증을 위해 야외 임상 시험을 실시하였다. 주요 검증 포인트는 다음과 같다.

- (가) 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무
- (나) 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간에 임상 증상발현 비율 차이
- (다) 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석

2. 임상 시험 농장 선정

(1) 임상 시험 농장 PRRS 질병 상황

① 시험농장 A (흙선)

a. 농장 자돈 백신 프로그램

2주령에 PRRS 백신, 3주령에 마이코플라즈마백신 및 써코백신, 7주령에 돼지단콜 백신, 8주령과 12주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 A는 2020년 2월14일경에 농장의 7주령 전후의 자돈에서 호흡기를 동반한 위축이 발병하여 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 폐장과 림프절에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 연쇄상구균도 폐장에서 분리되었다. 또한 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변이 관찰되었다.

c. 관리체계

시험농장 A는 자돈사 4동, 비육사 6동이 있어서 야외임상 실험을 할 때에 자돈사 1동과 비육사 1동을 선정하여 실시한다. 또한 각각 1개동의 자돈사와 비육사에서 6개의 돈방을 설정하여 백신군, 대조군을 같은 숫자로 임의로 혼합 사육한다.

② 시험농장 B (대진)

a. 농장 자돈 백신 프로그램

2주령에 PRRS 백신, 3주령에 써코백신과 마이코플라즈마 백신, 8주령에 돼지열병 백신, 8주령과 12주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 B는 2020년 2월 14일경에 농장의 6-8주령 사이의 자돈에서 호흡기를 동반한 위축이 발병하여 2두를 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 2두 모두에서 폐장과 림프절에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 글레서씨병을 유발하는 헤모필러스균도 폐장에서 분리되었다. 또한 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변이 관찰되었다.

c. 관리체계

시험농장 B는 자돈사 2동, 육성/비육사 2동이 있어서 야외임상 실험을 할 때에 자돈사 1동과 비육사 1동을 선정하여 실시한다. 또한 각각 1개동의 자돈사와 비육사에서 6개의 돈방을 설정하여 백신군과 대조군을 같은 숫자로 임의로 혼합 사육한다.

③ 시험농장 C (장미)

a. 농장 자돈 백신 프로그램

1주령에 마이코플라즈마백신, 3주령에 써코백신, 8주령에 돼지열병 백신, 8주령과 10주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 C는 2020년 5월 6일경에 이유자돈의 위축으로 인하여 부검장기인 폐장과 비장을 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 폐장에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 비장에서는 살모넬라균이 분리되었다. 또한 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변이 관찰되었다.

c. 관리체계

시험농장 C는 자돈사 2동, 육성/비육사 4동이 있어서 야외임상 실험을 할 때에 자돈사 1동와 비육사 1동을 선정하여 실시한다. 또한 각각 1개동의 자돈사와 비육사에서 6개의 돈방을 설정하여 백신군과 대조군을 같은 숫자로 임의로 혼합 사육한다.

3. 공시동물

선정된 시험농장 3곳에서 각각 40두를 선정하여 백신군 20두, 대조군에 20두를 선정하였다.

4. 백신 접종

선정된 3개 농장의 백신군에게 3주령과 6주령에 2회 2.0 ml씩 이근부에 근육 접종하였다. 백신군에 접종하고 남은 백신은 서울대학교 수의과대학 병리학 실험실로 즉시 가져와서 멸균 처리 후 폐기하였다.

5. 평가 항목

백신은 임상, 면역학적, 미생물학적, 병리학적 평가 등 4가지 항목에 관하여 평가하였다. 각각의 평가 항목에 대한 백신의 검사법을 실시하였다.

표 64. 야외임상시험의 평가 항목

평가 항목	검사법	비고
임상 평가	임상증상 관찰	
	체중 및 일당 증체량 측정	
면역학적 평가	PPRSV 항체 검사(ELISA)	
	유럽형 PPRSV 중화항체 검사	
	북미형 PPRSV 중화항체 검사	
	유럽형 PPRSV-인터페론-감마 분비세포	
	북미형 PPRSV-인터페론-감마 분비세포	
미생물학적 평가	혈중 유럽형 PPRSV 항원 수준 분석	
	혈중 북미형 PPRSV 항원 수준 분석	
병리학적 평가	PPRSV에 의한 육안 폐렴 병변 분석	
	PPRSV에 의한 병리조직 폐렴 병변 분석	
	폐장 PPRSV 항원 수준 분석	

6. 백신 안전성 검사

(1) 직장 체온 모니터링

① 직장 체온 모니터링 시기

21일령 자돈에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일간 직장에서 체온을 측정한다. 또한 42일령 자돈에 2차 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일간 직장에서 체온을 측정한다.

② 체온 통계학적 분석

1차 또는 2차 백신 접종 후에 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 직장 체온을 비교하였다. 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ 1차 접종 A농장 체온 변화

A농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 65. 1차 접종 A농장 체온 변화

시간/일령	1차 접종 A농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.77±0.40	38.79±0.43
1시간	38.94±0.33	38.60±0.35
2시간	38.65±0.38	38.52±0.41
4시간	38.55±0.36	38.76±0.47
8시간	38.76±0.44	38.60±0.40
1일	38.52±0.45	38.65±0.42
2일	38.78±0.45	38.60±0.48
3일	38.78±0.38	38.62±0.44
4일	38.83±0.41	38.60±0.43
5일	38.80±0.38	38.66±0.37
6일	38.53±0.38	38.79±0.42
7일	38.79±0.37	38.67±0.39

④ 2차 접종 A농장 체온 변화

A농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 66. 2차 접종 A농장 체온 변화

시간/일령	2차 접종 A농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.62±0.26	38.48±0.31
1시간	38.40±0.29	38.58±0.30
2시간	38.59±0.29	38.59±0.41
4시간	38.57±0.31	38.47±0.30
8시간	38.55±0.31	38.60±0.35
1일	38.55±0.32	38.48±0.27
2일	38.70±0.35	38.58±0.36
3일	38.62±0.38	38.48±0.31
4일	38.59±0.29	38.70±0.33
5일	38.53±0.32	38.66±0.33
6일	38.48±0.34	38.56±0.27
7일	38.64±0.28	38.64±0.32

⑤ 1차 접종 B농장 체온 변화

B농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 67. 1차 접종 B농장 체온 변화

시간/일령	1차 접종 B농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.76±0.48	38.81±0.39
1시간	38.63±0.40	38.50±0.36
2시간	38.66±0.36	38.71±0.47
4시간	38.77±0.29	38.68±0.35
8시간	38.60±0.36	38.89±0.39
1일	38.53±0.41	38.72±0.46
2일	38.74±0.43	38.74±0.45
3일	38.82±0.46	38.71±0.51
4일	38.41±0.36	38.76±0.39
5일	38.56±0.44	38.73±0.38
6일	38.62±0.40	38.71±0.42
7일	38.88±0.40	38.52±0.42

⑥ 2차 접종 B농장 체온 변화

B농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 68. 2차 접종 B농장 체온 변화

시간/일령	2차 접종 B농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.54±0.24	38.60±0.33
1시간	38.64±0.33	38.50±0.33
2시간	38.52±0.36	38.46±0.35
4시간	38.66±0.32	38.60±0.31
8시간	38.54±0.30	38.52±0.32
1일	38.53±0.33	38.60±0.30
2일	38.51±0.31	38.66±0.25
3일	38.58±0.34	38.62±0.31
4일	38.49±0.29	38.59±0.25
5일	38.48±0.27	38.46±0.33
6일	38.44±0.28	38.61±0.32
7일	38.60±0.35	38.57±0.26

⑦ 1차 접종 C농장 체온 변화

C농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 69. 1차 접종 C농장 체온 변화

시간/일령	1차 접종 C농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.73±0.41	38.67±0.41
1시간	38.75±0.42	38.77±0.44
2시간	38.62±0.43	38.66±0.36
4시간	38.79±0.43	38.69±0.46
8시간	38.70±0.40	38.57±0.38
1일	38.75±0.35	38.79±0.43
2일	38.70±0.45	38.69±0.47
3일	38.71±0.42	38.51±0.34
4일	38.80±0.37	38.67±0.42
5일	38.65±0.40	38.78±0.39
6일	38.68±0.42	38.72±0.36
7일	38.77±0.48	38.70±0.48

⑧ 2차 접종 C농장 체온 변화

C농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 70. 2차 접종 C농장 체온 변화

시간/일령	2차 접종 C농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.64±0.33	38.41±0.29
1시간	38.62±0.35	38.46±0.32
2시간	38.52±0.37	38.63±0.32
4시간	38.66±0.32	38.44±0.31
8시간	38.67±0.27	38.61±0.30
1일	38.47±0.34	38.49±0.36
2일	38.42±0.27	38.67±0.30
3일	38.56±0.32	38.50±0.27
4일	38.64±0.35	38.50±0.31
5일	38.69±0.31	38.42±0.26
6일	38.56±0.34	38.57±0.28
7일	38.52±0.37	38.56±0.34

(2) 접종 부위 검사

① 접종 부위 검사 시기

21일령 자돈에 1차 백신을 접종한 후 1일부터 14일 동안은 매일 측정하고 접종 부위를 검사한다. 또한 42일령 자돈에 2차 백신을 접종한 후 1일부터 14일 동안은 매일 측정하고 접종 부위를 검사한다.

② 접종 부위 검사 평가 방법

접종 부위 검사는 다음과 같은 평가항목 및 방법으로 평가한 후 기록한다.

표 71. 접종 부위 평가 방법

평가항목	평가 방법			
	3점(심함)	2점(중간정도)	1점(경미)	0점
접종 부위 화농	직경 1 cm 이상 노란색 화농	직경 0.5~1 cm 노란색 화농	직경 0.5 cm 이하 노란색 화농	화농 없음
접종 부위 종창	직경 1 cm 이상 종창	직경 0.5~1 cm 종창	직경 0.5 cm 이하 종창	종창 없음
접종 부위 발적	직경 1 cm 이상 발적	직경 0.5~1 cm 발적	직경 0.5 cm 이하 발적	발적 없음

③ 1차 접종 A농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 9번에서 백신 접종 후 1일에 중간정도(2점)의 종창이, 2일에 경미(1점)한 종창이 관찰되었다. 또한 개체번호 15번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다. 대조군 개체번호 16번에서 PBS 접종 후 1일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 13번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 발적이 관찰되었다.

④ 2차 접종 A농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 13번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 중간정도(2점)의 종창이, 3일에 경미(1점)한 종창이 관찰되었다. 또한 개체번호 17번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다. 대조군 개체번호 9번에서 PBS 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 1번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 발적이 관찰되었다. 또한 개체번호 14번에서 백신 접종 후 1일에 경미한 발적이 관찰되었다. 대조군 개체번호 14번에서 PBS 접종 후 1일과 2일에 경미한 발적이 관찰되었다.

⑤ 1차 접종 B농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 9번과 17번에서 백신 접종 후 1일에 경미한 종창이 관찰되었다. 또한 대조군 개체번호 11번에서 PBS 접종 후 1일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 5번에서 백신 접종 후 1일 중간정도(2점)의 발적이, 2일과 3일에는 경미한 발적이 관찰되었다. 대조군 개체번호 10번에서는 PBS 접종 후 1일에서 경미한 발적이 관찰되었다.

⑥ 2차 접종 B농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 7번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다. 또한 백신군 개체번호 14번에서 백신 접종 후 1일과 3일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 7번과 16번에서 백신 접종 후 1일에 경미한 발적이 관찰되었다.

⑦ 1차 접종 C농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 7번에서 백신 접종 후 1일에 중간정도(2점)의 종창이, 2일과 3일에는 경미한 종창이 관찰되었다. 대조군 개체번호 8번에서는 PBS 접종 후 1일에서 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 8번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 발적이 관찰되었다.

⑧ 2차 접종 C농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 8번에서 백신 접종 후 1일, 2일과 3일에 경미한 종창이 관찰되었다. 백신군 개체번호 19번에서 백신 접종 후 1일에 경미한 종창이 관찰되었다. 대조군 개체번호 12번에서 PBS 접종 후 1일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군 개체번호 10번에서 백신 접종 후 1일, 2일과 3일에 경미한 발적이 관찰되었다.

(3) 안전성 검사

① 안전성 검사 시기

선정된 3개 농장에서 백신 안전성 검사를 실시한다. 안전성 시험은 21일령 자돈에 1차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 14일 동안 동일한 시간에 안전성 여부를 확인한다. 또한 42일령 자돈에 2차 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 14일 동안 동일한 시간에 안전성 여부를 확인한다.

② 안전성 검사 평가 방법

안전성 검사는 다음과 같은 평가항목 및 방법으로 평가한 후 기록한다.

표 72. 안전성 검사 평가 방법

평가항목	평가 방법		
	심합	중간정도	경미
설사	수양성 설사	연변 설사	정상과 근접
쇼크	옆으로 눕고 경련 동반	옆으로 눕고 혼수상태	옆으로 누워 있음
침울	머리를 내려뜨리고 한쪽으로 치우쳐 있음	돈군에서 떨어져서 한쪽으로 치우쳐 있음	돈군에서 뒤쳐져 있고 행동이 느림

③ 1차 백신 접종 A농장 안전성 검사 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

④ 2차 백신 접종 A농장 안전성 검사 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

⑤ 1차 백신 접종 B농장 안전성 검사 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

⑥ 2차 백신 접종 B농장 안전성 검사 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

⑦ 1차 접종 C농장 안전성 검사 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

⑧ 2차 접종 C농장 안전성 검사 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

7. 임상학적 평가

(1) 임상 증상

① 임상 증상 관찰 방법

시험이 시작되는 3주령에서부터 시험이 종료되는 25주령까지 2주에 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상증상을 수의사가 관찰하여 표 1에 있는 임상점수를 기입한다.

표 73. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	복식 호흡
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

② 임상 증상 통계학적 분석

3주령에서부터 시험이 종료되는 25주령까지 매주 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상증상을 비교하였다. 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다.

P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ A농장 임상 증상 변화

A농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령, 91일령, 98일령, 105일령, 112일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다. 또한 119일령, 126일령에도 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 74. A농장 임상 증상 변화

일령	A농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.65±0.49	0.40±0.50
28일령	0.20±0.41	0.35±0.49
35일령	0.45±0.51	0.60±0.50
42일령	0.55±0.51	0.90±0.72
49일령	0.60±0.50	0.85±0.67
56일령	0.95±0.89^a	1.80±0.89^b
63일령	1.20±0.83^a	2.30±1.08^b
70일령	1.15±0.81^a	2.65±1.18^b
77일령	1.20±0.77^a	2.55±1.28^b
84일령	1.10±1.33^a	2.30±1.08^b
91일령	0.84±0.69^a	2.40±1.31^b
98일령	0.74±0.56^a	2.11±1.15^b
105일령	0.58±0.61^a	1.72±1.13^b
112일령	0.68±0.48^a	1.50±0.79^b
119일령	0.71±0.47^a	1.31±0.63^b
126일령	1.00±0.68^a	1.62±0.51^b
133일령	0.71±0.47	1.08±0.86
140일령	0.79±0.70	1.08±0.86
147일령	0.79±0.58	1.23±0.60
154일령	0.86±0.86	1.15±0.80
161일령	0.64±0.63	0.85±0.69
168일령	0.50±0.52	0.85±0.80

④ B농장 임상 증상 변화

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 49일령, 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령, 91일령, 98일령, 105일령, 112일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다. 또한 백신군이 대조군에 비해 119일령에도 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 75. B농장 임상 증상 변화

일령	B농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.50±0.51	0.55±0.51
28일령	0.35±0.49	0.45±0.51
35일령	0.35±0.49	0.60±0.50
42일령	0.45±0.51	0.75±0.55
49일령	0.90±0.79^a	1.45±0.51^b
56일령	0.95±0.69^a	2.05±0.76^b
63일령	1.50±0.69^a	2.70±1.26^b

70일령	1.50±1.28 ^a	2.75±1.07 ^b
77일령	1.45±0.69 ^a	2.60±1.23 ^b
84일령	1.40±1.05 ^a	2.55±1.00 ^b
91일령	1.25±1.21 ^a	2.25±1.29 ^b
98일령	1.25±1.41 ^a	1.95±0.85 ^b
105일령	1.21±0.79 ^a	1.79±1.32 ^b
112일령	1.11±1.29 ^a	1.88±0.93 ^b
119일령	0.77±0.60 ^a	1.85±1.14 ^b
126일령	1.23±0.44	1.77±0.83
133일령	1.15±0.69	1.62±1.45
140일령	1.15±0.69	1.75±1.42
147일령	1.08±0.64	1.45±0.69
154일령	1.00±0.58	1.45±0.52
161일령	0.92±0.64	1.36±0.67
168일령	0.85±0.69	1.36±0.50

⑤ C농장 임상 증상 변화

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다. 또한 백신군이 대조군에 비해 119일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 76. C농장 임상 증상 변화

일령	C농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.55±0.51	0.40±0.50
28일령	0.40±0.50	0.40±0.50
35일령	0.45±0.51	0.30±0.47
42일령	0.75±0.72	0.80±0.62
49일령	0.75±0.64	1.15±0.67
56일령	1.05±0.76 ^a	1.85±0.67 ^b
63일령	1.50±0.76 ^a	2.20±0.83 ^b
70일령	1.15±0.88 ^a	2.50±1.32 ^b
77일령	1.40±0.82 ^a	2.40±1.27 ^b
84일령	1.20±0.83 ^a	2.10±0.91 ^b
91일령	1.10±0.85	1.65±0.99
98일령	1.00±0.92	1.65±1.23
105일령	1.00±1.08	1.58±0.77
112일령	1.10±1.37	1.53±0.77
119일령	0.71±0.61 ^a	1.71±2.09 ^b
126일령	1.00±0.55	1.50±1.00
133일령	0.93±0.47	1.25±0.75
140일령	0.77±0.44	1.33±1.07
147일령	0.79±0.43	1.17±0.72
154일령	0.71±0.61	0.92±0.67
161일령	0.64±0.50	1.00±0.74
168일령	0.64±0.50	1.08±0.67

(2) 체중 측정

① 체중 측정

공시돈의 3주령, 10주령, 16주령, 25주령의 체중을 측정한다. 백신군과 대조군에 대해 각 시점의 평균체중 및 편차를 비교한다. 또한 구간별 증체 평균을 비교한다.

② 체중 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성 이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ A농장 체중 측정 결과

A농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 112일령과 175일령에서 체중이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 77. A농장 체중 측정 결과^(a,b): 유의성 의미

일령	A농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (1차 접종)	5.42±0.26	5.41±0.30	5.66%
70일령(접종 4주)	24.46±0.90	24.30±0.91	0.86%
112일령(접종 10주)	55.55±1.29^a	54.24±1.05^b	0.75%
175일령(접종 19주)	107.06±2.59	105.38±1.79	4.15%

④ B농장 체중 측정 결과

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 112일령과 175일령에서 체중이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 78. B농장 체중 측정 결과^(a,b): 유의성 의미

일령	B농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (1차 접종)	5.41±0.22	5.50±0.26	-1.63%
70일령(접종 4주)	23.99±0.74	24.13±1.06	-0.58%
112일령(접종 10주)	55.04±2.14^a	52.99±1.65^b	3.85%
175일령(접종 19주)	104.33±1.18^a	102.39±1.99^b	1.89%

⑤ C농장 체중 측정 결과

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 112일령과 175일령에서 체중이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 79. C농장 체중 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (1차 접종)	5.42±0.25	5.36±0.27	1.12%
70일령(접종 4주)	22.94±0.91	22.62±1.20	1.44%
112일령(접종 10주)	54.39±1.61 ^a	52.44±1.41 ^b	3.70%
175일령(접종 19주)	106.11±1.08 ^a	104.25±1.05 ^b	1.78%

(3) 일당 증체량 측정

① 일당 증체량 측정 구간

21~70일령, 70~112일령, 112~175일령, 21~175일령의 일당증체량을 계산하여 백신군과 대조군의 일당증체량을 비교하였다.

② 일당 증체량 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ A농장 일당 증체량 측정 결과

A농장에서는 백신군이 대조군에 비해 21~175일령에서 일당증체량이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 80. A농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	A농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령 (백신 1차 접종 ~ 접종 4주)	388.83±19.79	385.61±17.36	0.83%
70~112일령 (접종 4주 ~ 접종 10주)	740.35±38.58 ^a	711.51±37.76 ^b	4.05%
112~175일령 (접종 10주 ~ 접종 19주)	815.19±57.16	812.45±37.86	0.34%
21 ~ 175일령	660.16±16.70 ^a	649.35±11.94 ^b	1.64%

④ B농장 일당 증체량 측정 결과

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 21~175일령에 일당증체량이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 81. B농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	B농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령 (백신 1차 접종 ~ 접종 4주)	379.08±17.55	380.10±22.71	-0.27%
70~112일령 (접종 4주 ~ 접종 10주)	738.60±52.59^a	690.48±47.15^b	6.97%
112~175일령 (접종 10주 ~ 접종 19주)	796.09±31.58	788.60±30.57	0.95%
21 ~ 175일령	642.31±7.06^a	629.40±12.69^b	2.01%

㉟ C농장 일당 증체량 측정 결과

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 21~175일령에 일당증체량이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 82. C농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	C농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령 (백신 1차 접종 ~ 접종 4주)	357.55±15.93	352.14±24.13	1.54%
70~112일령 (접종 4주 ~ 접종 10주)	748.62±42.35^a	711.28±43.16^b	5.25%
112~175일령 (접종 10주 ~ 접종 19주)	826.08±34.57	822.22±32.29	0.47%
21 ~ 175일령	653.94±7.38	642.15±6.68	1.84%

(4) 폐사율

① 폐사율 분석 방법

실험개시 후 종료까지 백신군과 대조군의 폐사 두수를 기록하여 시기별 폐사 두수를 기록한다. 또한 실험기간 중 발생하는 폐사돈에 대해 부검을 실시하고, 폐사 원인 검사 후 결과를 기록한다. 또한 폐사돈의 폐장에서는 PRRS 바이러스의 면역조직화학법을 시행하여 PRRS 바이러스에 대한 항원의 개수를 측정한다.

② 각 농장별 폐사율

A농장의 경우 백신군에서 1두, 대조군에서는 2두가 폐사하였다. B농장의 경우 백신군에서 2두, 대조군에서 4두가 폐사하였다. C농장의 경우 백신군에서 1두, 대조군에서 3두가 폐사하였다.

표 83. 농장별 폐사율

농장	농장별 폐사율 (%)	
	백신군	대조군
A 농장	1/20 (5%)	2/20 (10%)
B 농장	2/20 (10%)	4/20 (20%)
C 농장	1/20 (5%)	3/20 (15%)

③ A농장 폐사 원인 분석

표 84. A농장 폐사 두수와 원인

농장	A농장 폐사 두수와 원인	
	백신군	대조군
폐사 두수	1두: 82일령(개체번호 7)	2두: 87일령(개체번호 8)와 95일령(개체번호 15)
원인	PCV2d, <i>Mycoplasma hyorhinis</i> 복합 감염증	PRRSV(북미형과 유럽형), <i>Glasserella parasuis</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(87일령)
		PRRSV(북미형)와 <i>Glasserella parasuis</i> (추정)에 의한 복합 호흡기 질병(95일령)

④ B농장 폐사 원인 분석

표 85. B농장 폐사 두수와 원인

농장	B농장 폐사 두수와 원인	
	백신군	대조군
폐사 두수	2두: 97일령(개체번호 5), 111일령(개체번호 4)	3두: 86일령(개체번호 5), 104일령(개체번호 9), 130일령(개체번호 15)
원인	PRRSV(북미형), <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Truepella pyogens</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(97일령)	PRRSV(북미형), <i>Glasserella parasuis</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(86일령)
		<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(104일령)
		PRRSV(북미형), <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(130일령)
	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(111일령)	

⑤ C농장 폐사 원인 분석

표 86. C농장 폐사 두수와 원인

농장	C농장 폐사 두수와 원인	
	백신군	대조군
폐사 두수	1두: 110일령(개체번호 18)	3두: 96일령(개체번호 19). 118일령(개체번호 5). 118일령(개체번호 16)
원인	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> 에 의한 복합 호흡기 질병 (110일령)	PRRSV(북미형), <i>Glasserella parasuis</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(96일령)
		PRRSV(유럽형), <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Glasserella parasuis</i> 에 의한 복합 호흡기 질병(118일령 2두)

⑥ 농장별 폐사돈 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준

A농장 백신군의 경우 82일령의 경우 폐장에서 면역조직화학법을 시행한 결과 PRRS 바이러스 항원이 검출되지 않았다. 대조군의 경우 87일령의 경우 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 32개, 95일령의 경우 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 28개 관찰되었다. B농장 백신군의 경우 97일령의 경우 폐장에서 면역조직화학법을 시행한 결과 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 12개 관찰되었으며, 111일령의 경우 PRRS 바이러스 항원이 검출되지 않았다. 대조군의 경우 86일령의 경우 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 34개, 95일령의 경우 PRRS 바이러스 항원이 검출되지 않았다. C농장 백신군의 경우 110일령의 경우 폐장에서 면역조직화학법을 시행한 결과 PRRS 바이러스 항원이 검출되지 않았다. 대조군의 경우 96일령의 경우 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 37개, 118일령(개체번호 5)의 경우 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 23개, 118일령(개체번호 16)의 경우 PRRS 바이러스 항원에 양성을 보인 세포수가 23개 관찰되었다.

표 87. 농장별 폐사돈 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준

농장	폐사돈 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준	
	백신군	대조군
A 농장	82일령: 0	87일령: 32
		95일령: 28
B 농장	97일령: 12	86일령: 34
	111일령: 0	104일령: 0
C 농장	110일령: 0	130일령: 36
		96일령: 37
		118일령(5): 23
		118일령(16): 25

8. 혈중 PRRS 바이러스 항체 역가 측정

(1) 혈중 PRRS 바이러스 항체 역가 측정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(1차 백신 접종), 42일령(2차 백신 접종), 70일령, 112일령, 175일령에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 ELISA (HerdChek PRRS X3 Ab test) 키트를 이용하여 PRRS 바이러스의 항체가를 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

(2) 항체 역가 측정 검사방법

검사할 혈청을 1:40 으로 희석하여 상업화된 ELISA (HerdChek PRRS X3 Ab test) 키트의 PRRS well과 NHC well에 각각 100 μ l씩 분주하고, 양성 대조군 및 음성 대조군 샘플을 각각 2개의 PRRS well과 2개의 NHC well, 총 4개의 well에 100 μ l씩 분주한다. 검사할 각 well을 필름으로 덮고, 실온(18~25 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 보관하여 반응 시킨 후 세척액을 이용하여 5회 반복하여 세척한다. Anti-porcine:HRPO conjugate 용액을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온(18~25 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 보관한다. 각 well을 동일하게 세척한 후 발색제 (TMB substrate solution)를 100 μ l씩 분주하고 빛을 차단하여 실온(18~25 $^{\circ}$ C)에서 15분간 반응 시킨다. 반응 중지 용액을 100 μ l씩 분주하여 반응을 멈추고 650 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정한다. NHC well의 양성 대조군의 OD 평균값이 0.120 이하, NHC well의 음성 대조군의 OD 평균값이 0.250 이하 일 때 유효한 값으로 간주하며, 검사 혈청의 S/P ratio가 0.4 미만인 경우 음성으로, 0.4 이상인 경우 양성으로 판정한다.

(3) PRRS 바이러스 IgG 항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(4) A농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 88. A농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.36±0.09	0.30±0.08	20.0%
42일령(2차 접종)	0.75±0.09^a	0.49±0.09^b	53.06%
70일령(접종 4주)	1.74±0.39^a	0.76±0.13^b	128.95%
112일령(접종 10주)	1.61±0.35^a	0.91±0.15^b	76.92%
175일령(접종 19주)	1.51±0.27^a	0.96±0.16^b	57.29%

(5) B농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 89. B농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.31±0.06	0.30±0.09	3.33%
42일령(2차 접종)	0.68±0.08^a	0.43±0.11^b	58.14%
70일령(접종 4주)	1.61±0.35^a	0.88±0.17^b	48.86%
112일령(접종 10주)	1.51±0.25^a	1.05±0.32^b	43.81%
175일령(접종 19주)	1.46±0.25^a	1.14±0.24^b	28.07%

(6) C농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 90. C농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.37±0.07	0.33±0.09	12.12%
42일령(2차 접종)	0.64±0.07^a	0.47±0.11^b	36.17%
70일령(접종 4주)	1.49±0.39^a	0.91±0.19^b	63.74%
112일령(접종 10주)	1.45±0.36^a	0.95±0.22^b	52.63%
175일령(접종 19주)	1.34±0.29^a	1.02±0.09^b	31.37%

9. PRRS 바이러스 중화항체 혈청검사

(1) 중화항체에 사용한 바이러스

중화항체에 사용한 바이러스는 농장에서 분리한 야외 PRRS 바이러스를 사용한다.

(2) 혈청 중화항체(neutralizing antibodies) 검사

백신군과 대조군에서 21일령(1차 백신 접종), 42일령(2차 백신 접종), 70일령, 112일령, 175일령에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 중화 항체 검사를 측정한다.

(3) PRRS 중화항체 역가 측정 검사방법

PRRS 중화항체 역가 측정 검사방법은 기존의 방법에 준하여 실시한다. 모든 혈청 sample을 검사 시작 전에 45분 동안 56°C에서 heat inactivation시킨다. Inactivation되어 있는 혈청을 RPMI 1640 배지(10% FCS, 20mM L-glutamine, antibiotic-antimycotic mixture-100IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 0.25 mg/ml amphotericin B)와 2배 씩 차례로 희석시킨다. 그리고 각각의 희석된 혈청을 100 µl 씩, 미리 준비된 10³ TCID₅₀/ml 100 µl와 섞어 37°C에서 한 시간 동안 incubation 시킨 후 전날 미리 배양해 둔 monolayer 상태의 Marc-145 cell에 접종한다. 37°C에서 한 시간 배양 한 후 모든 접종액은 제거한다. 그리고 RPMI 배양액 200 µl로 대체한다. 37°C에서 배양하면서 매일 cytopathic effect (CPE)를 확인한다. 5일 간 배양 한 후 각 well 의 CPE를 확인한다. CPE가 없는 well은 SDOW 17 항체를 이용한 염색을 통해 바이러스의 성장을 확인한다. 중화항체 역가(titer)는 바이러스의 성장의 징후가 전혀 없는 가장 높은 희석배수의 역수를 산출한다.

(4) 중화항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P 값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(5) 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

① A농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

A농장에서 백신군과 대조군 사이에 21일령, 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 수준의 유의성이 없었다.

표 91. A농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	A농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.95±0.69	0.75±0.64	14.87%
42일령(2차 접종)	1.55±0.89	1.30±0.86	18.92%
70일령(접종 4주)	2.37±0.90	1.80±0.70	48.45%
112일령(접종 10주)	2.58±1.17	2.06±0.80	43.40%
175일령(접종 19주)	2.07±0.73	1.85±0.69	12.20%

② B농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

B농장에서 백신군과 대조군 사이에 21일령, 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 수준의 유의성이 없었다.

표 92. B농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.90±0.85	0.85±0.75	3.53%
42일령(2차 접종)	1.65±0.75	1.40±0.60	18.92%
70일령(접종 4주)	2.30±0.80	2.05±0.85	18.70%
112일령(접종 10주)	2.50±0.79	2.11±0.81	31.47%
175일령(접종 19주)	2.08±0.64	1.82±0.98	14.23%

③ C농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

C농장에서 백신군과 대조군 사이에 21일령, 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 수준의 유의성이 없었다.

표 93. C농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 유럽형 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	1.00±0.86	0.85±0.88	10.95%
42일령(2차 접종)	1.95±0.83	1.60±0.82	27.46%
70일령(접종 4주)	3.10±0.79	2.60±1.05	41.42%
112일령(접종 10주)	3.16±0.83	2.30±0.73	81.24%
175일령(접종 19주)	2.00±0.78	1.67±1.15	20.00%

(6) 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

① A농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

A농장에서 백신군과 대조군 사이에 21일령, 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 수준의 유의성이 없었다.

표 94. A농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.90±0.85	0.80±0.77	7.18%
42일령(2차 접종)	1.74±0.73	2.05±1.00	-19.51%
70일령(접종 4주)	2.74±0.99	2.53±1.26	15.71%
112일령(접종 10주)	2.79±1.08	2.67±1.14	8.89%
175일령(접종 19주)	2.00±0.88	1.92±0.49	4.00%

② B농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

B농장에서 백신군과 대조군 사이에 21일령, 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 수준의 유의성이 없었다.

표 95. B농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	B농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	0.85±0.75	0.95±0.89	-6.70%
42일령(2차 접종)	1.65±0.49	1.50±0.61	10.96%
70일령(접종 4주)	2.50±1.00	1.95±0.71	46.68%
112일령(접종 10주)	2.83±1.15	2.39±1.04	36.08%
175일령(접종 19주)	2.15±0.55	1.73±0.65	24.70%

③ C농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과

C농장에서 백신군과 대조군 사이에 21일령, 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 수준의 유의성이 없었다.

표 96. C농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	C농장 북미형 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	1.10±0.97	0.70±1.03	31.95%
42일령(2차 접종)	1.90±0.55	1.75±0.55	10.96%
70일령(접종 4주)	2.80±1.01	2.30±0.66	41.42%
112일령(접종 10주)	3.47±1.26	2.95±0.97	44.02%
175일령(접종 19주)	1.93±0.47	1.58±0.90	21.80%

10. PRRS 바이러스의 특이적인 인터페론 감마 분비 T 세포 측정

(1) 말초혈액 단핵구와 공배양하는 바이러스

말초혈액 단핵구와 공배양하는 바이러스는 농장에서 분리한 야외 PRRS 바이러스를 사용한다.

(2) 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

백신군과 대조군에서 21일령(1차 백신 접종), 42일령(2차 백신 접종), 70일령, 112일령, 175일령에 EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 HBSS에 희석한다. 희석한 혈액 4 ml를 15 ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18~20℃에서 400 g의 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

(3) IFN-γ 분비 세포 수 측정

PRRS 바이러스의 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시한다[12]. 분리된 말초혈액 단핵구를 PRRS 바이러스 항원으로 자극하여 IFN-γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN-γ 단클론 항체를 8.3 μg/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1x10⁷ cell/ml의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1x10⁶ cell/ml포함된 각 well에 MOI가 0.01인 PRRS

바이러스 항원 4 µg/ml의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN-γ 1차 항체를 50 µl 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 µl씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 µl씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

(4) IFN-γ-SC 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(5) 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 수준 통계학적 분석 방법

① A농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 결과

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 수준이 유의성(P < 0.05) 있게 증가하였다.

표 97. A농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	12.55±3.89	11.30±4.38	11.06%
42일령(2차 접종)	30.45±12.80 ^a	19.50±10.46 ^b	56.15%
70일령(접종 4주)	88.79±20.38 ^a	31.65±11.28 ^b	180.54%
112일령(접종 10주)	101.21±12.62 ^a	43.33±13.52 ^b	133.56%
175일령(접종 19주)	84.21±8.01 ^a	35.77±8.00 ^b	135.44%

② B농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 결과

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 수준이 유의성(P < 0.05) 있게 증가하였다.

표 98. B농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	10.10±5.62	9.40±4.11	7.45%
42일령(2차 접종)	28.70±8.57 ^a	14.40±11.80 ^b	99.31%
70일령(접종 4주)	74.10±21.09 ^a	25.84±11.03 ^b	186.74%
112일령(접종 10주)	95.50±12.57 ^a	36.42±15.05 ^b	162.21%
175일령(접종 19주)	80.00±10.52 ^a	36.82±10.49 ^b	117.28%

③ C농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN-γ-SC 결과

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS

바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 99. C농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 유럽형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	12.55±4.98	13.10±4.60	-4.20%
42일령(2차 접종)	39.75±11.91 ^a	21.75±10.15 ^b	82.76%
70일령(접종 4주)	94.45±24.02 ^a	39.65±10.98 ^b	138.21%
112일령(접종 10주)	106.89±16.58 ^a	49.40±16.10 ^b	116.39%
175일령(접종 19주)	90.29±8.48 ^a	51.08±8.64 ^b	76.74%

(5) 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 통계학적 분석 방법

① A농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 100. A농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	11.25±4.58	10.10±4.02	11.39%
42일령(2차 접종)	31.75±9.20 ^a	25.50±12.80 ^b	24.51%
70일령(접종 4주)	71.26±18.73 ^a	33.65±10.81 ^b	111.78%
112일령(접종 10주)	95.21±21.34 ^a	40.94±15.80 ^b	132.54%
175일령(접종 19주)	90.36±12.73 ^a	35.15±12.40 ^b	157.07%

② B농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 101. B농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	9.90±4.79	10.40±3.65	-4.81%
42일령(2차 접종)	35.25±10.48 ^a	21.00±12.49 ^b	67.86%
70일령(접종 4주)	82.70±19.67 ^a	32.00±11.18 ^b	158.44%
112일령(접종 10주)	103.17±25.53 ^a	49.00±12.67 ^b	110.54%
175일령(접종 19주)	97.62±18.20 ^a	42.64±6.92 ^b	128.95%

③ C농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다.

표 102. C농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	C농장 북미형 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(1차 접종)	13.40±3.55	10.20±3.91	31.37%
42일령(2차 접종)	27.85±4.93 ^a	14.00±10.45 ^b	98.93%
70일령(접종 4주)	72.85±15.03 ^a	29.25±9.54 ^b	149.06%
112일령(접종 10주)	92.26±13.86 ^a	32.65±13.88 ^b	182.58%
175일령(접종 19주)	84.29±10.41 ^a	29.92±10.10 ^b	181.74%

11. 혈중 PRRS 바이러스 항원 역가 측정

(1) 혈중 PRRS 바이러스 항원 역가 측정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(1차 백신 접종), 42일령(2차 백신 접종), 70일령, 112일령, 175일령에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 실시간 중합효소 연쇄반응(realtime polymerase chain reaction)을 이용하여 PRRS 바이러스를 정량 분석하여, 백신군과 대조군의 혈중 PRRS 바이러스의 농도를 비교하였다.

(2) 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시한다. ORF7의 172bp를 확인하기 위한 유럽형(정방향: 5'TGGCCAGTCAGTCAATCAAC, 역방향: 5'AATCGATTGCAAGCAGAGGGAA), 북미형(정방향: 5' GAAGAGAAACCCGGAGAAGC, 역방향: 5' CGTAGGCAAACCTAAATTCCACAG) Primer를 각각 이용하여 PCR을 수행한다(Tm : 60°C). 증폭된 PCR product를 cloning vector (TOPcloner™ TA kit, Enzymomics)에 삽입하고 10⁸에서 10¹ 개/ml 로 10⁻¹ 씩 단계별로 희석한 후, 위의 primer를 이용하여 real time PCR을 수행하여 standard curve를 측정하였다. 시료에서 추출된 DNA 1 μ l를 주형으로, 2x SYBR green reaction mix (Applied Biosystems) 10 μ l, primers 0.5 μ M, 증류수 8.5 μ l와 혼합하여 최종 20 μ l 로 만든다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 다시 60°C에서 30초간 총 40회 반복하여 반응시킨다. 모든 반응이 끝난 후 60°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선 (dissociation curve)을 측정한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct 값을 표준커브(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml를 산정한다.

(3) 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(4) 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

① A농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 항원

수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 103. A농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(1차 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
42일령(2차 접종)	0.44±0.92	0.39±0.96	11.90%
70일령(접종 4주)	0.95±1.33 ^a	2.27±1.93 ^b	-95.29%
112일령(접종 10주)	0.85±1.17 ^a	2.04±1.77 ^b	-93.62%
175일령(접종 19주)	0.81±1.19	1.34±1.33	-70.35%

② B농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 104. B농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(1차 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
42일령(2차 접종)	0.58±1.19	0.59±1.06	-2.34%
70일령(접종 4주)	1.29±1.66 ^a	2.43±1.92 ^b	-92.78%
112일령(접종 10주)	1.36±1.68 ^a	2.13±1.58 ^b	-82.99%
175일령(접종 19주)	0.85±1.35	1.24±1.49	-59.26%

③ C농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에서 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 105. C농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 혈중 유럽형 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(1차 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
42일령(2차 접종)	0.78±1.14	1.34±1.41	-72.13%
70일령(접종 4주)	1.80±1.59 ^a	3.24±1.64 ^b	-96.33%
112일령(접종 10주)	1.50±1.56 ^a	3.22±2.98 ^b	-98.09%
175일령(접종 19주)	1.39±1.78	1.98±1.77	-74.43%

(5) 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

① A농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 106. A농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(1차 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
42일령(2차 접종)	1.95±1.72	1.84±1.79	28.90%
70일령(접종 4주)	2.52±2.11 ^a	3.92±2.42 ^b	-96.10%
112일령(접종 10주)	2.20±1.60 ^a	3.59±2.43 ^b	-95.94%
175일령(접종 19주)	1.37±1.27	1.48±1.68	-22.52%

② B농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 107. B농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(1차 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
42일령(2차 접종)	1.95±1.71	2.07±1.85	-23.10%
70일령(접종 4주)	2.64±2.25 ^a	4.15±2.58 ^b	-96.92%
112일령(접종 10주)	1.75±1.81 ^a	3.27±2.38 ^b	-96.99%
175일령(접종 19주)	0.90±1.42	1.65±1.69	-82.50%

③ C농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에서 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 108. C농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 혈중 북미형 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(1차 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
42일령(2차 접종)	1.01±1.61	1.26±1.81	-43.46%
70일령(접종 4주)	1.73±2.22 ^a	3.23±2.46 ^b	-96.80%
112일령(접종 10주)	1.42±1.56	2.02±2.58	-75.00%
175일령(접종 19주)	0.80±1.16	1.04±1.58	-41.80%

12. 병리조직 제작 및 관찰

(1) 병리조직 샘플

16주령과 25주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두를 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 각각의 주요 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 편도, 서혜(subinguinal) 임파절, 장간막(mesenteric) 임파절, 종격흉막(mediastinal) 임파절 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

(2) 병리조직학적 병변 관찰

포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 폐장에서의 간질성 폐렴(interstitial pneumonia)의 정도는 이미 발효된 논문에 의거하여 병변이 없으면 0점, 경미한 간질성 폐렴(mild interstitial pneumonia)은 1점, 중간정도 다발성 간질성 폐렴(moderate multifocal interstitial pneumonia)은 2점, 중간정도 미만성 간질성 폐렴(moderate diffuse interstitial pneumonia)은 3점, 매우 심한 간질성 폐렴(severe interstitial pneumonia)는 4점으로 구분하여 표시한다.

(3) 병리조직학적 병변 결과 분석

백신군과 대조군의 그룹간의 병변을 기록하고 Kruskal-Wallis방법으로 통계 처리한 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 2개 그룹간의 병리조직학적 간질성 폐렴 병변의 차이를 비교한다.

(4) 병리조직학적 폐렴 병변 결과 분석

① A농장 폐렴 병변 변화

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 16주령과 25주령에서 병리조직학적 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 109. A농장 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	A농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 10주)	1.64±0.33 ^a	3.20±0.42 ^b	-48.75%
25주령 (175일령, 접종 19주)	1.04±0.43 ^a	2.20±0.37 ^b	-52.72%

② B농장 폐렴 병변 변화

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 16주령과 25주령에서 병리조직학적 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 110. B농장 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	B농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 10주)	1.80±0.14 ^a	3.52±1.13 ^b	-48.86%
25주령 (175일령, 접종 19주)	1.44±0.26 ^a	2.28±0.63 ^b	-36.84%

③ C농장 폐렴 병변 변화

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 16주령과 25주령에서 병리조직학적 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 111. C농장 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	C농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 10주)	1.52±0.23 ^a	2.96±0.33 ^b	-48.65%
25주령 (175일령, 접종 19주)	1.12±0.36 ^a	2.16±0.43 ^b	-48.15%

13. 조직내 PRRS 바이러스 항원 수준 분석

(1) 조직내 PRRS 바이러스 항원 수준 분석 샘플

16주령과 25주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두를 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 채취한 폐장을 이용하여 면역조직화학법을 이용하여 조직내 PRRS 바이러스의 증식 정도를 백신군과 대조군에서 비교 확인한다.

(2) 면역조직화학법 검사 방법 (immunohistochemistry; IHC)

PRRS 바이러스에 대한 단클론성 항체(monoclonal antibody)인 SR30을 사용하여 면역조직화학법을 기존에 발표되어 있는 방법대로 시행한다. 슬라이드 상의 조직 절편을 xylene 으로 탈파라핀 후, 100 %, 70 %, 50 % 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 2분, PBST 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K (Promega)를 37°C 에서 17분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제를 위해 5% normal goat serum 을 20분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBST 에 1:400으로 희석된 SR-30 1차 항체를 조직이 덮일 정도로(400 μ l) 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBST 로 세척한 후, alkaline phosphatase가 표지된 polyclonal goat anti-mouse (Dako) 2차 항체를 PBST 에 1:200으로 희석하여 분주하고, 37°C 에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBST 로 세척하고, fast red tablet (Roche)으로 발색하여 PRRS 바이러스 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's hematoxylin으로 배경을 염색한 후, crystal mount를 이용하여 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

(3) 면역조직화학법을 이용한 분석방법

야외임상 실험을 실시한 3개 농장에서 백신군과 대조군에서 채취한 폐장을 이용하여 면역염색법을 실시한다[5]. 분석방법은 이미 문헌에 보고된 방법으로 면역조직화학법의 실시가 종료된 폐장 조직은 현미경상에서 임의로 0.95 mm²의 면적을 10곳 정하여 PRRS 바이러스에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 각각의 그룹간의 PRRS 바이러스에 대한 양성감염세포수를 통계 처리 하여 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

(4) 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

① A농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

A농장에서 백신군이 대조군에 비하여 16주령과 25주령에서 폐장에서 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 112. A농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	A농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 10주)	9.84±2.36 ^a	17.90±4.18 ^b	-45.03%
25주령 (175일령, 접종 19주)	6.84±1.35 ^a	11.18±1.29 ^b	-38.82%

② B농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

B농장에서 백신군이 대조군에 비하여 16주령과 25주령에서 폐장에서 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 113. B농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	B농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 10주)	10.60±4.50 ^a	18.22±4.27 ^b	-41.82%
25주령 (175일령, 접종 19주)	7.44±2.56 ^a	11.28±2.11 ^b	-34.04%

③ C농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

C농장에서 백신군이 대조군에 비하여 16주령과 25주령에서 폐장에서 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다.

표 114. C농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	C농장 폐장 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 10주)	10.88±4.27 ^a	18.72±3.36 ^b	-41.88%
25주령 (175일령, 접종 19주)	5.96±0.78 ^a	9.36±1.73 ^b	-36.32%

라. 써코·마이코 복합 백신 야외임상시험 결과

(전반부: 3주령~16주령 & 후반부: 16주령~25주령)

1. 목적

목적 동물에 대한 확대 시험을 통해 안전성 확보와 효과 검증을 위하여 야외 임상 시험을 실시하였다. 주요 검증 포인트는 다음과 같다.

가. 백신 접종 후 목적 동물에서 부작용 발생 유무

나. 백신 접종 그룹(백신군)과 비접종 그룹(대조군)간의 임상증상발현 비율 차이

다. 백신군과 대조군의 증체율, 폐사율 등의 차이 분석

2. 야외 임상 시험 농장 정보

(1) 임상 시험 농장 선정

① 시험농장 A

a. 농장 자돈 백신 프로그램

2주령에 PRRS 백신, 3주령에 마이코플라즈마백신 및 써코백신, 7주령에 돼지단콜 백신, 8주령과 12주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 A는 2020년 2월 14일경에 농장의 7주령 전후의 자돈에서 호흡기를 동반한 위축이 발병하여 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 중합효소 연쇄반응으로 폐장과 림프절에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 연쇄상구균도 폐장에서 분리되었다. 림프절에서는 중합효소 연쇄반응으로 PCV2d가 검출되었다. 또한 병리조직학적으로 PRRS 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변과 마이코플라즈마 감염 때에 관찰되는 전형적인 세기관지 주위 림프구의 비후(peribronchiolar lymphoid tissue hyperplasia)가 관찰되었다. 폐장에서 DNA를 추출하여 중합효소 연쇄반응을 통해 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 유전자를 검출하였다.

2020년 6월 25일에 의뢰한 10주령 12두에 대한 돼지 써코바이러스 2형의 혈청검사와 항원검사에서 의뢰된 12두 중 11두에서 돼지 써코바이러스 2형에 대한 항체가 검출되었으며, 12두 중 7두의 혈중에서 PCV2d가 검출되었다.

② 시험농장 B

a. 농장 자돈 백신 프로그램

2주령에 PRRS 백신, 3주령에 써코백신과 마이코플라즈마 백신, 8주령에 돼지열병 백신, 8주령과 12주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 B는 2020년 2월 14일경에 농장의 6~8주령 사이의 자돈에서 호흡기를 동반한 위축이 발병하여 2두를 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 중합효소 연쇄반응으로 2두 모두에서 폐장과 림프절에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 글레서씨병을 유발하는 헤모필러스균도 폐장에서 분리되었다. 림프절에서는 중합효소 연쇄반응으로 PCV2d가 검출되었다. 또한 병리조직학적으로 PRRS 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변과 마이코플라즈마 감염 때에 관찰되는 전형적인 세기관지 주위 림프구의 비후(peribronchiolar lymphoid tissue hyperplasia)가 관찰되었다. 폐장에서 DNA를 추출하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 유전자를 검출하였다. 2020년 6월 25일에 의뢰한 10주령 10두에 대한 돼지 써코바이러스 2형에 대한 혈청검사와 항원검사에서 의뢰된 10두 중 1두에서 돼지 써코바이러스 2형에 대한 항체가 검출되었으며, 10두 중 4두의 혈중에서 PCV2d가 검출되었다.

③ 시험농장 C

a. 농장 자돈 백신 프로그램

1주령에 마이코플라즈마 백신, 3주령에 써코 백신, 8주령에 돼지열병 백신, 8주령과 10주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 C는 2020년 5월 6일경에 이유자돈의 위축으로 인하여 부검장기인 폐장과 비장을 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 폐장에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 비장에서는 살모넬라균이 분리되었다. 또한 병리조직학적으로 PRRS 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변과 마이코플라즈마 감염 때에 관찰되는 전형적인 세기관지 주위 림프구의 비후(peribronchiolar lymphoid tissue hyperplasia)가 관찰되었다. 폐장에서 DNA를 추출하여 중합효소 연쇄반응을 통하여 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 유전자를 검출하였다.

2020년 6월 25일에 의뢰한 10주령 10두에 대한 돼지 써코바이러스 2형에 대한 혈청검사와 항원검사에서 의뢰된 10두 중 3두에서 돼지 써코바이러스 2형에 대한 항체가 검출되었으며, 10두 중 4두의 혈중에서 PCV2d가 검출되었다.

(2) 공시동물

선정된 시험농장 3곳에서 각각 40두를 선정하여 백신군에 디엠백 백신 20두를 선정하고, 대조군으로 20두를 선정하였다.

(3) 백신 접종

선정된 3개 농장의 백신군에는 21일령에 디엠백 백신 2.0 mL, 대조군에는 21일령에 PBS 2.0 mL 근육 접종하였다. 농장마다 연속 제조한 3로트 시험백신을 각각 사용하였다.

3. 야외 임상 시험 개요

(1) 농장 시설 및 관리 체계

① 시험 농장 A

시험농장 A는 후보돈 및 임신사, 분만사, 자돈사 2동, 비육사 2동이 있어서 야외임상 실험을 할 때에 자돈사 1동과 비육사 1동을 선정하여 실시하였다. 또한 각각 1개동의 자돈사와 비육사에서 6개의 돈방을 설정하여 백신군과 대조군을 각각의 돈방에 임의 배정하여 사육하였다.

② 시험 농장 B

시험농장 B는 후보돈 및 임신사, 분만사, 자돈사 2동, 비육사 2동이 있어서 야외임상 실험을 할 때에 자돈사 1동과 비육사 1동을 선정하여 실시하였다. 또한 각각 1개동의 자돈사와 비육사에서 6개의 돈방을 설정하여 백신군과 대조군을 각각의 돈방에 임의 배정하여 사육하였다.

③ 시험 농장 C

시험농장 C는 후보돈 및 임신사 2동, 분만사 2동, 자돈사 2동, 비육사 2동이 있어서 야외임상 실험을 할 때에 자돈사 1동과 비육사 1동을 선정하여 실시하였다. 또한 각각 1개동의 자돈사와 비육사에서 6개의 돈방을 설정하여 백신군과 대조군을 각각의 돈방에 임의 배정하여 사육하였다.

4. 평가 항목

백신은 임상, 면역학적, 미생물학적, 병리학적 평가 등 4가지 항목에 관하여 평가하였다. 각각의 평가 항목에 대한 백신의 검사법을 실시하였다.

표 115. 야외임상시험의 평가 항목

평가 항목	검사법	비고
임상 평가	임상증상 관찰	
	일당 증체량 측정	
면역학적 평가	PCV2 항체 검사(IgG ELISA)	
	PCV2 중화항체 검사	
	PCV2-인터페론-감마 분비세포	
	Mhp 항체 검사 (IgG ELISA)	
	Mhp-인터페론-감마 분비세포	
미생물학적 평가	혈중 PCV2 바이러스 항원 정량분석	
	비강 내 Mhp 항원 정량 분석	
병리학적 평가	PCV2에 의한 림프절 병변 분석	
	림프절에서 PCV2 항원 분포 분석	
	Mhp에 의한 폐렴 병변 분석	

5. 백신 안전성 평가

(1) 직장 체온 모니터링

① 직장 체온 모니터링 시기

백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일간 직장에서 체온을 측정하였다.

② 체온 통계학적 분석

21일령에 백신 접종 후에 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 직장 체온을 비교하였다. 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

③ A농장 체온 변화

A농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 116. A농장 체온 변화

시간/일령	A농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.79±0.46	38.73±0.42
1시간	38.77±0.47	38.75±0.44
2시간	38.84±0.46	38.86±0.43
4시간	38.80±0.45	38.80±0.41
8시간	38.83±0.44	38.82±0.40
1일	38.79±0.45	38.88±0.46
2일	38.86±0.47	38.80±0.37
3일	38.80±0.44	38.85±0.46
4일	38.79±0.43	38.79±0.35
5일	38.74±0.44	38.94±0.54
6일	38.82±0.41	38.84±0.53
7일	38.74±0.51	38.80±0.50

④ B농장 체온 변화

B농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 117. B농장 체온 변화

시간/일령	B농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.99±0.57	38.84±0.54
1시간	38.88±0.44	38.77±0.42
2시간	38.74±0.40	38.81±0.47
4시간	38.85±0.38	38.68±0.51
8시간	38.88±0.45	38.79±0.37
1일	38.91±0.38	38.75±0.43
2일	38.84±0.48	38.67±0.35
3일	38.84±0.37	38.76±0.35
4일	38.86±0.40	38.78±0.44
5일	38.76±0.42	38.79±0.40
6일	38.81±0.51	38.71±0.34
7일	38.85±0.49	38.69±0.41

⑤ C농장 체온 변화

C농장에서는 백신군과 대조군 사이에 백신 접종 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일에 체온의 유의성이 없었다.

표 118. C농장 체온 변화

시간/일령	C농장 체온 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
30분	38.88±0.49	38.77±0.54
1시간	38.84±0.49	38.75±0.45
2시간	38.88±0.43	38.84±0.39
4시간	38.93±0.38	38.77±0.32
8시간	38.79±0.39	38.86±0.45
1일	38.85±0.47	38.89±0.42
2일	38.85±0.38	38.80±0.42
3일	38.78±0.41	38.71±0.41
4일	38.87±0.38	38.76±0.49
5일	38.86±0.49	38.79±0.33
6일	38.87±0.37	38.75±0.47
7일	38.80±0.37	38.58±0.38

(2) 접종 부위 검사

① 접종 부위 검사 시기

백신을 접종한 후 1일부터 14일 동안은 매일 측정하고 접종 부위를 검사한다.

② 접종 부위 검사 평가 방법

접종 부위 검사는 다음과 같은 평가항목 및 방법으로 평가한 후 기록한다.

표 119. 접종 부위 평가 방법

평가항목	평가 방법			
	3점(심함)	2점(중간정도)	1점(경미)	0점
접종 부위 화농	직경 1 cm 이상 노란색 화농	직경 0.5~1 cm 노란색 화농	직경 0.5 cm 이하 노란색 화농	화농 없음
접종 부위 종창	직경 1 cm 이상 종창	직경 0.5~1 cm 종창	직경 0.5 cm 이하 종창	종창 없음
접종 부위 발적	직경 1 cm 이상 발적	직경 0.5~1 cm 발적	직경 0.5 cm 이하 발적	발적 없음

③ A농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군의 개체번호 19번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군의 개체번호 6번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 발적이 관찰되었다.

④ B농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군의 개체번호 11번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군의 개체번호 4번과 11번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 발적이 관찰되었다.

⑤ C농장 접종 부위 검사 결과

a. 화농 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군의 접종 부위에서 화농이 관찰되지 않았다.

b. 종창 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군의 개체번호 6번에서 백신 접종 후 1일과 2일에 경미한 종창이 관찰되었다.

c. 발적 관찰 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군의 개체번호 9번에서 백신 접종 후 1일에 경미한 발적이 관찰되었다.

(3) 백신 부작용 검사

① 백신 부작용 검사 시기

선정된 3개 농장에서 백신 안전성 검사를 실시한다. 안전성 시험은 21일령자돈에 백신 접종 후 30분, 1시간, 4시간 후에 측정하고, 그 후 매일 14일 동안 동일한 시간에 안전성 여부를 확인한다.

② 백신 부작용 검사 평가 방법

안전성 검사는 다음과 같은 평가항목 및 방법으로 평가한 후 기록한다.

표 120. 백신 부작용 검사 평가 방법

평가항목	평가 방법		
	심함(3점)	중간정도(2점)	경미(1점)
설사	수양성 설사	연변 설사	정상과 근접
쇼크	옆으로 눕고 경련 동반	옆으로 눕고 혼수상태	옆으로 누워 있음
침울	머리를 내려뜨리고 한쪽으로 치우쳐있음	돈군에서 떨어져서 한쪽으로 치우쳐있음	돈군에서 뒤쳐져 있고 행동이 느림

③ A농장 백신 부작용 검사 결과

A농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

④ B농장 백신 부작용 검사 결과

B농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

⑤ C농장 백신 부작용 검사 결과

C농장에서는 백신 접종 후 14일 동안 관찰한 결과 백신군과 대조군에서 설사, 쇼크, 침울이 관찰되지 않았다.

6. 임상학적 평가

(1) 임상 증상 관찰 방법

시험이 시작되는 21일령에서부터 시험이 종료되는 25주령까지 매주 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상증상을 관찰하였다.

표 121. 임상증상에 따른 임상점수

임상점수	임상 증상	비고
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다. 등뼈가 돌출되어 수척하다.	심한 황달 호흡기 증상
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

② 임상 증상 통계학적 분석

3주령에서부터 시험이 종료되는 25주령까지 매주 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상증상을 비교하였다. 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ A농장 임상 증상 변화

A농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 35일령, 42일령, 63일령, 77일령, 112일령, 126일령, 133일령, 147일령, 154일령에 임상 증상이 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

표 122. A농장 임상 증상 변화^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.20±0.41	0.20±0.41
28일령	0.30±0.47	0.45±0.69
35일령	0.15±0.37 ^a	0.80±0.70 ^b
42일령	0.30±0.47 ^a	1.00±0.86 ^b
49일령	0.40±0.60	0.70±0.80
56일령	0.45±0.60	1.00±1.17
63일령	0.45±0.60 ^a	1.85±1.53 ^b
70일령	0.60±0.94	1.60±1.98
77일령	0.55±1.36 ^a	1.11±0.99 ^b
84일령	0.42±0.51	1.11±1.15
91일령	0.53±0.51	1.05±1.31
98일령	0.26±0.45	1.05±1.58
105일령	0.47±0.51	0.89±1.08
112일령	0.16±0.37 ^a	0.78±0.88 ^b
119일령	0.21±0.43	0.69±0.85
126일령	0.07±0.27 ^a	0.69±1.18 ^b
133일령	0.14±0.36 ^a	0.62±0.77 ^b
140일령	0.14±0.36	0.77±0.93
147일령	0.14±0.36 ^a	0.69±0.75 ^b
154일령	0.14±0.36 ^a	0.69±0.75 ^b
161일령	0.29±0.47	0.62±0.77
168일령	0.29±0.47	0.38±0.65
175일령	0.21±0.58	0.38±0.65

④ B농장 임상 증상 변화

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 49일령, 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령, 91일령에 임상 증상이 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

표 123. B농장 임상 증상 변화^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.25±0.44	0.20±0.41
28일령	0.25±0.44	0.35±0.49
35일령	0.40±0.60	0.40±0.60
42일령	0.25±0.44 ^a	0.95±0.89 ^b
49일령	0.25±0.44 ^a	0.90±0.79 ^b
56일령	0.65±0.59 ^a	1.75±1.55 ^b
63일령	0.20±0.52 ^a	2.00±1.17 ^b
70일령	0.55±0.60 ^a	2.05±1.43 ^b
77일령	0.55±0.69 ^a	1.70±1.17 ^b
84일령	1.00±1.03 ^a	2.20±1.51 ^b
91일령	0.80±0.89 ^a	1.75±1.45 ^b
98일령	0.90±0.79	1.11±0.81
105일령	0.85±0.81	0.74±0.65
112일령	0.60±0.50	0.74±0.73
119일령	0.47±0.52	0.79±0.58
126일령	0.40±0.51	0.79±0.80
133일령	0.47±0.52	0.57±0.51
140일령	0.60±0.63	0.36±0.63
147일령	0.47±0.52	0.21±0.43
154일령	0.53±0.52	0.57±0.76
161일령	0.47±0.52	0.36±0.50
168일령	0.60±0.51	0.50±0.65
175일령	0.60±0.63	0.57±0.85

⑤ C농장 임상 증상 변화

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 35일령, 42일령, 49일령, 56일령, 63일령, 70일령, 119일령, 126일령, 147일령에 임상 증상이 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

표 124. C농장 임상 증상 변화^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.25±0.44	0.35±0.49
28일령	0.40±0.60	0.55±0.51
35일령	0.25±0.64 ^a	1.05±0.69 ^b
42일령	0.45±0.69 ^a	1.25±0.72 ^b
49일령	0.80±1.01 ^a	1.85±0.93 ^b
56일령	0.75±1.45 ^a	1.70±1.53 ^b
63일령	0.32±0.58 ^a	1.68±1.34 ^b
70일령	0.37±0.96 ^a	1.89±1.37 ^b
77일령	1.00±1.45	1.58±1.50
84일령	0.72±0.75	1.06±1.63
91일령	0.44±0.51	0.94±1.14
98일령	0.56±0.70	0.94±1.03
105일령	0.56±0.78	0.47±0.72
112일령	0.50±0.62	0.59±0.71
119일령	0.15±0.38 ^a	0.92±0.90 ^b

126일령	0.15±0.38 ^a	0.92±0.90 ^b
133일령	0.23±0.44	0.58±0.67
140일령	0.23±0.44	0.42±0.67
147일령	0.08±0.28 ^a	0.58±0.67 ^b
154일령	0.15±0.38	0.33±0.65
161일령	0.23±0.44	0.33±0.65
168일령	0.31±0.48	0.42±0.67
175일령	0.23±0.44	0.50±0.80

(2) 체중 변화

① 체중 측정

21일령, 70일령, 112일령, 175일령의 체중을 측정하여 백신군과 대조군의 체중을 비교하였다.

② 체중 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ A농장 체중 측정 결과

A농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 112일령, 175일령에 체중이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 125. A농장 체중 측정 결과(^{a,b}: 유의성 의미)

일령	A농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	5.86±0.52	5.91±0.39	-0.84%
70일령(접종 7주)	24.98±2.47	24.09±1.71	3.56%
112일령(접종 13주)	58.14±3.15^a	52.87±2.35^b	9.98%
175일령(접종 22주)	110.91±4.33^a	101.61±2.62^b	9.16%

④ B농장 체중 측정 결과

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 112일령, 175일령에 체중이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 125. B농장 체중 측정 결과(^{a,b}: 유의성 의미)

일령	B농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	6.05±0.32	6.04±0.58	0.08%
70일령(접종 7주)	24.44±2.22	23.18±2.60	5.16%
112일령(접종 13주)	57.57±2.13^a	51.18±1.40^b	12.47%
175일령(접종 22주)	110.23±5.13^a	100.16±2.03^b	10.05%

⑤ C농장 체중 측정 결과

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 70일령, 112일령, 175일령에 체중이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 126. C농장 체중 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	6.01±0.69	5.98±0.62	0.42%
70일령(접종 7주)	23.82±1.73^a	22.73±1.02^b	6.42%
112일령(접종 13주)	54.96±2.10^a	50.62±1.89^b	8.57%
175일령(접종 22주)	107.58±2.02^a	102.63±3.10^b	4.83%

(3) 일당 증체량

① 일당 증체량 측정 구간

21~70일령, 70~112일령, 112~175일령, 21~175일령의 일당증체량을 계산하여 백신군과 대조군의 일당증체량을 비교하였다.

② 일당 증체량 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

③ A농장 일당 증체량 측정 결과

A농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 70~112일령, 112~175일령, 21~175일령에 일당증체량이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 127. A농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	A농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령	390.82±48.56	371.64±37.14	4.90%
70~112일령	791.58±73.77^a	687.96±62.81^b	9.94%
112~175일령	839.02±71.24^a	776.31±56.59^b	8.08%
21~175일령	678.92±25.55^a	621.68±17.00^b	9.21%

④ B농장 일당 증체량 측정 결과

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 70~112일령, 112~175일령, 21~175일령에 일당증체량이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 128. B농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	B농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령	375.45±46.22 ^a	348.27±55.91 ^b	7.23%
70~112일령	788.64±73.36^a	667.92±68.03^b	9.82%
112~175일령	835.24±67.47^a	775.96±39.59^b	7.64%
21~175일령	676.88±32.40^a	611.27±12.05^b	10.73%

⑤ C농장 일당 증체량 측정 결과

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 70~112일령, 21~175일령에 일당증체량이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 129. C농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	C농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령	362.73±35.06	342.64±23.15	5.53%
70~112일령	742.33±25.76^a	662.61±40.68^b	10.63%
112~175일령	842.86±26.59	826.72±50.58	1.95%
21~175일령	658.19±15.13^a	628.14±20.59^b	4.78%

(3) 폐사율

① 각 농장별 폐사율

A농장의 경우 백신군에서 1두, 대조군에서는 2두가 폐사하였다. B농장의 경우 백신군에서 폐사가 없었고, 대조군에서 1두가 폐사하였다. C농장의 경우 백신군에서 2두, 대조군에서 3두가 폐사하였다.

표 130. 농장별 폐사율

농장	농장별 폐사율 (%)	
	백신군	대조군
A 농장	1/20 (5%)	2/20 (10%)
B 농장	0/20 (0%)	1/20 (5%)
C 농장	2/20 (10%)	3/20 (15%)

② A농장 폐사 원인 분석

표 131. A농장 폐사 두수와 원인

농장	A농장 폐사 두수와 원인	
	백신군	대조군
폐사 두수	1두: 75일령(개체번호 11)	2두: 68일령(개체번호 9), 95일령(개체번호 15)
원인	출혈성 장염(원인 미상)	PCV2d, <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> 에 의한 복합 호흡기 질병 (68일령) <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Truepella pyogens</i> 에 의한 복합 호흡기 질병 (95일령)

③ B농장 폐사 원인 분석

표 132. B농장 폐사 두수와 원인

농장	B농장 폐사 두수와 원인	
	백신군	대조군
폐사 두수	없음	1두: 88일령(개체번호 16)
원인	없음	PCV2d, <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Truepella pyogens</i> 에 의한 복합 호흡기 질병 (88일령)

④ C농장 폐사 원인 분석

표 133. C농장 폐사 두수와 원인

농장	C농장 폐사 두수와 원인	
	백신군	대조군
폐사 두수	2두: 55일령(개체번호 16)와 76일령(개체번호 3)	3두: 54일령 (개체번호 18) 77일령 (개체번호 2) 82일령(개체번호 10)
원인	연쇄상구균성 뇌막염 (55일령)	PCV2d와 <i>Staphylococcus aureus</i> 에 의한 화농성 폐렴(54일령)
	<i>Glässerella parasuis</i> 에 의한 다발성 장막염 (76일령)	PCV2d, <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , <i>Pasteurella multocida</i> 에 의한 복합 호흡기 질병 (77일령, 82일령)

7. PCV2에 대한 면역학적 평가

(1) PCV2 IgG 항체 수준 측정

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주), 70일령(백신 접종 7주), 112일령(백신 접종 13주), 175일령(백신 접종 22주)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 PCV2의 항체를 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

② 검사방법

검사할 혈청을 1:200 으로 희석하여 Ingenasa INgezim Circo IgG ELISA 키트의 plate well에 100 μ l 씩 분주하고, 양성 대조군 및 음성 대조군 샘플을 각 2개의 well에 100 μ l 씩 분주한다. 검사할 각 well을 필름으로 덮고 실온에서 1시간 동안 보관하여 반응 시킨 후 세척액으로 4회 반복 세척한다. Peroxidase가 표지된 conjugate 용액을 100 μ l 씩 각 well에 분주하고 실온에서 30분 동안 보관한다. 각 well을 6회 세척한 후 substrate (TMB)를 각 well에 100 μ l 씩 분주하고 빛을 차단 한 후 10분간 상온에서 보관한다. 반응 중지 용액(Stop solution)을 100 μ l 분주하여 반응을 멈추고 5분 이내에 450 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정한다. 양성대조군의 OD 값이 0.70 이상, 음성 대조군의 OD 값이 0.35 이하 일 때 유효한 값으로 간주한다. 음성 Cut off는 음성대조군 OD 값 + 0.20 이며 이보다 낮은 샘플은 음성으로 판정하고, 양성 Cut off는 음성대조군 OD 값 + 0.25 이며 이보다 높은 샘플은 양성으로 판정한다. 두 개의 Cut off 사이의 결과를 갖는 샘플은 의심으로 판정한다.

③ PCV2 IgG 항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

④ A농장 PCV2 IgG 항체 결과

A농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2에 대한 IgG 항체 수준이 유의적($P < 0.05$)으로 높았다.

표 134. A농장 PCV2 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 PCV2 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.24±0.07	0.24±0.08	0.66%
49일령 (접종 4주)	0.47±0.14^a	0.30±0.07^b	55.35%
70일령(접종 7주)	0.73±0.14^a	0.44±0.09^b	64.77%
112일령(접종 13주)	1.23±0.22^a	0.79±0.20^b	55.72%
175일령(접종 22주)	1.24±0.17^a	0.73±0.25^b	69.59%

⑤ B농장 PCV2 IgG 항체 결과

B농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2에 대한 IgG 항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 135. B농장 PCV2 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 PCV2 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.23±0.08	0.27±0.06	-15.19%
49일령 (접종 4주)	0.49±0.20^a	0.29±0.14^b	69.95%
70일령(접종 7주)	0.86±0.23^a	0.43±0.20^b	97.81%
112일령(접종 13주)	1.02±0.16^a	0.74±0.34^b	37.64%
175일령(접종 22주)	1.17±0.25^a	0.80±0.35^b	45.38%

⑥ C농장 PCV2 IgG 항체 결과

C농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2에 대한 IgG 항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 136. C농장 PCV2 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 PCV2 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.26±0.07	0.28±0.06	-7.9%
49일령 (접종 4주)	0.45±0.19^a	0.29±0.12^b	53.6%
70일령(접종 7주)	0.86±0.22^a	0.57±0.12^b	49.73%
112일령(접종 13주)	1.38±0.23^a	0.86±0.28^b	60.03%
175일령(접종 22주)	1.24±0.19^a	0.74±0.38^b	66.34%

(2) PCV2 중화항체 수준 측정

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주), 70일령(백신 접종 7주), 112일령(백신 접종 13주), 175일령(백신 접종 22후)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 중화항체 수준을 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

② 중화항체 검사에서 사용한 Anti PCV2 polyclonal antibody

중화항체 검사 측정 할 때 필요한 anti PCV2 polyclonal antibody는 Veterinary Diagnostic laboratory, Iowa State University, Ames, Iowa, USA를 사용하였다[5].

③ 중화항체 검사에서 사용한 양성 대조군 혈청

중화항체 검사 측정 할 때 필요한 양성 대조군 혈청은 PCV2d를 접종하여 중화항체를 형성한 혈청을 양성 대조군으로 사용하였다[4].

④ 검사방법

검사 전에 60℃에서 40분간 Heat inactivation 하여 혈청 내 바이러스를 모두 불활화 시킨다. 또한 실험의 최적화를 위해 접종 바이러스의 양을 100, 200, 400 TCID₅₀ 으로 나누어 시행하고 접종 시간도 36, 48, 72시간으로 나누어 시행하여 최적 조건을 잡는다. 먼저 96 well plate에 검사할 혈청을 2¹~2¹² 까지 2배씩 DMEM 배지[Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% l-glutamine, 10,000 U/ml of penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 3% non-essential amino acids]로 희석하여 분주한다. 접종할 PCV2d strain (SNUVR140004)을 위에 기술한 TCID₅₀ titer 대로 50 µl씩 각 well에 분주하고 1시간 배양 후, 2×10⁴ freshly trypsinised Swine Kidney (SK) cell을 각 well에 분주한다. 36, 42, 72 시간동안 각각 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양한다.

세포는 PBS로 2회 washing 하고 4% Paraformaldehyde를 50 µl씩 분주하여 30분간 고정시킨다. 이 후 다시 PBS로 2회 washing 한 뒤 0.1% Triton X-100을 50 µl씩 분주하고 10분간 상온에서 배양시킨다. Anti-PCV2 polyclonal antibody 200배 희석액 [phosphate-buffered saline 포함 0.1% Tween 20 (PBS-Tween)]을 각 well에 분주하고 37℃에서 1시간 배양한다. 다시 PBS로 2회 washing 한 후, anti-rabbit polyclonal antibody (AP)를 분주하고 37℃에서 1시간 배양한다. 이후 최종적으로 Fast red 시약을 이용하여 발색을 확인한다. 각각의 혈청 샘플은 정확성을 위해 2개씩 실험하며 확실한 PCV2 중화항체가 포함된 샘플을 양성 대조군으로 둔다. 또 DMEM 배지만을 음성대조군으로 둔다. 바이러스 접종액은 미리 titer를 정량화하여야한다. 판독을 위해 100배 현미경을 이용한다. 무작위로 well 상의 3군데를 선정하여 세포의 핵 혹은 세포질 혹은 핵과 세포질 모두가 염색된 세포의 개수를 수량화한다.

⑤ 중화항체 판정 기준

$\%VN = [1 - (\text{두개의 동일 혈청샘플 분주 well에서 측정된 양성 세포수의 평균} / \text{음성 대조군에서 측정된 양성 세포수})] \times 100$

%VN이 50 이상을 양성인 최대 혈청역가로 정하고 이때 가장 희석된 배수의 역수를 중화항체가로 정해 VNT₅₀이라 칭한다.

이 실험은 다음의 세 가지 기준을 부합해야 유효하다. 첫째 양성대조군은 예상되는 항체가와 2배 이상 차이가 나면 안 된다. 둘째, 각 Plate의 12개 음성대조군은 차이가 20% 이하이어야 한다. 셋째, 접종한 바이러스는 100~500 TCID₅₀/well 사이 titer이어야한다.

⑥ 중화항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

⑦ A농장 PCV2d 중화항체 결과

A농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2d에 대한 중화항체 수준이 유의적(P<0.05)으로 높았다.

표 137. A농장 PCV2d 중화항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 PCV2d 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0%
49일령 (접종 4주)	2.90±0.55 ^a	0.40±0.68 ^b	625%
70일령(접종 7주)	4.25±0.77 ^a	2.00±0.67 ^b	112.5%
112일령(접종 13주)	6.21±0.83 ^a	3.22±0.88 ^b	92.74%
175일령(접종 22주)	5.57±0.73 ^a	3.08±0.49 ^b	81.07%

⑧ B농장 PCV2d 중화항체 결과

B농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2d에 대한 중화항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 138. B농장 PCV2d 중화항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 PCV2d 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0%
49일령 (접종 4주)	3.05±0.60 ^a	0.15±0.37 ^b	1933.33%
70일령(접종 7주)	4.90±0.97 ^a	2.65±0.59 ^b	84.91%
112일령(접종 13주)	6.05±0.94 ^a	2.58±0.77 ^b	134.59%
175일령(접종 22주)	5.80±0.68 ^a	2.64±0.63 ^b	119.46%

⑨ C농장 PCV2d 중화항체 결과

C농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2d에 대한 중화항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 139. C농장 PCV2d 중화항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 PCV2d 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0%
49일령 (접종 4주)	3.20±0.41 ^a	0.25±0.44 ^b	1180%
70일령(접종 7주)	5.16±0.76 ^a	2.58±1.35 ^b	100%
112일령(접종 13주)	6.22±0.81 ^a	3.82±0.95 ^b	62.74%
175일령(접종 22주)	5.62±0.51 ^a	3.17±0.83 ^b	77.33%

(3) PCV2 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주), 70일령(백신 접

중 7주), 112일령(백신 접종 13주), 175일령(백신 접종 22주)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 PCV2 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정을 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

② 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

21일령, 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에 채취한 혈액을 이용하여 EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution (HBSS)에 희석한다. 희석한 혈액 4ml를 15ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나뉘게 한다. 18~20°C에서 400 g의 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

③ IFN-γ 분비 세포 수 측정

PCV2 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시한다[7]. 분리된 말초혈액 단핵구를 PCV2d 항원으로 자극하여 IFN-γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN-γ 단클론 항체를 8.3 μg/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1x10⁷ cell/ml의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1x10⁶ cell/ml 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 PCV2 항원 4 μg/ml의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN-γ 1차 항체를 50 μl 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μl씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μl씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

④ IFN-γ-SC 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

⑤ A농장 PCV2d IFN-γ-SC 결과

A농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령과 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2d에 대한 IFN-γ-SC 수준이 유의적(P<0.05)으로 높았다.

표 140. A농장 PCV2d IFN-γ-SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 PCV2d IFN-γ-SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	15.70±3.63	14.55±2.91	7.9%
49일령 (접종 4주)	32.20±3.29 ^a	19.35±5.52 ^b	66.41%
70일령(접종 7주)	71.35±15.14 ^a	42.11±6.22 ^b	69.46%
112일령(접종 13주)	87.05±9.48 ^a	69.61±13.23 ^b	25.06%
175일령(접종 22주)	74.71±9.09 ^a	51.15±9.83 ^b	46.06%

⑥ B농장 PCV2d IFN-γ-SC 결과

B농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령과 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2d에 대한 IFN-γ-SC 수준이 유의적(P<0.05)으로 높았다.

표 141. B농장 PCV2d IFN- γ -SC 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	B농장 PCV2d IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	13.40±4.24	14.35±2.94	-6.62%
49일령 (접종 4주)	32.50±6.59 ^a	20.65±5.70 ^b	57.38%
70일령(접종 7주)	77.60±12.71 ^a	34.80±7.37 ^b	122.99%
112일령(접종 13주)	85.75±9.15 ^a	59.00±14.00 ^b	45.34%
175일령(접종 22주)	70.40±12.79 ^a	40.50±6.31 ^b	73.83%

⑦ C농장 PCV2d IFN- γ -SC 결과

C농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령과 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 PCV2d에 대한 IFN- γ -SC 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 142. C농장 PCV2d IFN- γ -SC 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	C농장 PCV2d IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	14.00±3.01	16.35±3.33	-14.37%
49일령 (접종 4주)	29.25±9.28 ^a	18.25±2.88 ^b	60.27%
70일령(접종 7주)	69.53±6.86 ^a	35.26±14.48 ^b	97.16%
112일령(접종 13주)	94.50±5.29 ^a	61.53±8.00 ^b	56.59%
175일령(접종 22주)	76.15±5.52 ^a	43.00±9.40 ^b	77.1%

8. Mhp에 대한 면역학적 평가

(1) Mhp IgG Ab 측정

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주), 70일령(백신 접종 7주), 112일령(백신 접종 13주), 175일령(백신 접종 22주)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 마이코플라즈마의 항체를 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

② ELISA 검사

채취한 혈액의 마이코플라즈마에 대한 특이적인 항체는 상용화된 Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test Kit (The HerdChek M.hyo, Westbrook, ME, USA)로 측정한다.

③ 검사 방법

측정하기 10~20분 전에 Mhp ELISA kit를 미리 상온에 둔다. 항원이 흡착된 plate에 원액의 양성대조혈청 및 음성대조혈청을 100 μ l씩 각 2개의 well에 분주하고, 가검물 혈청을 40배 희석하여 각각 100 μ l씩 분주한다. 실온(18~25°C)에서 30분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 상층액을 제거하고 1x 세척액을 350 μ l씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척한다. 세척 후에 HRP anti-porcine IgG conjugate를 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 상층액을

제거하고 1x 세척액을 350 μl 씩 분주하여 털어버리는 방법으로 3회 세척한다. 세척 후에 TMB 발색제를 각 well에 100 μl 씩 분주하고 15분간 실온에서 반응시킨다. 반응이 끝나면 정지액을 각 well에 1.0 ml씩 분주하여 반응을 정지시키고 ELISA reader에서 650nm의 흡광도로 측정한다. 결과는 S/P값이 0.4이상일 경우 양성으로 판정하며, 본 실험에서는 SP값의 변화 추이를 비교한다.

④ 마이코플라스마 ELISA 검사항체 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

⑤ A농장 Mhp IgG 항체 결과

A농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령 에서 백신군이 대조군에 비하여 Mhp에 대한 IgG 항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 143. A농장 Mhp IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 Mhp IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.24±0.09	0.22±0.10	6.47%
49일령 (접종 4주)	0.50±0.12^a	0.30±0.12^b	67.25%
70일령(접종 7주)	0.88±0.18^a	0.49±0.11^b	79.05%
112일령(접종 13주)	1.08±0.11^a	0.61±0.12^b	77.88%
175일령(접종 22주)	1.24±0.12^a	0.75±0.13^b	65.64%

⑥ B농장 Mhp IgG 항체 결과

B농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령 에서 백신군이 대조군에 비하여 Mhp에 대한 IgG 항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 144. B농장 Mhp IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 Mhp IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.22±0.11	0.26±0.11	-14.67%
49일령 (접종 4주)	0.50±0.12^a	0.32±0.13^b	59.10%
70일령(접종 7주)	0.90±0.14^a	0.54±0.09^b	65.51%
112일령(접종 13주)	1.04±0.24^a	0.57±0.09^b	81.38%
175일령(접종 22주)	1.03±0.31^a	0.67±0.14^b	53.02%

⑦ C농장 Mhp IgG 항체 결과

C농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령 에서 백신군이 대조군에 비하여 Mhp에 대한 IgG 항체 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 145. C농장 Mhp IgG 항체 결과^(a,b): 유의성 의미)

일령	C농장 Mhp IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.25±0.11	0.26±0.10	-2.90%
49일령 (접종 4주)	0.51±0.11 ^a	0.34±0.14 ^b	52.14%
70일령(접종 7주)	0.93±0.18 ^a	0.53±0.14 ^b	74.05%
112일령(접종 13주)	1.34±0.23 ^a	0.71±0.17 ^b	87.46%
175일령(접종 22주)	1.16±0.18 ^a	0.73±0.19 ^b	58.80%

(2) Mhp 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주), 70일령(백신 접종 7주), 112일령(백신 접종 13주), 175일령(백신 접종 22주)에 혈액을 채취하여 마이코플라스마에 특이적인 인터페론 감마 분비 세포를 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교한다.

② 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 Hank's balanced salt solution (HBSS)과 희석한다. 희석한 혈액 4ml를 15ml tube에 준비한 Ficoll-Paque 3 ml 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나누게 한다. 18~20°C에서 400 g의 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한다. 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취한다. 채취된 말초혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용한다.

③ IFN-γ 분비 세포 수 측정

Mhp 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시한다[7]. 분리된 말초혈액 단핵구를 Mhp 항원으로 자극하여 IFN-γ 분비세포의 수를 확인한다. 상용화되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN-γ 단클론 항체를 8.3 μg/ml 분주하여 24시간 부착시킨다. 분리된 PBMC를 10% FBS를 포함한 RPMI 배지에 1x10⁷ cell/ml의 농도로 희석한다. 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1x10⁶ cell/ml 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 Mhp 항원 4.0 μg/ml의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37°C에서 20시간 반응시킨다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN-γ 1차 항체를 50 μl 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 각각의 well을 PBTS로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μl씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μl씩 분주하여 발색시키고 ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정한다.

④ IFN-γ-SC 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

⑤ A농장 Mhp IFN-γ-SC 결과

A농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령과 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 Mhp에 대한 IFN-γ-SC 수준이 유의적(P<0.05)으로 높았다.

표 146. A농장 Mhp IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 Mhp IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	14.05±4.27	14.45±3.83	-2.77%
49일령 (접종 4주)	28.05±7.72^a	18.40±7.16^b	52.45%
70일령(접종 7주)	38.70±11.28^a	28.63±5.29^b	35.17%
112일령(접종 13주)	65.05±11.52^a	37.56±7.76^b	73.22%
175일령(접종 22주)	54.86±7.08^a	29.77±6.23^b	84.27%

⑥ B농장 Mhp IFN- γ -SC 결과

B농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령과 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 Mhp에 대한 IFN- γ -SC 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 147. B농장 Mhp IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 Mhp IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	12.40±3.75	12.20±4.23	1.64%
49일령 (접종 4주)	32.50±4.33^a	16.25±5.07^b	100%
70일령(접종 7주)	42.35±15.24^a	26.60±6.75^b	59.21%
112일령(접종 13주)	62.50±11.26^a	31.05±9.63^b	101.27%
175일령(접종 22주)	61.47±10.93^a	30.29±6.87^b	102.96%

⑦ C농장 Mhp IFN- γ -SC 결과

C농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령과 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 Mhp에 대한 IFN- γ -SC 수준이 유의적($P<0.05$)으로 높았다.

표 148. C농장 Mhp IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 Mhp IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	13.05±3.98	14.45±4.35	-9.69%
49일령 (접종 4주)	33.50±4.54^a	19.55±8.45^b	71.36%
70일령(접종 7주)	41.84±16.98^a	31.58±6.20^b	32.50%
112일령(접종 13주)	57.78±12.46^a	34.06±9.33^b	69.64%
175일령(접종 22주)	45.15±11.65^a	32.25±6.41^b	40.01%

9. 바이러스 및 미생물학적 평가

(1) 혈중 PCV2 항원 정량 분석

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주), 70일령(백신 접종 7주), 112일령(백신 접종 13주), 175일령(백신 접종 22주)의 혈액을 채취하여 혈중에서 PCV2의 DNA 함량을 정량 측정하는 실시간 중합효소 연쇄반응(realtime PCR)을 실시한다.

② 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시한다[14]. PCV2d ORF2를 확인하기 위하여 Primer 쌍(전방향: 5' GTATTCAAAGGGCACAGTGAGG, 역방향: 5' GCACC ATCGGTTATACTGTCAAGAAA)과 PCV2d에 특이적인 Probe (FAM™ 5'CAT CATGTCCACATTCCAG)을 이용한다. TOPcloner Blunt kit (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCV2d ORF2를 vector (Enzynomics)에 삽입 후 spectrophotometer를 이용하여 표준커브(Standard curve)를 구한다. PCR은 96-well plate를 이용한다. 시료에서 추출한 DNA 2.5 μl를 주형으로, 12.5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 10 μm 농도의 두 종류의 primer 각각 1.0 μl, 10 μm 농도의 probe 0.5 μl, 그리고 7.5 μl 증류수를 혼합하여 최종 25 μl를 만든다. 반응은 universal 조건으로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 반응 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 총 40회 반복하여 반응시킨다. 각 반응마다 양성과 음성 대조를 샘플과 함께 반응시킨다. 반응 종료 후 PCR의 특이도를 확인하기 위하여 각 반응 산물의 해리 곡선(melting curve)을 측정한다. 샘플의 cycle threshold level이 40 미만이라면 양성으로 판단한다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 Ct값을 표준커브(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/ml을 산정한다.

③ 혈중 PCV2 항원 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

④ A농장 혈중 PCV2d 항원 수준 결과

A농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 혈중 PCV2d 항원 수준이 유의적(P<0.05)으로 낮았다.

표 149. A농장 혈중 PCV2d 항원 수준 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 혈중 PCV2d 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령 (백신 접종)	0.33±1.50	0.28±1.26	-12.20%
49일령 (접종 4주)	1.21±2.53^a	3.51±3.10^b	99.50%
70일령(접종 7주)	1.89±3.02^a	4.47±2.89^b	99.74%
112일령(접종 13주)	1.02±2.44^a	3.43±3.26^b	99.61%
175일령(접종 22주)	0.31±1.16^a	2.11±2.81^b	98.42%

⑤ B농장 혈중 PCV2d 항원 수준 결과

B농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 혈중 PCV2d 항원 수준이 유의적(P<0.05)으로 낮았다.

표 150. B농장 혈중 PCV2d 항원 수준 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 혈중 PCV2d 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.34±1.52	0.68±2.11	54.29%
49일령 (접종 4주)	1.55±2.82^a	3.84±3.07^b	99.49%
70일령(접종 7주)	1.74±2.80^a	4.74±2.64^b	99.90%
112일령(접종 13주)	1.82±2.63^a	4.17±2.69^b	99.55%
175일령(접종 22주)	0.84±1.75^a	2.87±3.04^b	99.07%

⑥ C농장 혈중 PCV2d 항원 수준 결과

C농장의 경우 49일령, 70일령, 112일령에서 백신군이 대조군에 비하여 혈중 PCV2d 항원 수준이 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

표 151. C농장 혈중 PCV2d 항원 수준 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 혈중 PCV2d 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.31±1.37	51.02%
49일령 (접종 4주)	0.82±2.03^a	3.51±3.39^b	99.8%
70일령(접종 7주)	2.00±2.76^a	4.20±3.10^b	99.37%
112일령(접종 13주)	1.65±2.42^a	3.83±3.04^b	99.34%
175일령(접종 22주)	1.65±2.62	1.78±2.67	25.87%

(2) 비강 Mhp 항원 미생물적 평가

① 비강 면봉 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신 접종), 49일령(백신접종 4주후), 70일령(백신 접종 7주후), 112일령(백신 접종 13주후), 175일령(백신 접종 22주후)의 비강을 채취하여 마이코플라스마의 DNA 함량을 정량 측정하는 실시간 중합효소 연쇄반응(realtime PCR)을 실시한다.

② 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 primers와 probes는 이미 발표된 논문인을 참고하여 진행한다[8]. 이 논문에서 *Mycoplasma hyopneumoniae*를 탐지하기 위한 primer 및 probe는 Primer Express™ (Applied Biosystems) software를 이용하여 디자인한다. Classical TaqMan™ probe는 5'쪽에 FAM™-dye를, 3'쪽에 TAMRA™-dye로 표지되어 있는데 실험에 사용할 probe (5' TGTCCACTGCTGCAAATATTC GATTCTTGAA 3'; nucleotides 790~821)와 프라이머(전방향 5' TTGACTGCTATCTTTGCACGATAAG 3', nucleotides 740~764; 역방향 5' ACAATAATTGCTGACCGTGGC 3', nucleotides 843~821)를 이용한다. ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)을 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행한다. TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 25μl reaction mixture에 최적화된 primer농도인 300 nM를 Forward와 Reverse로 각각 분주하고, TaqMan™ probe의 100 nM을 분주시킨다. 양성 대조군으로서 AB (Applied Biosystems)에서 제공하는 TaqMan™ Exogenous Positive Control reagents를 모든 반응실험에 사용한다. 각각의 실험은 standard TaqMan™ thermal cycling parameters를 이용하여 측정하며, The Sequence Detection System 1.7 software (Applied Biosystems)를 결과자료 분석을 위해 이용한다.

③ 실시간 중합효소 연쇄반응 판정 기준

*Mycoplasma hyopneumoniae*의 chromosomal DNA의 1 femtogram이 1개의 genome을 의미한다[22]. 본 시험에서 사용한 *M. hyopneumoniae*에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응의 민감도는 1.4 femtogram까지 검출할 수 있다. 따라서 *M. hyopneumoniae*의 chromosomal DNA의 1.4 femtogram을 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하였을 때 Ct값 '38'이 되어 이 수치를 기준으로 38 이상이면 음성으로 하고, 이하이면 genomic copy 수를 계산하였다.

④ 비강 마이코플라스마 항원 수준 통계학적 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

⑤ A농장 비강 Mhp 항원 수준 결과

A농장의 경우 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 비강 Mhp 항원 수준이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 152. A농장 비강 Mhp 항원 수준 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 혈중 Mhp 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0%
49일령 (접종 4주)	0.44±0.95	0.81±1.36	57.34%
70일령(접종 7주)	0.54±1.13^a	2.07±2.18^b	97.05%
112일령(접종 13주)	0.59±0.98^a	2.96±2.28^b	99.57%
175일령(접종 22주)	0.36±0.97^a	2.08±2.02^b	98.09%

⑥ B농장 비강 Mhp 항원 수준 결과

B농장의 경우 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 비강 Mhp 항원 수준이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 153. B농장 비강 Mhp 항원 수준 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 비강 Mhp 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0%
49일령 (접종 4주)	0.26±0.64	0.74±1.42	66.89%
70일령(접종 7주)	0.82±1.70	1.77±2.02	88.78%
112일령(접종 13주)	1.07±1.84^a	2.65±2.41^b	97.37%
175일령(접종 22주)	0.68±1.47^a	2.25±2.42^b	97.31%

⑦ C농장 비강 Mhp 항원 수준 결과

C농장의 경우 70일령, 112일령, 175일령에서 백신군이 대조군에 비하여 비강 Mhp 항원 수준이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 154. C농장 비강 Mhp 항원 수준 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 비강 Mhp 항원 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령 (백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	0%
49일령 (접종 4주)	0.57±1.18	0.86±1.64	48.71%
70일령(접종 7주)	0.47±1.11^a	1.74±1.71^b	94.63%
112일령(접종 13주)	1.05±1.25^a	2.77±2.26^b	98.09%
175일령(접종 22주)	0.64±1.03^a	2.83±1.89^b	99.35%

11. 병리학적 평가

(1) 병리조직 샘플

① 16주령 돼지 병리 샘플 조직 채취

야외 임상 실험의 종료 시점은 16주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두씩을 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 각각의 주요 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 림프절, 편도 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

② 25주령 돼지 병리 샘플 조직 채취

야외 임상 실험의 종료 시점은 25주령에서 각각의 농장에서 백신군 10두와 대조군 10두씩을 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 각각의 주요 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜 림프절, 편도 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정한다.

(2) PCV2 관련 병리학적 평가

① PCV2 관련 병리조직학적 평가

포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시한다. H&E 염색이 된 장기는 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰한다. 또한 서혜 림프절의 경우 임파구의 감소(lymphoid depletion)의 정도에 따라 0~5등급으로 구분하며, 매우 심하고 육아종성 염증을 동반한 경우 '스코어 5', 매우 심한(severe) 경우 '스코어 4', 아주 심한(severe) 경우 '스코어 3', 중등도(moderate)의 경우 '스코어 2', 경미한(mild)의 경우 '스코어 1', 전혀 병변이 없는 경우 '스코어 0'으로 표시한다[18].

(3) Mhp 관련 병리학적 평가

① Mhp 관련 육안 폐렴 병변 평가

육안적으로 폐렴 병변은 폐의 각각의 엽의 부피비와 폐의 ventral과 dorsal 부분으로 나누어서 각각 배점을 정한다[24]. 우선 ventral Lt-anterior는 5점, ventral Rt-anterior는 5점, ventral Lt-middle는 5점, ventral Rt-middle는 5점, ventral Lt-causal는 12.5점, ventral Rt-causal는 12.5점, ventral accessory는 5점, dorsal Lt-anterior는 5점, dorsal Rt-anterior는 5점, dorsal Lt-middle는 5점, dorsal Rt-middle는 5점, dorsal Lt-causal는 15점, dorsal Rt-causal는 15점으로 배점하여 각각의 부위에서 병변의 스코어를 관찰한다.

② Mhp 관련 병리조직학적 평가

Mhp에 의한 폐렴의 병변은 병변의 정도에 따라 0~6등급으로 구분한다[9]. 개체별로 H&E 슬라이드 5장씩 제작하여 이들 슬라이드에서, 폐포벽의 비후정도, 폐포강의 염증 정도, 세기관지와 기관지 주의 림프구의 비후를 종합적으로 분석하여 0 ~ 6등급으로 결과를 판독하였는데, 정상인 경우 '스코어 0', 경미한 다발성(mild multifocal)의 경우 '스코어 1', 경미한 미만성(mild diffuse)의 경우 '스코어 2', 중등도 다발성(moderate multifocal)의 경우 '스코어 3', 중등도 미만성(moderate diffuse)의 경우 '스코어 4', 심한 다발성(moderate multifocal)의 경우 '스코어 5', 심한 미만성(severe diffuse)의 경우 '스코어 6'으로 표시한다.

(3) 병리학적 평가 통계분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(4) PCV2 관련 림프절 병리조직학적 병변 변화

① A농장 림프절 병변 변화

A농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 림프절 병변이 유의적($P < 0.05$)으로 낮았다.

표 155. A농장 림프절 병리조직학적 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 림프절 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.16±0.67 ^a	2.40±0.20 ^b	51.67%
25주령 (175일령, 접종 22주)	0.54±0.54 ^a	2.24±0.72 ^b	75.89%

② B농장 림프절 병변 변화

B농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 림프절 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 156. B농장 림프절 병리조직학적 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 림프절 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	0.80±0.32 ^a	2.56±0.26 ^b	68.75%
25주령 (175일령, 접종 22주)	0.88±0.69 ^a	2.82±0.86 ^b	68.79%

③ C농장 림프절 병변 변화

C농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 림프절 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 157. C농장 림프절 병리조직학적 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 림프절 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.68±0.30 ^a	2.76±0.78 ^b	39.13%
25주령 (175일령, 접종 22주)	0.74±0.60 ^a	2.12±0.65 ^b	33.93%

(5) Mhp 관련 육안 폐렴 병변 변화

① A농장 육안 폐렴 병변 변화

A농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 육안 폐렴 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 158. A농장 육안 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	A농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	14.0±8.22 ^a	38.0±8.37 ^b	63.16%
25주령 (175일령, 접종 22주)	18.5±14.54 ^a	48.8±14.97 ^b	63.10%

② B농장 육안 폐렴 병변 변화

B농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 육안 폐렴 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 159. B농장 육안 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	B농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	14.0±11.40 ^a	46.5±12.54 ^b	69.89%
25주령 (175일령, 접종 22주)	20.0±22.61 ^a	64.6±16.67 ^b	69.04%

③ C농장 육안 폐렴 병변 변화

C농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 육안 폐렴 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 160. C농장 육안 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	C농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	23.0±16.05 ^a	58.0±14.40 ^b	60.34%
25주령 (175일령, 접종 22주)	24.5±26.71 ^a	58.3±25.2 ^b	57.98%

(6) Mhp 관련 병리조직학적 폐렴 병변 변화

① A농장 병리조직학적 폐렴 병변 변화

A농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 병리조직학적 폐렴 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 161. A농장 병리조직학적 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	A농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.20±0.79 ^a	2.96±0.59 ^b	59.46%
25주령 (175일령, 접종 22주)	1.34±0.79 ^a	3.40±0.71 ^b	60.59%

② B농장 병리조직학적 폐렴 병변 변화

B농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 병리조직학적 폐렴 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 162. B농장 병리조직학적 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	B농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.40±0.89 ^a	3.72±0.48 ^b	62.37%
25주령 (175일령, 접종 22주)	1.60±0.98 ^a	3.82±0.86 ^b	58.12%

③ C농장 병리조직학적 폐렴 병변 변화

C농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령) 모두 백신군이 대조군에 비하여 병리조직학적 폐렴 병변이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 163. C농장 병리조직학적 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	C농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.20±0.79 ^a	3.96±0.75 ^b	69.70%
25주령 (175일령, 접종 22주)	1.08±0.95 ^a	2.08±0.72 ^b	48.08%

12. 조직 병변에서 PCV2 항원 증식 확인

(1) 조직 병변에서 PCV2 항원 확인

야외 임상 시험을 실시한 3개 농장 16주령의 백신군 5두와 대조군 5두씩과 25주령 백신군 5두와 대조군 5두씩을 임의로 선정해 안락사 시키고, 채취한 서혜임파절에서 면역조직화학법을 통해 이들 장기의 병변에서 PCV2 항원의 증식 정도를 백신군과 대조군에서 비교 확인한다.

(2) 면역조직화학법 검사 방법

면역염색법은 이미 많은 문헌에서 사용한 PCV2에 대한 다클론성 항체 (polyclonal antibody)를 사용한다[17]. 면역조직화학법의 실시 방법도 이미 발표되어 있는 방법대로 시행한다[15, 16]. 슬라이드 상의 조직 절편을 xylene으로 탈파라핀 후, 100%, 70%, 50% 알코올로 점진적으로 함수 시킨다. 3차 증류수 1분, PBST (0.1% Tween 20이 포함된 PBS) 5분 세척 후, 항원 노출을 위해 1:200으로 희석한 proteinase K (Promega)를 37°C 에서 25분간 처리한다. 내인성 alkaline phosphatase 제거를 위해 20% glacial acetic acid를 4°C에서 2분간 처리한 후 비특이 반응 억제제를 위해 5% normal goat serum을 15분간 실온에서 처리한다. 슬라이드 상의 goat serum을 버리고 PBST에 1:200으로 희석된 polyclonal rabbit anti-PCV2 1차 항체를 조직을 덮을 정도로 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 슬라이드를 PBST로 세척 후, alkaline phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit (Dako) 2차 항체를 PBST에 1:250으로 희석하여 분주하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응 후 PBST로 세척하고, Fast red tablet (Roche)으로 발색하여 PCV2 항원을 확인한다. 발색이 충분히 나타나면 3차 증류수로 세척하여 발색을 끝내고, Mayer's Hematoxylin으로 배경을 염색하고 crystal mount로 조직을 덮어 현미경으로 관찰한다.

(3) PCV2 항원 분석방법

PCV2를 접종한 그룹에서 채취한 서혜림프절을 이용하여 면역염색법을 실시한다. 분석방법은 이미 문헌에 보고된 방법을 사용한다[18]. 면역조직화학법을 종료한 서혜림프절 조직을 현미경상에서 임의로

0.25 mm²의 면적을 3곳 정하여 PCV2 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세고, 각 그룹간 PCV2에 대한 양성감염세포수를 통계 처리하여 2개 그룹간의 양성감염 세포 수의 차이를 비교한다.

(4) 림프절에서 PCV2 항원 통계 분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's *t*-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석한다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주한다.

(5) 림프절 PCV2 항원 수준

① A농장 림프절 PCV2 항원 수준

A농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령)에서 모두 백신군이 대조군에 비하여 림프절에서 PCV2 항원이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 164. A농장 림프절 PCV2 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 림프절 PCV2 항원 수준 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.40±1.79 ^a	9.47±5.93 ^b
25주령 (175일령, 접종 22주)	0.60±0.83 ^a	4.53±2.47 ^b

② B농장 림프절 PCV2 항원 수준

B농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령)에서 모두 백신군이 대조군에 비하여 림프절에서 PCV2 항원이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 165. B농장 림프절 PCV2 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 림프절 PCV2 항원 수준 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
16주령 (112일령, 접종 13주)	3.13±3.86 ^a	9.07±0.43 ^b
25주령 (175일령, 접종 22주)	0.40±0.89 ^a	3.73±2.54 ^b

③ C농장 림프절 PCV2 항원 수준

C농장의 경우 16주령(112일령)과 25주령(175일령)에서 모두 백신군이 대조군에 비하여 림프절에서 PCV2 항원이 유의적($P<0.05$)으로 낮았다.

표 167. C농장 림프절 PCV2 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 림프절 PCV2 항원 수준 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
16주령 (112일령, 접종 13주)	2.00±1.39 ^a	9.13±6.31 ^b
25주령 (175일령, 접종 22주)	0.60±1.34 ^a	3.67±2.32 ^b

마. PRRS-NA 생독 백신 야외임상시험 결과

(전반부: 3주령~16주령 & 후반부: 16주령~25주령)

1. 임상 시험 농장 선정

(1) 시험 농장과 공시돈 선정 및 실험군 선정

① 시험농장 A(흙선농장)

a. 농장 자돈 백신 프로그램

2주령에 PRRS 백신, 3주령에 마이코플라즈마 백신 및 써코백신, 7주령에 돼지단콜 백신, 8주령과 12주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 A는 2020년 2월 14일경에 농장의 7주령 전후의 자돈에서 호흡기를 동반한 위축이 발병하여 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 폐장과 림프절에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 연쇄상구균도 폐장에서 분리되었다. 또한 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변이 관찰되었다.

② 시험농장 B(대진농장)

a. 농장 자돈 백신 프로그램

2주령에 PRRS 백신, 3주령에 써코 백신과 마이코플라즈마 백신, 8주령에 돼지열병 백신, 8주령과 12주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 B는 2020년 2월 14일경에 농장의 6~8주령 사이의 자돈에서 호흡기를 동반한 위축이 발병하여 2두를 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 2두 모두에서 폐장과 림프절에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 글레서씨병을 유발하는 헤모필러스균도 폐장에서 분리되었다. 또한 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변이 관찰되었다.

③ 시험농장 C(장미농장)

a. 농장 자돈 백신 프로그램

1주령에 마이코플라즈마 백신, 3주령에 써코 백신, 8주령에 돼지열병 백신, 8주령과 10주령에 구제역 백신을 접종하고 있다.

b. 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악

시험농장 C는 2020년 5월 6일경에 이유자돈의 위축으로 인해 부검장기인 폐장과 비장을 서울대학교에 의뢰하였다. 검사결과 폐장에서 북미형과 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 모두 검출되었으며, 비장에서는 살모넬라균이 분리되었다. 또한 바이러스 감염 때에 관찰되는 전형적인 간질성 폐렴 병변이 관찰되었다.

(2) 백신 바이러스와 야외 임상 농장 분리 바이러스의 아미노산 배열 유사성

시험농장 3개의 호흡기 증상을 보이는 자돈의 폐장에서 북미형 PRRS 바이러스를 분리하여 open reading frame (ORF) 5의 nucleotide 배열 순서를 분석하였고, 이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신주와 유전자 정보의 상관성을 분석하였다. 시험농장A에서 분리한 북미형 바이러스는 백신주와 85.4%, 시험농장B에서 분리한 북미형 바이러스는 백신주와 85.7%, 시험농장C에서 분리한 북미형 바이러스는 백신

주와 84.2%의 상동성을 보였다.

표 168. 백신주와 시험농장 A, B, C 에서 분리한 복미형 바이러스의 상동성 비교 결과

백신주	시험농장 A 분리 복미형 바이러스	시험농장 B 분리 복미형 바이러스	시험농장 C 분리 복미형 바이러스
이뮤니스® 피알알에스-엔에이	85.7%	85.9%	86.2%

2. 임상학적 평가

(1) 임상증상평가

① 임상증상 관찰 방법

시험이 시작되는 21일령에서부터 시험이 종료되는 25주령까지 매주 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상증상을 관찰하였다.

표 169. 임상점수

임상 점수	임상 증상	비고
0	건강하다.	
1	피모가 거칠다. 창백하다.	
2	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	비정상적인 체형 호흡기 증상
4	피모가 거칠다. 창백하다. 호흡수가 증가한다. 운동을 꺼린다.	복식 호흡
6	상기 4의 증상을 보이다 폐사한다.	호흡기 증상을 동반한 폐사

② 임상 증상 통계학적 분석

3주령에서부터 시험이 종료되는 25주령까지 매주 1회씩 선정된 3개 농장의 백신군과 대조군의 임상 증상을 비교하였다. 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

③ A농장 임상 증상 변화

A농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 49일령, 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령, 91일령, 98일령, 105일령, 112일령, 119일령, 126일령, 133일령, 140일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 170. A농장 임상 증상 변화

일령	A농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.50±0.51	0.65±0.75
28일령	0.65±0.59	0.85±0.88
35일령	0.50±0.69	0.85±0.75
42일령	1.05±0.69	1.40±1.05
49일령	1.05±1.00^a	2.10±0.91^b
56일령	1.55±1.19^a	2.40±1.27^b
63일령	1.65±1.27^a	2.75±1.21^b
70일령	1.70±1.26^a	3.10±1.17^b
77일령	1.80±1.36^a	2.90±1.41^b
84일령	1.50±1.24^a	2.85±1.23^b
91일령	1.85±1.31^a	2.85±1.39^b
98일령	1.53±0.77^a	3.11±1.10^b
105일령	1.74±0.87^a	3.21±1.40^b
112일령	1.53±0.90^a	2.83±1.25^b
119일령	1.43±0.76^a	2.62±1.39^b
126일령	0.93±0.92^a	2.69±1.75^b
133일령	0.64±0.74^a	2.31±1.49^b
140일령	1.00±0.88^a	2.08±1.26^b
147일령	1.00±0.96	1.54±1.13
154일령	0.93±0.73	1.54±0.66
161일령	1.00±0.88	1.31±0.85
168일령	0.79±0.70	1.00±0.91
175일령	0.64±0.63	1.00±0.71

④ B농장 임상 증상 변화

B농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 42일령, 49일령, 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령, 91일령, 98일령, 105일령, 112일령, 119일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 171. B농장 임상 증상 변화

일령	B농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.65±0.49	0.40±0.50
28일령	0.80±0.41	0.65±0.59
35일령	0.95±0.76	0.90±0.64
42일령	0.95±0.69^a	1.55±0.60^b
49일령	1.25±0.85^a	2.10±1.07^b
56일령	1.55±0.69^a	2.65±1.18^b
63일령	1.35±1.04^a	2.35±1.31^b
70일령	1.35±1.04^a	2.85±1.09^b
77일령	1.50±0.89^a	2.75±1.48^b
84일령	1.60±0.88^a	2.42±1.17^b
91일령	1.35±0.81^a	2.47±1.12^b
98일령	1.35±0.49^a	2.32±1.11^b
105일령	1.25±0.55^a	2.32±0.95^b
112일령	1.30±0.86^a	2.26±1.15^b
119일령	1.00±0.76^a	2.21±1.48^b
126일령	1.07±0.80	1.85±1.63
133일령	0.93±0.80	1.85±2.88
140일령	0.87±0.74	1.54±1.33
147일령	0.60±0.63	1.23±1.42
154일령	0.73±0.70	1.31±0.85
161일령	0.47±0.52	1.15±0.90
168일령	0.47±0.52	0.85±0.80
175일령	0.27±0.46	1.15±1.14

㉟ C농장 임상 증상 변화

C농장에서는 백신군이 대조군에 비하여 35일령, 42일령, 49일령, 56일령, 63일령, 70일령, 77일령, 84일령, 91일령, 98일령, 105일령에 임상 증상이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 172. C농장 임상 증상 변화

일령	C농장 임상 증상 (평균±표준편차)	
	백신군	대조군
21일령	0.50±0.51	0.60±0.94
28일령	0.30±0.47	0.80±1.20
35일령	0.85±0.49 ^a	1.35±0.67 ^b
42일령	0.90±0.55 ^a	1.40±1.14 ^b
49일령	1.00±0.92 ^a	1.90±1.17 ^b
56일령	1.00±0.86 ^a	2.00±1.12 ^b
63일령	1.50±0.61 ^a	2.50±1.19 ^b
70일령	1.20±0.89 ^a	2.40±1.14 ^b
77일령	1.15±0.93 ^a	2.70±1.26 ^b
84일령	1.30±0.86 ^a	2.15±1.31 ^b
91일령	1.25±0.91 ^a	2.20±1.28 ^b
98일령	1.05±0.76 ^a	2.55±1.43 ^b
105일령	1.50±0.83 ^a	2.74±1.45 ^b
112일령	1.30±1.38	1.83±1.10
119일령	1.43±0.76	1.85±1.34
126일령	1.00±0.88	1.58±1.51
133일령	0.57±0.65	1.67±1.50
140일령	0.71±0.83	1.50±1.31
147일령	0.79±0.80	1.33±1.37
154일령	0.71±0.83	1.17±1.40
161일령	0.93±0.73	1.33±1.44
168일령	0.57±0.65	1.17±1.40
175일령	0.57±0.65	0.58±0.79

(2) 체중 및 일당증체량 평가

① 체중 측정

백신군과 대조군은 21일령(백신접종), 70일령(백신접종 7주후), 112일령(백신접종 13주후), 175일령(백신접종 22주후)에 체중을 측정하였다. 백신군과 대조군에 대해 각 시점의 평균체중 및 편차를 비교하였다. 또한 구간별 증체 평균을 비교하였다.

② 체중 통계학적 분석

21일령(백신접종), 70일령(백신접종 7주후), 112일령(백신접종 13주후), 175일령(백신접종 22주후)

의 체중을 측정하여 백신군과 대조군의 체중을 비교하였다. 통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

③ A농장 체중 측정 결과

A농장에서는 백신군이 대조군보다 112일령과 175일령에 체중이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 173. A농장 체중 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	5.19±0.15	5.31±0.27	-2.26%
70일령(접종 7주)	23.86±0.95	23.74±1.00	0.51%
112일령(접종 13주)	54.61±1.11^a	50.84±1.21^b	7.41%
175일령(접종 22주)	104.24±2.50^a	100.16±1.56^b	4.07%

④ B농장 체중 측정 결과

B농장에서는 백신군이 대조군보다 112일령, 175일령에 체중이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 174. B농장 체중 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	5.35±0.25	5.36±0.26	-0.19%
70일령(접종 7주)	24.53±0.59	24.17±0.50	1.49%
112일령(접종 13주)	55.75±1.79^a	52.09±1.50^b	7.01%
175일령(접종 22주)	106.99±2.06^a	102.24±1.77^b	4.64%

⑤ C농장 체중 측정 결과

C농장에서는 백신군이 대조군보다 112일령, 175일령에 체중이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 175. C농장 체중 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 체중 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령 (백신 접종)	5.35±0.26	5.35±0.25	-0.09%
70일령(접종 7주)	24.66±0.72	24.21±0.62	1.86%
112일령(접종 13주)	55.86±1.92^a	52.14±1.66^b	7.14%
175일령(접종 22주)	107.53±2.41^a	102.68±1.66^b	4.73%

(3) 일당 증체량 측정

① 일당 증체량 측정 구간

21~70일령, 70~112일령, 112~175일령, 21~175일령의 일당증체량을 계산하여 백신군과 대조군의 일당증체량을 비교하였다.

② 일당 증체량 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트한다. 만약 통계자료가 정규분포하면, ANOVA test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석한다. 만약 ANOVA test에서 그룹간 유의성이 존재하면, Tukey's adjustment를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 하지 않으면 Kruskal-Wallis test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 Kruskal-Wallis test에서 그룹간의 유의성이 존재하면, Mann-Whitney test를 이용하여 그룹간의 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

③ A농장 일당 증체량 측정 결과

A농장에서는 백신군이 대조군보다 70~112일령, 21~175일령에서 일당증체량이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 176. A농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	A농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령 (백신 접종 ~ 접종 7주)	381.02±19.44	376.12±21.12	1.30%
70~112일령 (접종 7주 ~ 접종 13주)	733.33±32.73^a	646.30±40.63^b	13.47%
112~175일령 (접종 13주 ~ 접종 22주)	789.00±50.72	778.88±26.17	1.30%
21 ~ 175일령 (백신 접종 ~ 접종 22주)	643.09±16.23^a	616.03±10.01^b	4.39%

④ B농장 일당 증체량 측정 결과

B농장에서는 백신군이 대조군보다 70~112일령, 21~175일령에서 일당증체량이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 177. B농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	B농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령 (백신 접종 ~ 접종 7주)	391.33±13.17	383.78±11.15	1.97%
70~112일령 (접종 7주 ~ 접종 13주)	743.33±52.25^a	664.54±37.89^b	11.86%
112~175일령 (접종 13주 ~ 접종 22주)	815.87±46.54	798.66±35.94	2.16%
21 ~ 175일령 (백신 접종 ~ 접종 22주)	660.04±12.92^a	629.57±11.15^b	4.84%

⑤ C농장 일당 증체량 측정 결과

C농장에서는 백신군이 대조군보다 70~112일령, 21~175일령에서 일당증체량이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 178. C농장 일당 증체량 측정 결과^(a,b: 유의성 의미)

구간 일령	C농장 일당 증체량 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21~70일령 (백신 접종 ~ 접종 7주)	394.08±16.11	384.80±14.93	2.41%
70~112일령 (접종 7주 ~ 접종 13주)	744.61±46.00^a	666.80±39.90^b	11.67%
112~175일령 (접종 13주 ~ 접종 22주)	822.11±47.88	798.81±39.92	2.92%
21 ~ 175일령 (백신 접종 ~ 접종 22주)	663.59±15.16^a	631.98±10.51^b	5.00%

3. 면역학적 평가

(1) PRRS 바이러스 IgG 항체 및 중화항체 혈청검사

① 혈액 채취 일령

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신접종), 49일령(백신접종 4주후), 70일령(백신접종 7주후), 112일령(백신접종 13주후), 175일령(백신접종 22주후)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 PRRSV의 항체가를 측정하였고, 백신군과 대조군의 차이를 비교하였다.

② ELISA 검사

검사할 혈청을 1:40으로 희석하여 상업화된 ELISA (HerdChek PRRS X3 Ab test) 키트의 PRRS well과 NHC well에 각각 100 μ l씩 분주하고, 양성 대조군 및 음성 대조군 샘플을 각각 2개의 PRRS well과 2개의 NHC well, 총 4개의 well에 100 μ l씩 분주하였다. 검사할 각 well을 필름으로 덮고, 실온(18~25 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 보관하여 반응시킨 후 세척액을 이용하여 5회 반복하여 세척하였다. Anti-porcine:HRPO conjugate 용액을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온(18~25 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 보관하였다. 각 well을 동일하게 세척한 후 발색제(TMB substrate solution)를 100 μ l씩 분주하고 빛을 차단하여 실온(18~25 $^{\circ}$ C)에서 15분간 반응시켰다. 반응 중지 용액을 100 μ l씩 분주하여 반응을 멈추고 650 nm 파장으로 optical density (OD) 값을 측정하였다. NHC well의 양성 대조군의 OD 평균값이 0.120 이하, NHC well의 음성 대조군의 OD 평균값이 0.250 이하 일 때 유효한 값으로 간주하며, 검사 혈청의 S/P ratio가 0.4 미만인 경우 음성으로 0.4 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

③ PRRS IgG 항체 수준 통계분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

④ A농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과

A농장에서 백신군이 대조군보다 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IgG 항체

수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 179. A농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(백신 접종)	0.33±0.09	0.31±0.08	8.12%
49일령(접종 4주)	0.85±0.12^a	0.46±0.20^b	84.78%
70일령(접종 7주)	1.47±0.19^a	0.62±0.15^b	137.51%
112일령(접종 13주)	1.80±0.33^a	1.02±0.26^b	76.47%
175일령(접종 22주)	1.60±0.20^a	0.99±0.24^b	61.61%

⑤ B농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과

B농장에서 백신군이 대조군보다 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 180. B농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(백신 접종)	0.27±0.09	0.32±0.08	-15.51%
49일령(접종 4주)	0.88±0.11^a	0.46±0.18^b	91.30%
70일령(접종 7주)	1.54±0.23^a	0.72±0.15^b	113.89%
112일령(접종 13주)	1.84±0.37^a	0.88±0.22^b	109.09%
175일령(접종 22주)	1.68±0.25^a	0.92±0.29^b	82.60%

⑥ C농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과

C농장에서 백신군이 대조군보다 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 181. C농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 PRRS 바이러스 IgG 항체 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(백신 접종)	0.30±0.08	0.29±0.08	0.56%
49일령(접종 4주)	0.82±0.12^a	0.42±0.13^b	95.24%
70일령(접종 7주)	1.35±0.19^a	0.70±0.19^b	92.86%
112일령(접종 13주)	1.70±0.34^a	0.93±0.23^b	82.80%
175일령(접종 22주)	1.49±0.26^a	0.94±0.20^b	58.51%

(2) PRRS 바이러스 중화항체 수준 측정

① 혈액 채취 일정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신접종), 49일령(백신접종 4주후), 70일령(백신접종 7주후), 112일령(백신접종 13주후), 175일령(백신접종 22주후)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 다음 중화항체 수준을 측정하였고, 백신군과 대조군의 차이를 비교하였다.

② 중화항체에 사용한 바이러스

중화항체에 사용한 바이러스는 백신에 사용한 북미형 PRRS 바이러스를 이용하였다.

③ 검사방법

PRRS 중화항체 역가 측정 검사방법은 기존의 방법에 준하여 실시하였다[10]. 모든 혈청 sample을 검사시작 전에 30분 동안 56℃에서 heat inactivation 시켰다. Inactivation 되어진 혈청을 RPMI 1640 배지 (10% FCS, 20mM L-glutamine, antibiotic-antimycotic mixture-100IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycin, 0.25 mg/ml amphotericin B)와 2배씩 차례로 희석시키고, 각각의 희석된 혈청을 100 µl씩, 미리 준비된 3×10³ TCID₅₀/ml의 북미형 PRRS 바이러스 100 µl와 섞어 4℃에서 48 시간 반응하였다. 기니픽 혈청(3~5%)를 포함한 배지 50µl를 추가하여 37℃에서 한 시간 동안 incubation 시킨 후 전날 미리 배양해 둔 Marc-145 cell 50 µl에 접종한 후 37℃에서 배양하면서 매일 cytopathic effect (CPE)를 확인하였다. 5일 간 배양한 후 각 well의 CPE를 확인한다. CPE가 없는 well은 SDOW 17 항체를 이용한 염색을 통해 바이러스의 성장을 확인하였다. 중화항체 역가(titer)는 바이러스의 성장 징후가 전혀 없는 가장 높은 희석배수의 역수로 산출하였다.

④ PRRS 바이러스 중화항체 통계분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹 간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

⑤ A농장 PRRS 바이러스 중화항체 결과

PRRS 바이러스 중화항체의 판정 기준은 2 Log₂ 이므로, 시험 기간 동안 백신군 112일령과 175일령에서만 판정 기준 수준인 2 Log₂ 정도의 중화항체 수준이 검출되었다.

표 182. A농장 PRRS 바이러스 중화항체 결과

일령	A농장 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₂ titer)	
	백신군	대조군
21일령(백신 접종)	0.85±0.59	0.75±0.72
49일령(접종 4주)	1.45±0.83	1.15±0.67
70일령(접종 7주)	1.60±1.10	1.30±0.92
112일령(접종 13주)	2.00±0.67	1.56±1.15
175일령(접종 22주)	2.14±0.66	1.77±0.93

⑥ B농장 PRRS 바이러스 중화항체 결과

PRRS 바이러스 중화항체의 판정 기준은 2Log_2 이므로, 시험 기간 동안 백신군 112일령과 175일령에서만 판정 기준 수준인 2Log_2 정도의 중화항체 수준이 검출되었다.

표 183. B농장 PRRS 바이러스 중화항체 결과

일령	B농장 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log_2 titer)	
	백신군	대조군
21일령(백신 접종)	0.85±0.88	0.45±0.51
49일령(접종 4주)	1.45±1.05	1.25±0.72
70일령(접종 7주)	1.75±0.44	1.55±0.89
112일령(접종 13주)	2.05±0.60	1.53±0.70
175일령(접종 22주)	2.00±0.65	1.62±0.65

⑦ C농장 PRRS 바이러스 중화항체 결과

PRRS 바이러스 중화항체의 판정 기준은 2Log_2 이므로, 시험 기간 동안 백신군 112일령과 175일령에서만 판정 기준 수준인 2Log_2 정도의 중화항체 수준이 검출되었다.

표 184. C농장 PRRS 바이러스 중화항체 결과^(a,b): 유의성 의미

일령	C농장 PRRS 바이러스 중화항체 수준 (평균±표준편차) (단위: Log_2 titer)	
	백신군	대조군
21일령(백신 접종)	0.40±0.50	0.45±0.51
49일령(접종 4주)	1.50±0.89	1.25±0.79
70일령(접종 7주)	1.80±0.52	1.40±0.68
112일령(접종 13주)	2.21±0.85	1.56±0.70
175일령(접종 22주)	2.00±0.68	1.67±0.98

(2) PRRS 바이러스 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정

① 혈액 채취 일정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신접종), 49일령(백신접종 4주후), 70일령(백신접종 7주후), 112일령(백신접종 13주후), 175일령(백신접종 22주후)에 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 다음 PRRS 바이러스에 대한 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정을 측정하고, 백신군과 대조군의 차이를 비교하였다.

② 공배양 바이러스

공배양 바이러스는 백신에 사용한 복미형 PRRS 바이러스를 이용하였다.

③ 말초혈액 단핵구(peripheral blood monocyte) 분리

EDTA tube에 채혈한 혈액을 1:1로 HBSS에 희석한 후 희석한 혈액 4.0 mL를 15 mL tube에 준비한 Ficoll-Paque 3.0 mL 위에 분주하여 아래층은 Ficoll, 위층은 혈액으로 나뉘게 하였다. 그 다음 18~20℃에서 400 g의 속도로 30~40분간 원심 분리하여 층을 분리한 후 가장 위층의 혈장과 중간층의 Ficoll층 사이에 분리되어 부유된 PBMC를 피펫을 이용하여 채취하였다. 채취된 말초 혈액 단핵구를 HBSS로 세척하여 300 g에서 10분간 원심분리한 후 세포성 면역 반응 실험에 이용하였다.

④ IFN- γ 분비 세포 수 측정

PRRS 바이러스의 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 측정법은 이미 발표된 방법에 따라 실시하였다 [7]. 분리된 말초혈액 단핵구를 PRRS 바이러스 항원으로 자극하여 IFN- γ 분비세포의 수를 확인하였다. 상용화 되어 있는 ELISPOT (Enzyme linked immunospot) 분석 키트(MABTECH, Mariemont, OH, USA)에 IFN- γ 단클론 항체를 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 분주하여 24시간 부착시켰다. 분리된 PBMC를 10% FBS가 포함된 RPMI 배지에 1×10^7 cell/mL의 농도로 희석한 후 준비된 ELISPOT 키트에 PBMC가 1×10^6 cell/mL 포함된 각 well에 MOI가 0.01인 PRRS 바이러스 항원 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 자극하여 5% CO₂, 37℃에서 20시간 반응시켰다. 각각의 well을 PBS로 세척 후, biotin이 표지된 anti-IFN- γ 1차 항체를 50 μl 분주하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 각각의 well을 PBST로 세척 후, streptavidin-HRP가 표지된 2차 항체를 50 μl 씩 분주하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 마지막으로 TMB 용액을 100 μl 씩 분주하여 발색시켰고, ELISPOT Reader를 이용하여 spot의 개수를 산정하였다.

⑤ IFN- γ -SC 통계분석 방법

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

⑥ A농장 PRRS 바이러스에 대한 IFN- γ -SC 결과

A농장에서 백신군이 대조군보다 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 185. A농장 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(백신 접종)	13.20±3.71	11.80±5.93	11.86%
49일령(접종 4주)	40.80±10.50 ^a	25.10±11.11 ^b	62.55%
70일령(접종 7주)	92.25±21.97 ^a	35.20±12.89 ^b	162.07%
112일령(접종 13주)	104.89±13.90 ^a	48.39±10.96 ^b	116.77%
175일령(접종 22주)	96.71±14.36 ^a	46.85±12.42 ^b	106.45%

⑦ B농장 PRRS 바이러스에 대한 IFN- γ -SC 결과

B농장에서 백신군이 대조군보다 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 186. B농장 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(백신 접종)	12.70±5.55	12.30±5.77	3.25%
49일령(접종 4주)	46.70±11.98 ^a	28.45±10.76 ^b	64.15%
70일령(접종 7주)	80.55±20.15 ^a	38.15±15.30 ^b	111.14%
112일령(접종 13주)	110.65±15.96 ^a	53.37±9.66 ^b	107.33%
175일령(접종 22주)	88.27±19.18 ^a	48.92±6.03 ^b	80.42%

⑧ C농장 PRRS 바이러스에 대한 IFN- γ -SC 결과

C농장에서 백신군이 대조군보다 49일령, 70일령, 112일령, 175일령에서 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 높았다.

표 187. C농장 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 결과^(a,b: 유의성 의미)

일령	C농장 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 증가율
21일령(백신 접종)	10.95±4.99	12.75±5.54	-14.12%
49일령(접종 4주)	43.10±12.60 ^a	26.25±7.77 ^b	64.19%
70일령(접종 7주)	90.40±20.85 ^a	40.85±13.30 ^b	121.30%
112일령(접종 13주)	118.42±15.27 ^a	51.56±9.35 ^b	129.70%
175일령(접종 22주)	96.86±17.82 ^a	48.17±8.38 ^b	101.09%

4. 바이러스학적 평가

(1) 혈중에서 PRRS 바이러스 항원 정량 분석

① 혈액 채취 일정

선정된 3개 농장의 백신군과 대조군에서 21일령(백신접종), 49일령(백신접종 4주후), 70일령(백신접종 7주후), 112일령(백신접종 13주후), 175일령(백신접종 22주후)에 혈액을 채취하여 혈중에서 PRRS 바이러스의 cDNA 함량을 정량 측정하는 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 실시하였다.

② 실시간 중합효소 연쇄반응 검사방법

실시간 중합효소 연쇄반응은 이미 발표되어 있는 검사 방법을 이용하여 실시하였다[2]. ORF7의 172bp (GenBank Accession: SNU090690/851)을 확인하기 위한 Primer 쌍(전방향: 5' TGTGCCAGATGCTGGGTAAGATCA, 역방향: 5' ATTGACGACAGACACAATTGCCGC)을 이용하여 PCR을 수행하였다(Tm : 60°C). 증폭된 PCR product를 cloning vector (TOPcloner™ TA kit, Enzymomics)에 삽입하고 10⁸에서 10¹ 개/mL 로 10⁻¹ 씩 단계별로 희석 후 위의 primer를 이용하여 real time PCR을 수행하여 standard curve를 측정하였다. 시료에서 추출된 DNA 1.0 μ l를 주형으로, 2x SYBR green reaction mix (Applied Biosystems) 10 μ l, primers 0.5 μ M, 증류수 8.5 μ l 와 혼합하여 최종 20 μ l로 만들었다. 반응 조건은 95°C에서 10분간 denaturation 시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 다시 60°C에서 30초간 총 40회 반복하여 반응시켰다. 모든 반응이 끝난 후 60°C에서 95°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 해리 곡선

(dissociation curve)을 측정하였다. 절대 정량을 위해 각 시료의 측정된 ct 값을 표준커브(standard curve)에 대입하여 DNA copy 수/mL를 산정하였다.

③ 혈중 PRRS 바이러스 항원 통계학적 분석

통계자료는 Shapiro-Wilk test를 시행하여 정규분포(normal distribution) 여부를 테스트하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르면, Student's t-test를 시행하여 그룹간 유의성 여부를 분석하였다. 만약 통계자료가 정규분포를 따르지 않으면, 사후 검정 분석 방법인 Mann-Whitney 방법을 이용하여 유의성 차이를 분석하였다. P값이 0.05 이하를 유의성으로 간주하였다.

④ A농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

A농장에서 백신군이 대조군보다 70일령, 112일령, 175일령에서 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 188. A농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	A농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₁₀ PRRSV genomic copies/mL)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
49일령(접종 4주)	1.59±1.66	2.01±2.08	-61.98%
70일령(접종 7주)	2.53±2.14^a	4.54±2.05^b	-99.02%
112일령(접종 13주)	2.17±1.62^a	4.20±1.63^b	-99.07%
175일령(접종 22주)	1.59±1.16^a	3.07±1.54^b	-96.69%

⑤ B농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

B농장에서 백신군이 대조군보다 70일령, 112일령, 175일령에서 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 189. B농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b: 유의성 의미)

일령	B농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₁₀ PRRSV genomic copies/mL)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
49일령(접종 4주)	1.24±1.76	2.54±2.16	-94.98%
70일령(접종 7주)	2.04±2.10^a	4.41±2.64^b	-99.57%
112일령(접종 13주)	1.81±1.60^a	3.34±1.87^b	-97.01%
175일령(접종 22주)	1.11±0.94^a	2.68±1.36^b	-97.31%

⑥ C농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 결과

C농장에서 백신군이 대조군보다 70일령, 112일령, 175일령에서 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 190. C농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준^(a,b): 유의성 의미)

일령	C농장 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 (평균±표준편차) (단위: Log ₁₀ PRRSV genomic copies/mL)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
21일령(백신 접종)	0.00±0.00	0.00±0.00	-
49일령(접종 4주)	1.12±1.59	2.21±2.29	-91.87%
70일령(접종 7주)	2.11±2.03 ^a	3.63±2.54 ^b	-96.98%
112일령(접종 13주)	1.73±1.44 ^a	3.16±2.00 ^b	-96.28%
175일령(접종 22주)	1.27±1.11 ^a	2.41±1.58 ^b	-92.75%

(2) 방어능 상관성

① 방어능 상관성 통계 분석 방법

아외 임상 시험에서 인터페론 감마 수치와 혈액 PRRS 항원 함량을 이용하여 방어능 상관성을 제시하였다. 3개 농장에서 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준이 가장 높은 70일령(백신 접종 7주)과 인터페론-감마 수준이 가장 높은 112일령(백신 접종 13주)에서 방어능 상관성을 분석하였다. PRRS 바이러스에 특이적인 인터페론 감마 분비 세포 수치와 혈중 PRRS 항원 함량의 상관관계를 Pearson correlation coefficient를 이용하여 상관성을 분석하였다.

② 농장별 백신군에서 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC의 질병 방어능 상관관계

A, B, C농장 백신군 모두에서 70일령(백신 접종 7주)과 112일령(백신 접종 13주)에서 PRRS 바이러스에 대한 IFN- γ -SC 수치와 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준 사이에는 질병 방어능에 대한 상관관계가 있다. 즉 PRRS 바이러스에 대한 IFN- γ -SC 수치가 높을수록 혈중 PRRS 바이러스 항원 수준이 감소하는 것으로 나타났다.

표 191. 70일령 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 질병 방어능 상관관계^(a):상관성 의미)

방어능 상관관계	A농장 백신군	B농장 백신군	C농장 백신군
	방어능 상관지수	방어능 상관지수	방어능 상관지수
PRRS 바이러스 IFN- γ -SC vs. 혈중 PRRS 바이러스 항원	$r = -0.656^a$ ($P = 0.002$)	$r = -0.519^a$ ($P = 0.019$)	$r = -0.834^a$ ($P < 0.001$)

표 192. 112일령 PRRS 바이러스 IFN- γ -SC 질병 방어능 상관관계 (^a:상관성 의미)

방어능 상관관계	A농장 백신군	B농장 백신군	C농장 백신군
	방어능 상관지수	방어능 상관지수	방어능 상관지수
PRRS 바이러스 IFN- γ -SC vs. 혈중 PRRS 바이러스 항원	$r = -0.600^a$ ($P = 0.007$)	$r = -0.729^a$ ($P < 0.001$)	$r = -0.597^a$ ($P = 0.007$)

5. 병리학적 평가

(1) 병리조직 샘플

16주령과 25주령에서 각각의 농장에서 백신군 5두와 대조군 5두를 임의로 선정해서 안락사 시킨 후에 각각의 주요 장기의 육안적 소견(부검 결과)을 기록하였고, 실질장기의 조직표본 제작을 위해 폐장, 서혜(subinguinal) 림프절, 편도 등 주요 장기를 10% 포르말린에 고정하였다.

(2) 육안 폐렴 병변 분석

부검을 실시하여 폐장의 육안병변 정도를 이미 발표되어 있는 방법을 이용하여 분석하였다[4]. 아래 그림과 같이 전체 폐장을 100으로 하여 각각의 엽마다의 부피를 근거로 각각의 점수를 배분한 후에 각각의 폐장의 육안 병변 여부를 분석하였다.

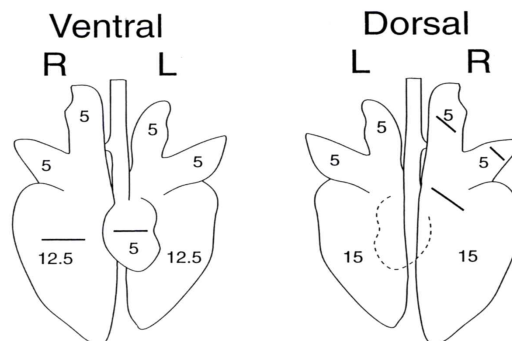


그림 17. 폐장의 엽단위의 점수

(3) 병리조직학적 병변 관찰

포르말린에 고정한 조직은 포매 과정을 거쳐 H&E염색을 실시하였다. H&E 염색된 장기를 각각 현미경으로 관찰하여 병변을 관찰하였다. 폐장에서의 간질성 폐렴(interstitial pneumonia)의 정도는 이미 발표된 논문[4]에 의거하여 병변이 없으면 0점, 경미한 간질성 폐렴(mild interstitial pneumonia)은 1점, 중간정도 다발성 간질성 폐렴(moderate multifocal interstitial pneumonia)은 2점, 중간정도 미만성 간질성 폐렴(moderate diffuse interstitial pneumonia)은 3점, 매우 심한 간질성 폐렴(severe interstitial pneumonia)는 4점으로 구분하여 표시하였다.

(4) 육안 병변과 병리조직학적 병변 결과 분석

백신군과 대조군의 그룹간의 육안병변과 병리조직학적 병변을 기록하였고, Kruskal-Wallis 방법으로 통계 처리 후 유의성이 있으면 Mann-Whitney test 방법을 이용하여 2개 그룹간의 육안 병변과 병리조직학적 간질성 폐렴 병변의 차이를 비교하였다.

(5) 육안 폐렴 병변 결과 분석

① A농장 육안 폐렴 병변 변화

A농장에서 백신군이 대조군보다 16주령, 25주령에서 육안 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 193. A농장 육안 폐렴 병변 수준^(a,b): 유의성 의미)

주령	A농장 육안 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	22.40±4.87 ^a	45.55±5.68 ^b	-50.82%
25주령 (175일령, 접종 22주)	20.50±6.24 ^a	32.95±4.92 ^b	-37.78%

② B농장 육안 폐렴 병변 변화

B농장에서 백신군이 대조군보다 16주령, 25주령에서 육안 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 194. B농장 육안 폐렴 병변 수준^(a,b): 유의성 의미)

주령	B농장 육안 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	22.20±3.44 ^a	40.75±11.74 ^b	-45.52%
25주령 (175일령, 접종 22주)	19.60±8.09 ^a	31.80±7.62 ^b	-38.36%

③ C농장 육안 폐렴 병변 변화

C농장에서 백신군이 대조군보다 16주령, 25주령에서 육안 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 195. C농장 육안 폐렴 병변 수준^(a,b): 유의성 의미)

주령	C농장 육안 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	20.60±6.16 ^a	38.90±0.89 ^b	-47.04%
25주령 (175일령, 접종 22주)	18.70±2.41 ^a	32.25±10.22 ^b	-42.02%

(6) 병리조직학적 폐렴 병변 결과 분석

① A농장 병리조직학적 폐렴 병변 변화

A농장에서 백신군이 대조군보다 16주령, 25주령에서 병리조직학적 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 196. A농장 병리조직학적 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	A농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.72±0.58 ^a	2.84±0.26 ^b	-39.44%
25주령 (175일령, 접종 22주)	1.64±0.26 ^a	2.52±0.58 ^b	-34.92%

② B농장 병리조직학적 폐렴 병변 변화

B농장에서 백신군이 대조군보다 16주령, 25주령에서 병리조직학적 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 197. B농장 병리조직학적 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	B농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.60±0.37 ^a	2.76±0.52 ^b	-42.03%
25주령 (175일령, 접종 22주)	1.56±0.17 ^a	2.12±0.46 ^b	-26.42%

③ C농장 병리조직학적 폐렴 병변 변화

C농장에서 백신군이 대조군보다 16주령, 25주령에서 병리조직학적 폐렴 병변 수준이 유의성($P < 0.05$) 있게 낮았다.

표 198. C농장 병리조직학적 폐렴 병변 수준^(a,b: 유의성 의미)

주령	C농장 폐렴 병변 수준 (평균±표준편차)		
	백신군	대조군	대조군 대비 백신군 감소율
16주령 (112일령, 접종 13주)	1.56±0.41 ^a	2.64±0.57 ^b	-40.91%
25주령 (175일령, 접종 22주)	1.44±0.33 ^a	2.24±0.30 ^b	-35.71%

사. PRRS-NA, PRRS-M 및 DMVac 야외임상시험 보고서 작성

1. 이뮤니스 피알알에스-엔에이(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 야외임상시험 보고서

야외 임상 시험 보고서

이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신
(IMMUNIS® PRRS-NA vaccine)
돼지 생식기호흡기증후군 북미형 생건조백신
(Live attenuated NA-type PRRSV vaccine)

우진비엔지(주)

1. 시험 제목

이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신의 야외임상시험

2. 시험 목적

이뮤니스® 피알알에스-엔에이 백신의 효능 및 안전성 확인

3. 시험 실시 기관

기관 명: 서울대학교 수의과 대학

4. 시험 의뢰자 및 주소

기관 명: 우진비엔지(주)

주소: 서울시 영등포구 경인로 775, 에이스하이테크시티 1동
의뢰자: 강석진 대표이사

5. 임상시험용 의약품 관리자

기관 명: 서울대학교 수의과 대학

6. 임상시험 기간

2020년 07월 01일 ~ 2022년 4월 14일

7. 시험 백신의 제조

제조번호	제조일자	항원 함량 (dose)	제조수량
PRRS-A F001	2020.01.24	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상	10두분 × 220 vials
PRRS-A F002	2020.01.31	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상	10두분 × 220 vials
PRRS-A F003	2020.02.07	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상	10두분 × 220 vials

2. 이뮤니스 피알알에스-엠(돼지생식기호흡기증후군 예방 백신)의 야외임상시험 보고서

야외 임상 시험 보고서

이뮤니스® 피알알에스-엠 백신
(IMMUNIS® PRRS-M vaccine)
돼지 생식기호흡기증후군 유럽 및 북미형 혼합 사독백신
(PRRSV EU and NA strains combined
inactivated vaccine)

우진비엔지(주)

1. 시험 제목

이뮤니스® 피알알에스-엠 백신의 야외임상시험

2. 시험 목적

이뮤니스® 피알알에스-엠 백신의 효능 및 안전성 확인

3. 시험 실시 기관

기관 명: 서울대학교 수의과 대학

4. 시험 의뢰자 및 주소

기관 명: 우진비엔지(주)

주소: 경기도 화성시 양감면 정문송산로 230
의뢰자: 강재구 대표이사

5. 임상시험용 의약품 관리자

기관 명: 서울대학교 수의과 대학

6. 임상시험 기간

2020년 09월 05일 ~ 2021년 12월 31일

7. 시험 백신의 제조

제조번호	제조일자	항원 함량 (dose)	제조수량
PRRS-M F001	2020.01.21	10 ^{5.0} FAID ₅₀ /ml 이상	10두분 × 220 vials
PRRS-M F002	2020.01.28	10 ^{5.0} FAID ₅₀ /ml 이상	10두분 × 220 vials
PRRS-M F003	2020.02.04	10 ^{5.0} FAID ₅₀ /ml 이상	10두분 × 220 vials

3. 이뮤니스 디엠백(돼지 썬코바이러스 및 마이코플라즈마 예방 백신)의 야외임상시험 보고서

야외 임상 시험 보고서

이뮤니스® 디엠백 백신
(IMMUNIS® DMVac vaccine)
돼지 썬코바이러스 2d형 및
마이코플라즈마 하이오뉴모니아 불활화 복합백신

우진비앤지(주)

1. 시험 제목

이뮤니스 디엠백 백신의 야외 임상 시험 보고서

2. 시험 목적

이뮤니스 백신의 효능 및 안전성 확인

3. 시험 실시 기관

기관명: 서울대학교 수의과 대학

4. 시험 의뢰자 및 주소

기관명: 우진비앤지(주)

주소: 서울시 영등포구 영인로 775, 에이스하이테크시티 1동

의뢰자: 강석진 대표이사

5. 임상시험용 의약품 관리자

기관명: 서울대학교 수의과 대학

6. 임상시험 기간

2022년 05월 01일 ~ 2022년 12월 30일

7. 시험 백신의 제조

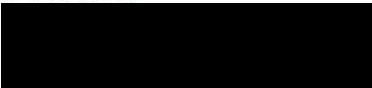
(1) 이뮤니스 디엠백 백신:

돼지 썬코바이러스 2d형 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 불활화복합백신

제조번호	제조일자	활일 함량 (dose)	제조수량
DMVac F001	2022.05.02	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상 OD 0.12 at 410nm (10 ⁸ CCU/ml 이상)	10두분 × 220 vials
DMVac F002	2022.05.06	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상 OD 0.12 at 410nm (10 ⁸ CCU/ml 이상)	10두분 × 220 vials
DMVac F003	2022.05.09	10 ^{5.0} FAID ₅₀ 이상 OD 0.12 at 410nm (10 ⁸ CCU/ml 이상)	10두분 × 220 vials

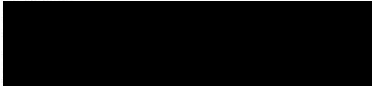
8. 야외 시험 적용 장소

시험농장 A



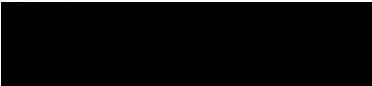
사육규모: 4000두

시험농장 B



사육규모: 1000두

시험농장 C



사육규모: 4500두

목 차

I. 야외 임상 시험	05
1. 목적	05
2. 야외 임상 시험 농장 정보	05
3. 야외 임상 시험 계획	07
4. 평가항목	08
5. 백신 안전성 평가	09
6. 백신 과용량 평가	14
7. 임상학적 평가	20
8. PCV2에 대한 면역학적 평가	30
9. Mhp에 대한 면역학적 평가	37
10. 바이러스 및 미생물학적 평가	42
11. 병리학적 평가	48
12. 조직병변에서 PCV2 항원 증식 확인	55
13. 도제 이행 함께 간접 현상 분석	58
14. 면역과 질병 방어능 상관관계 분석	64
II. 면역지속성 시험	66
1. 시험 디자인	66
2. 백신 접종	66
3. PCV2에 대한 면역학적 평가	66
4. Mhp에 대한 면역학적 평가	68
III. 고찰	70
IV. 참고문헌	74

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2021)	• PRDC 관련 병원체들에 대한 대량배양 시스템 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 썬코바이러스(PCV2d), 마이코플라즈마 (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>) 및 PRRS 바이러스(NA 및 EU type) 생산주 확보. - PRDC 관련 병원체들에 대한 대량배양조건 확립.
	• PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type)의 배양조건 개선 및 바이러스 역가 상승유도	100	<ul style="list-style-type: none"> - PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type)의 배양조건 개선 및 바이러스 역가 상승유도. - 배양공정개발을 통한 시험백신 제조. - DMVac, PRRS-M 및 PRRS-NA 백신의 야외임상시험계획 승인.
	• 썬코-마이코 복합 백신 실험실 내 효능(공격접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가	100	- 썬코-마이코 복합 백신인 DMVac의 자돈에서의 효능(공격접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가 완료.
	• PRRS-NA 생독 백신 안전성(역계대) 시험과 시험자료 분석 및 평가	100	- PRRS 생독 백신인 PRRS-NA 백신의 역계대시험을 통한 안전성시험과 시험자료 분석 및 평가 완료.
	• PRRS-M 사독 백신 야외임상시험 및 시험결과 분석(전반부; 3주령 ~ 16주령)	100	- 3개 농장에서 PRRS-M 사독 백신의 야외임상시험(전반부; 3주령 ~ 16주령)을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가 완료.
2차 년도 (2022)	• PCV2 항체-free 마이코플라즈마 대량 배양 시스템 개발	100	- Anti-PCV2 IgG가 감소된 돼지혈청을 이용하여 마이코플라즈마를 배양.
	• Mycoplasma Broth Base 기반 및 PPLO broth 기반 조건 확인	100	- 마이코플라즈마 배양 배지 조성을 확인하고 배지 조성별 또는 혈청별(돼지 및 말 혈청) 함량에 따른 성장률을 분석.
	• Friis broth 기반 조건 확인	100	- 마이코플라즈마 시판배지(Friis broth)에 대한 조성을 확인하고 조성별 배양을 진행하여 최적화된 배양조건을 확인.
	• 대량배양 조건 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 마이코플라즈마의 함량분석법을 확인하였고 최적화된 함량 분석법을 확립. - 확립된 분석법을 이용하여 배양 조건별 성장률을 평가하였고 최적화된 대량 배양 조건을 확립.

	• PRRS-M 사독 백신 야외임상시험(후반부; 16주령 - 25주령) 및 시험결과 분석	100	- 3개 농장에서 PRRS-M 사독 백신의 야외 임상시험(후반부; 16주령 - 25주령)을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가 완료.
	• 써코·마이코 복합 백신 야외 임상 시험(전반부: 3주령 - 16주령 & 후반부; 16주령 - 25주령) 및 시험결과 분석	100	- 3개 농장에서 써코·마이코 복합 백신의 야외 임상시험(전반부: 3주령 - 16주령)을 진행하였고, 백신의 효능평가 완료.
3차 년도 (2023)	• 백신 품목허가 승인 및 보완	100	- PRRS-NA 백신 제품의 품목허가를 승인 받았고, PRRS-M 및 DMVac 백신은 기술검토보완 완료.
	• 신규 백신의 국가검정시험법 개발	100	- PRRS-NA 백신 제품의 국가출하승인검정 기준을 개정.
	• 백신 제품홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립	100	- PRRS-NA 및 DMVac 백신 제품의 카탈로그 작성 및 국내외 거래처 홍보.
	• PRRS 생독백신 야외임상시험(전반부: 3주령-16주령 & 후반부: 16주령-25주령) 및 시험결과 분석	100	- PRRS 생독 백신인 PRRS-NA 백신의 야외 임상시험 및 시험자료 분석 완료.
	• 3개 백신 제품에 대한 야외 임상시험 보고서 작성	100	- PRRS-NA, PRRS-M 및 DMVac 백신 제품의 품목허가 6번 내용 작성 완료.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성, 연구개발과제의 특성에 따라 수정 가능합니다)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	SCI	비SCI			논문평균IF	학술발표	
단위	건	건	건	평년10건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	
가중치	10	10			30		10							20		10		10	
최종목표	1	1			1	30	2	308	150			1	1		3	2		2	
2021년도					1	5				2		3			1	1		3	
2022년도	1						3					2			2	1		1	
2023년도												1			1			2	

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Pathogenicity of Porcine Circovirus Type 2d(PCV2d) in Pigs Infected with PCV2d or Co-infected with Mycoplasma hyopneumoniae and PCV2d or with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and PCV2d	Journal of Comparative Pathology	Taehwan Oh, Kee Hwan Park	187	United Kingdom	ELSEVIER	SCIE	August 2021	0021-9975	100
2	A Comparison of Pathogenicity and Virulence of Three Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genotypes (a, b, and d) in Pigs Singularly Inoculated with PCV2 and Dually Inoculated with Mycoplasma hyopneumoniae and PCV2	pathogens	Taehwan Oh, Jeongmin Suh	10	Switzerland	mdpi	SCIE	August 2021	2076-0817	100
3	A Comparison of Virulence of Three Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genotypes (a, b, and d) in Pigs Singularly Inoculated with PCV2 and Dually Inoculated with PCV2 and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	pathogens	Jeongmin Suh, Taehwan Oh	10	Switzerland	mdpi	SCIE	July 2021	2076-0817	100
4	Pathogenicity of Porcine Circovirus Type 2e in Experimentally Infected Pigs	Journal of Comparative Pathology	Taehwan Oh, Jeongmin Suh	195	United Kingdom	ELSEVIER	SCIE	June 2022	0021-9975	100
5	Virulence Comparison of Four Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Genotypes (2a, 2b, 2d and 2e) in Pigs Single-Infected with PCV2 and Pigs Dual-Infected with PCV2 and Mycoplasma hyopneumoniae	Journal of Comparative Pathology	Taehwan Oh, Hyejean Cho	199	United Kingdom	ELSEVIER	SCIE	November 2022	0021-9975	100

6	Efficacy of a novel bivalent vaccine containing porcine circovirus type 2d and Mycoplasma hyopneumoniae against a dual PCV2d and Mycoplasma hyopneumoniae challenge	frontiers in veterinary science	Sehyeong Ham	10	Switzerland	Frontiers Media	SCIE	July 2023	2297-1769	100%
---	---	---------------------------------	--------------	----	-------------	-----------------	------	-----------	-----------	------

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한수의학회 2021 춘계 학술대회	채찬희	2021.05.27	충남대학교 정심화화학국제회관	대한민국
2	2022 국제바이러스학회	박경서	2022.06.27	위스콘신대학교	미국
3	대한수의학회 2022 추계 학술대회	박경서	2022.11.17	제주국제컨벤션센터	대한민국
4	아시아양돈수의사 대회	박경서	2023.07.30	대만국제컨벤션센터	대만

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> WG	KCTC15004BP	한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)	2022

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	신규한 돼지 썬코바이러스 2d형 및 마이코플라즈마성 폐렴불활화 복합 백신 조성물 및 제조방법	대한민국	우진비앤지(주)	2022.08.01	10-2022-0095662					80	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√	√								

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자
1	동물용의약품 국가출하승인검정 기준	제안	돼지 생식기 호흡기증후군 생건조백신 검정기준	농림축산검역본부	우진비앤지(주)	개정	2023.10.05

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/ 제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	이뮤니스 디엠백	2022. 05.02	녹십자수의약품(주)	우진비앤지(주)	돼지 썬코바이러스 및 이코플라스마성 폐렴 예방 복합백신	2025	-	-
2	이뮤니스 마이코	2022. 05.06	녹십자수의약품(주)	우진비앤지(주)	돼지 마이코플라스마성 폐렴 예방 백신	2025	-	-
3	이뮤니스 썬코-디	2022. 05.06	녹십자수의약품(주)	우진비앤지(주)	돼지 썬코바이러스 예방 백신	2025	-	-

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시	기술이전(통상실시) 계약서	우진비앤지	2021.12.28	5,000,000원	
2	직접실시	기술이전(직접실시)	우진비앤지	2022.10.17	0원	

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국내 또는 국외 중 해당하는 사항을 기재합니다.

매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수 출				

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1	기술사업화지원사업	우진비앤지	2	0	2
합계					

고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021	1				1		1				
2		2022	1				1		1				

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기사	팜뉴스	우진비앤지, 'PRRS 바이러스' 예방 백신 임상계획 승인	2021.07.16
2	기사	축산경제신문	우진비앤지, 이뮤니스 디엠백 임상계획 승인	2021.10.01
3	기사	헬스코리아뉴스	우진비앤지, 돼지생식기호흡기증후군 예방백신 임상계획 승인	2021.10.25
4	기사	축산경제신문	우진비앤지 써코·마이코 혼합백신 특허 출원	2022.08.26
5	기사	양돈타임스	우진비앤지 “양돈 질병 걱정 줄였다”	2022.10.17

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[기타 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문을 포함합니다)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진목표	달성내용	달성도(%)
◦ PRDC 관련 병원체들에 대한 대량배양 시스템 개발.	◦ 써코바이러스(PCV2d), 마이코플라즈마 (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>) 및 PRRS 바이러스(NA 및 EU type) 생산주 확보 및 배양조건 확립	100
◦ PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type)의 배양조건 개선 및 바이러스 역가 상승유도.	◦ PCV2 (d type) 및 PRRSV (NA 및 EU type)의 배양조건 개선 및 바이러스 역가 상승 및 시험백신 제조. ◦ DMVac, PRRS-M 및 PRRS-NA 백신의 야외임상시험계획 승인.	100
◦ 써코-마이코 복합백신 실험실내 효능(공격접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가.	◦ 써코-마이코 복합백신인 DMVac의 자돈에서의 효능(공격접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가완료.	100
◦ PRRS-NA 생독 백신 안전성(역계대) 시험과 시험결과 분석 및 평가.	◦ PRRS-NA 생독 백신의 역계대시험을 통한 안전성시험과 시험자료 분석 및 평가 완료.	100
◦ PRRS-M 사독 백신 야외임상시험 및 시험결과 분석.	◦ 3개 농장에서 PRRS-M 사독 백신의 야외임상시험을(전반부; 3주령 ~ 16주령 & 후반부: 16주령 ~ 25주령) 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가 완료.	100
◦ PCV2 항체-free 마이코플라즈마 대량배양 시스템 개발.	◦ Anti-PCV2 IgG가 감소된 돼지 혈청을 이용하여 마이코플라즈마를 배양.	100
◦ Mycoplasma Broth Base 기반 및 PPLO broth 기반 조건 확인.	◦ 마이코플라즈마 배양 배지 조성을 확인하고 배지 조성별 또는 혈청별(돼지 및 말 혈청) 함량에 따른 성장률을 분석.	100
◦ Friis broth 기반 조건 확인.	◦ 마이코플라즈마 시판배지(Friis broth)에 대한 조성을 확인하고 조성별 배양을 진행하여 최적화된 배양조건을 확인.	100
◦ 대량배양 조건 평가.	◦ 마이코플라즈마의 함량분석법 및 최적화된 대량배양 조건 확립.	100
◦ 써코-마이코 복합 백신, DMVac의 야외 임상시험 및 시험결과 분석.	◦ DMVac 복합 백신의 야외임상시험(전반부; 3주령 ~ 16주령 & 후반부: 16주령 ~ 25주령)을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가 완료.	100
◦ 백신 품목허가 승인 및 보완	◦ PRRS-NA 백신 제품의 품목허가를 승인 받았고. PRRS-M 및 DMVac 백신은 기술검토 보완을 완료.	100
◦ 신규 백신의 국가검정시험법 개발	◦ PRRS-NA 백신 제품의 국가출하승인검정 기준을 개정.	100
◦ 백신 제품홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립	◦ PRRS-NA 및 DMVac 백신 제품의 카탈로그 작성 및 국내외 거래처 홍보	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 특허출원은 하였으나, 이에 대한 특허등록은 완료하지 못하였다. 특허등록 심사에서 이뮤니스 디엠백(써코바이러스2d형 및 마이코플라즈마 복합 백신)의 방어효능 및 기존 써코바이러스와 마이코플라즈마 복합 백신과 비교 했을 때, 신규성이 부족하다는 평가를 받았다. 이에 효능평가 부분에 대한 보완은 타사 백신과 본 백신과의 방어효능 비교평가 시험결과로 제출할 예정이고, 신규성 부분에 대한 보완은 디엠백 백신의 유전자형과 기존 제품과의 차별성을 강조할 예정입니다. 특허등록을 완료하여 과제연구성과 100%를 달성할 수 있도록 하겠다.
 - 정량적 성과에서 기술료 목표인 30백만원(5백만원 달성) 달성은 이루지 못했으나 제품 출시 후 이뮤니스 디엠백 백신의 대량배양공정법과 써코바이러스 분석법에 대한 기술이전을 통해 총 30백만원 이상의 기술이전 비용을 달성할 수 있도록 하겠다.
-

2) 자체 보완활동

- 해당사항 없음
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 해당사항 없음
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기대효과 : 기술적 측면

- ✓ 백신주 및 대량배양조건 확립을 통해 구축될 대량생산시스템은 질병원인체에 대한 백신의 산업화를 위해 최적화된 대량배양 원천기술을 제공할 것임.
- ✓ 국내분리주로부터 백신주를 구축하여 백신 제품화까지의 기술개발을 통한 백신의 산업화를 촉진함.
- ✓ 백신주를 이용한 질병 원인체 진단용 키트 개발(항원 및 항체 진단용 ELISA kit) 및 이를 활용한 분석법 개발 기술의 확보.
- ✓ 생독백신과 사독백신이 적용된 백신 시스템을 확립하여 농가에 보급할 계획으로 두 제품 간의 시너지 효과를 낼 수 있을 것임.
- ✓

○ 기대효과 : 경제적·산업적 측면

- ✓ 국내분리주로부터 백신주를 구축하여 백신 제품화까지의 기술개발을 통해 국내백신산업의 활성화를 유도함.
 - ✓ 백신제조기술 분야의 첨단기술 전문가를 배출할 수 있는 기회를 제공함.
 - ✓ 돼지호흡기질병으로 인한 양돈 농가의 피해를 감소할 수 있으며 양돈 농가의 소득증대를 통해 지역경제를 활성화 할 수 있음.
 - ✓ 돼지호흡기예방 백신의 제품화 및 상용화를 통해 다국적 기업이 차지하고 있는 국내백신시장의 시장점유율을 낮출 수 있을 것이며, 수출을 통해 축산산업의 성장에 기여할 수 있음.
 - ✓ 국내 양돈 농가로부터 국내백신의 품질에 대한 신뢰도를 높일 수 있는 계기가 될 것임.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 연구개발성과의 활용계획

- ✓ 국내 양돈장에서 유행하고 있는 돼지호흡기질병의 주요 병원체인 썬코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 단일 및 복합 백신의 제품화를 통한 돼지호흡기질병의 예방 및 근절.
 - ✓ 돼지호흡기질병에 대한 다국적 기업의 백신이 국내 점유율이 90%를 넘고 있는 현실에서 최근 국내분리주로 제조된 백신 제품으로 국내 백신의 시장점유율을 높일 것임.
 - ✓ 동일 질병의 원인체에 대해 약독화된 생백신과 사독백신을 제품화하여 상호 보완해서 사용할 수 있는 백신 프로그램의 개발.
 - ✓ 국내 분리주인 백신주를 이용하여 최근 발병하고 있는 돼지호흡기질병을 진단할 수 있는 진단키트(ELISA kit) 개발에 활용할 계획.
 - ✓ 최근 유행하고 있는 국내분리주로 제작된 사독백신 제품이 없는 실정에서 북미형과 유럽형이 모두 포함된 국내분리주로 제작된 제품의 개발을 통해 국내 내수용 및 수출용으로 판매할 계획.
-

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	매년 목표치
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	
	국외	
	계	
특허등록	국내	
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	상품출시	
	기술이전	
	공정개발	
제품개발	시제품개발	
비임상시험 실시		
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상
		2상
		3상
	의료기기	
진료지침개발		
신의료기술개발		
성과홍보		
포상 및 수상실적		
정성적 성과 주요 내용		

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원 연구개발사업 ‘썬코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발’ 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원 전문기관)에서 시행한 ‘썬코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발’ 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	821032-03		
사업구분	기술사업화지원사업사업				
연구분야	동물의약품개발		과제구분	단위	
사업명	기술사업화지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	써코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발		과제유형	개발	
연구개발기관	우진비앤지(주)		연구책임자	김 정 한	
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2021.04.01. - 2021.12.31	225,000	50,000	275,000
	2차년도	2022.01.01. - 2022.12.31	300,000	60,000	360,000
	3차년도	2023.01.01. - 2023.12.31	300,000	60,000	360,000
	4차년도	-	-	-	-
	5차년도	-	-	-	-
	계	2021.04.01. - 2023.12.31	825,000	170,000	995,000
참여기업	우진비앤지(주)				
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
우진비앤지(주)	이사	김 정 한

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 김 정 한

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	김 정 한
-----	-------

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 매우 우수

현재 국내 및 전 세계적으로 가장 많이 분포되어 있는 돼지췌코바이러스는 PCV2d 유전형이며, 이를 예방하기 위한 가장 효과적인 백신은 PCV2d를 함유하는 췌코바이러스 백신임. DMVac은 PCV2d 및 돼지호흡기질병에 중요한 병원체인 마이코플라즈마를 백신주로 포함하고 있기 때문에 돼지호흡기복합질병(Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC)을 우수하게 방어할 수 있는 백신임. 또한 품목허가를 받은 PRRS-NA 생독 백신은 최근 국내 유행하고 있는 PRRS 바이러스를 효과적으로 방어할 수 있는 lineage 1 type 이고, PRRS-M 사독 백신은 점차 국내에서 확산되고 있는 유럽형 PRRS 바이러스를 포함하고 있는 백신임. 본 과제를 통해 개발된 이 3가지 백신은 국내 돼지호흡기복합질병을 효과적으로 예방할 수 있는 중요한 백신으로 국내 돼지 농가에 꼭 필요한 백신이 될 것이며, 이 백신을 상용화하기 위한 항원의 최적화된 대량배양공정기술 또한 우수한 성과로 판단됨. 이로 인해 본 과제의 연구개발결과는 매우 우수하다고 사료됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

본 연구과제를 통해 개발된 3개의 백신(IMMUNIS DMVac, PRRS-NA 및 PRRS-M)은 최근 유행하고 있는 국내 돼지호흡기복합질병에 효과적으로 대응할 수 있는 백신으로써 국내 돼지 농가에 꼭 필요한 백신이 될 것이며, 돼지호흡기질병에 대한 다국적 기업 백신의 국내 점유율이 90%를 넘고 있는 현실에서 외국 백신을 대체할 수 있는 필수적인 백신이 될 가능성이 높은 백신임. 이로 인해 국내 백신의 시장점유율을 높일 것으로 사료됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

본 연구과제를 통해 개발된 백신들은 돼지호흡기질병을 효과적으로 예방할 수 있고 다른 농장으로의 차단 방역을 가능케 함. 최근 국내 유행하고 있는 질병의 병원체에서 분리된 백신 항원들은 돼지호흡기질병을 진단할 수 있는 진단키트(ELISA kit) 개발에 활용 가능하고, 동일 질병의 원인체에 대한 백신주로 약독화된 생독 및 사독 백신의 제품화를 통해 상호 보완할 수 있는 백신 프로그램의 개발이 가능할 것으로 판단됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 매우 우수

총 2년 9개월의 연구기간 동안 목표하고자 한 3가지 백신의 개발이 완료되었고, 그 중 한 가지 백신인 PRRS-NA 생독 백신은 품목허가를 획득하여 제품 생산을 위한 기술이전단계에 있음 다른 두 백신 또한 품목허가자료 보완을 완료한 상태로 곧 품목허가를 받을 수 있을 것으로 사료됨. 본 백신들을 상용화하기 위해 많은 동물시험들이 수행되었고, 항원함량 및 기타 효능평가를 위한 분석법 개발이 수행되었음. 그리고 백신의 일정한 품질을 위해서는 일정량 이상의 항원이 함유되어야 하기 때문에 백신주에 대한 대량배양공정기술이 꼭 개발되어야 함. 또한 백신 시드의 마스터 세포은행 및 제조용 세포은행을 구축하고 대량배양조건을 확립 함으로써 일정한 품질의 백신 제품을 생산할 수 있는 기반을 확보하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

본 연구 결과를 통해 백신의 안전성 및 효능이 우수한 백신을 개발함에 따라 해외 유수의 전문학술지에 6편 이상의 많은 논문을 게재하였고, 국내 및 국제학회에서도 3회 이상의 발표를 통해 본 백신들의 우수성을 널리 알리게 되었음. 또한 본 백신에 대한 특허출원을 통해 지적소유권도 확보하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
<ul style="list-style-type: none"> PRDC 관련 병원체들에 대한 대량 배양 시스템 개발 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 써코바이러스(PCV2d), 마이코플라즈마 (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>) 및 PRRS 바이러스(NA 및 EU type) 생산주 확보. PRDC 관련 병원체들에 대한 대량배양조건 확립.
<ul style="list-style-type: none"> PCV2 항체-free 마이코플라즈마 대량 배양 시스템 개발 	5		<ul style="list-style-type: none"> Anti-PCV2 IgG가 감소된 돼지혈청을 이용하여 마이코플라즈마를 배양. 마이코플라즈마 배양 배지 조성을 확인하고 배지 조성별 또는 혈청별(돼지 및 말 혈청) 함량에 따른 성장률을 분석.
<ul style="list-style-type: none"> DMVac(써코-마이코 복합 백신) 실험실 내 효능(공격접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 써코-마이코 복합 백신인 DMVac의 자돈에서의 효능(공격 접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가 완료.
<ul style="list-style-type: none"> PRRS-NA 생독 백신 안전성(역계대) 시험과 시험자료 분석 및 평가 	10	100	<ul style="list-style-type: none"> PRRS 생독 백신인 PRRS-NA 백신의 역계대시험을 통한 안전성 시험과 시험자료 분석 및 평가 완료.
<ul style="list-style-type: none"> PRRS-M 사독 백신 야외임상시험 및 시험결과 분석 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> 3개 농장에서 PRRS-M 사독 백신의 야외임상시험을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가를 완료.
<ul style="list-style-type: none"> DMVac 복합 백신 야외임상시험 및 시험결과 분석 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> 3개 농장에서 DMVac 복합 백신의 야외임상시험을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가를 완료.
<ul style="list-style-type: none"> PRRS-NA 생독 백신 야외임상시험 및 시험결과 분석 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> 3개 농장에서 PRRS-NA 생독 백신의 야외임상시험을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가를 완료.
<ul style="list-style-type: none"> 백신 품목허가 및 신규 백신의 국가검정시험법 개발 	15	100	<ul style="list-style-type: none"> PRRS-NA 백신 제품의 품목허가를 승인 받았고, PRRS-M 및 DMVac 백신은 기술검토보완 완료. PRRS-NA 백신 제품의 국가출하 승인검정 기준을 개정.
<ul style="list-style-type: none"> 백신 제품홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립 	5	100	<ul style="list-style-type: none"> PRRS-NA 및 DMVac 백신 제품의 카탈로그 작성 및 국내외 거래처 홍보.
합계	100점	100	<ul style="list-style-type: none"> 3개의 백신(IMMUNIS DMVac, PRRS-NA 및 PRRS-M)을 개발하였고, 제품화를 위한 세부연구목표를 모두 완료하였음.

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구의 최종 목표는 쉐코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발을 하는 것임. 현재 돼지호흡기복합질병(PRDC)은 돼지 산업에 지속적으로 중요한 경제적 문제를 야기시키고 있음. 본 연구과제를 통해 개발된 3개의 백신(IMMUNIS DMVac, PRRS-NA 및 PRRS-M)은 돼지호흡기복합질병을 일으키는 핵심적인 병원체인 돼지쉐코바이러스 2형(Porcine circovirus, PCV2), 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 및 마이코플라즈마 하이오뉴모니아(*Mycoplasma hyopneumoniae*, MH)를 효과적으로 방어할 수 있는 백신으로써 3개 농장에서의 야외임상시험을 통해 안전성과 효능을 평가하였음. 그 중 PRRS 바이러스를 효과적으로 방어할 수 있는 lineage 1 type의 PRRS-NA 생독 백신은 품목허가를 획득하여 판매를 위한 생산 준비를 진행하고 있고, 다른 2개의 백신 품목도 품목허가를 진행중에 있음. 이 3가지 백신은 국내 돼지호흡기복합질병을 효과적으로 예방할 수 있는 중요한 백신으로 국내 돼지 농가에 꼭 필요한 백신이 될 것이며, 돼지호흡기질병에 대한 다국적 기업 백신의 국내 점유율이 90%를 넘고 있는 현실에서 외국 백신을 대체할 수 있는 중요한 백신 품목들임. 또한 고품질의 백신 항원을 생산하기 위해 필수적인 항원의 최적화된 대량배양공정기술 개발도 본 과제의 우수한 성과로 판단됨. 이로 인해 본 과제의 연구개발결과는 매우 우수하다고 사료되며, 이 실험결과는 해외 유수의 전문학술지에 6편 이상의 많은 논문으로 게재되었고, 국내 및 국제학회에서도 3회 이상의 발표를 통해 본 백신들의 우수성을 널리 알리고 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구사업으로 인해 국내뿐만 아니라 국제적으로 큰 문제가 되고 있는 돼지호흡기질병에 대한 중효한 예방 백신들을 개발하였고, 백신들의 제품화 및 상용화를 원활하게 연결시켜줄 수 있는 다양한 기술 및 프로세스가 본 과제를 통해 개발되었음. 본 과제 평가시, 이러한 점을 높게 평가해주시길 바라며, 소중한 국가 예산을 제품 개발에 있어 중요한 순간에 지원해주셔서 크게 감사하게 생각함. 제품 상용화를 위해 기업의 모든 노력을 기울일 것임.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구과제를 통해 개발된 백신들은 돼지호흡기질병을 효과적으로 예방할 수 있고 다른 농장으로의 차단 방역을 가능케 할 것임. 최근 국내 유행하고 있는 질병의 병원체에서 분리된 백신 항원들은 또한 돼지호흡기질병을 진단할 수 있는 진단키트(ELISA kit)로의 개발에도 활용할 수 있는 가능성이 높고, 동일 질병의 원인체에 대한 백신주로 약독화된 생독 및 사독 백신의 제품화를 통해 상호 보완할 수 있는 백신 프로그램의 개발도 가능할 것으로 판단됨. 본 백신 제품들은 외국 백신을 대체할 수 있을 것으로 사료되며, 이로 인해 국내 및 해외에서의 시장성을 높일 수 있고, 국내 양돈 농가로부터 국내 백신의 품질에 대한 신뢰도를 높일 수 있는 계기가 될 것으로 판단됨.

IV. 보안성 검토

○ 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당사항 없음.

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

해당사항 없음.

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	써코, 마이코플라즈마, PRRSV의 단일 및 복합 백신의 사업화를 위한 제품화 개발			
주관연구개발기관	우진비앤지(주)		주관연구책임자	김정환
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	825,000	170,000		995,000
연구개발기간	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31(2년 9개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① PRDC 관련 병원체들에 대한 대량배양 시스템 개발	- 써코바이러스(PCV2d), 마이코플라즈마 (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>) 및 PRRS 바이러스(NA 및 EU type) 생산주 확보. - PRDC 관련 병원체들에 대한 대량배양조건 확립.
② DMVAc(써코-마이코 복합 백신) 실험실 내 효능(공격접종) 시험 및 PRRS-NA 생독 백신 안전성(역계대) 시험과 시험자료 분석 및 평가	- 써코-마이코 복합 백신인 DMVAc의 자돈에서의 효능(공격접종) 시험과 시험자료 분석 및 평가 완료. - PRRS 생독 백신인 PRRS-NA 백신의 역계대시험을 통한 안전성시험과 시험자료 분석 및 평가 완료.
③ PRRS-M 사독 백신, PRRS-NA 생독 백신 및 DMVAc 복합 백신의 야외임상시험 및 시험결과 분석	- 3개 농장에서 PRRS-M 사독 백신, PRRS-NA 생독 백신 및 DMVAc 복합 백신의 야외임상시험을 진행하였고, 백신의 안전성 및 효능평가를 완료.
③ 백신 품목허가 및 신규 백신의 국가검정시험법 개발	- PRRS-NA 백신 제품의 품목허가를 승인 받았고, PRRS-M 및 DMVAc 백신은 기술검토보완 완료. - PRRS-NA 백신 제품의 국가출하승인검정 기준을 개정.
④ 백신 제품홍보 및 수출을 위한 마케팅 전략 수립	- PRRS-NA 및 DMVAc 백신 제품의 카탈로그 작성 및 국내외 거래처 홍보.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (명)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 년 건 수	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10			30		10							20		10		10		
최종 목표	1	1			1	30	3	308	150			1	1	3	2		2			
당해 년도	목표	1	1		1	30	2					1	1	3	2		2			
	실적	1			1	5	3			2		6		4	2		6			
달성률 (%)	100	0			100		150			200		600		133	100		300			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	PRDC 관련 병원체들에 대한 백신 시드 구축 및 대량배양공정기술
②	PCV2 항체-free 마이코플라스마 대량배양 시스템 개발 기술
③	생독 백신의 약독화 및 안전성 평가 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 결	정책 자료	기타
①의 기술					√	√				
②의 기술					√					
③의 기술					√					

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 백신주 및 대량배양조건 확립을 통해 구축될 대량생산시스템은 질병원인체에 대한 백신의 산업화를 위해 최적화된 대량배양 원천기술을 제공. - 백신제조기술 분야의 첨단기술 전문가를 배출할 수 있는 기회를 제공. - 국내분리주로부터 백신주를 구축하여 백신 제품화까지의 기술개발을 통한 백신의 산업화를 촉진할 수 있음.
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 양돈장에서 유행하고 있는 돼지호흡기질병의 주요 병원체인 썬코바이러스, 마이코플라즈마, PRRSV 단일 및 복합 백신의 제품화를 통한 돼지호흡기질병의 예방 및 근절. - 백신주를 이용한 질병 원인체 진단용 키트 개발(항원 및 항체 진단용 ELISA kit) 및 이를 활용한 분석법 개발 기술의 확보 가능. - 동일 질병의 원인체에 대해 약독화된 생백신과 사독 백신을 제품화하여 상호 보완해서 사용할 수 있는 백신 프로그램의 개발이 가능.
③의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 최근 유행하고 있는 국내분리주로 제작된 사독백신 제품이 없는 실정에서 북미형과 유럽형이 모두 포함된 국내분리주로 제작된 제품의 개발을 통해 국내 내수용 및 수출용으로 판매할 수 있음. - 돼지호흡기질병에 대한 다국적 기업 백신의 국내 점유율이 90%를 넘고 있는 현실에서 최근 국내분리주로 제조된 백신 제품으로 국내 백신의 시장점유율을 높일 것임. - 동일 질병의 원인체에 대해 약독화된 생백신과 사독백신을 제품화하여 상호 보완해서 사용할 수 있는 백신 프로그램의 개발.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	SMART	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문 SCI	논문 비SCI			논문 평판 I-F	학술 발표	
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	10			30		10							20		10		10	
최종목표	1	1			1	30	3	308	150			1	1	3	2		2		
연구기간내 달성실적	1				1	5	3			2		6		4	2		6		
연구종료후 성과창출 계획		1						308	150										

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	신규한 돼지 썬코바이러스 2d형 및 마이코플라즈마성 폐렴 불활화 복합 백신 조성물 및 제조방법		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타(직접 실시)		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

연구진실성 관련 연구부정행위 예방을 위한 확인서

※ 주관·공동·위탁과제별로 연구책임자가 자체 점검 후 작성·제출

구분	번호	내용	예	아니오
위조	1	연구 수행 전과정에서 존재하지 않는 데이터 또는 결과 등을 거짓으로 만들거나 기록한 사실이 없는가?	○	
	2	연구수행 과정에서 데이터 또는 결과 등을 임의적으로 사실과 다르게 변형, 삭제, 왜곡하여 기록한 사실이 없는가?	○	
표절	3	이미 발표된 타인의 독창적인 아이디어나 연구성과물을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	4	일반적 지식이 아닌 타인의 독창적인 개념, 용어, 문장, 표현, 그림, 표, 사진, 영상, 데이터 등을 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	5	타인의 연구성과물을 그대로 쓰지 않고 풀어쓰기(paraphrasing) 또는 요약(summarizing)을 하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	6	외국어 논문이나 저서를 번역하여 활용하면서 출처를 정확하게 표기하였는가?	○	
	7	2차 문헌을 활용하면서 재인용 표기를 하지 않고 직접 원문을 본 것처럼 1차 문헌에 대해서만 출처를 표기한 적이 없는가?	○	
	8	출처 표기를 제대로 했으나, 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	
	9	타인의 저작물을 여러 번 인용한 경우 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처를 표기하였는가?	○	
	10	타인의 저작물을 직접 인용 할 경우, 적절한 인용 표기를 했는가?	○	
부당한 저자 표기	11	연구에 지적 기여를 한 연구자에게 저자의 자격을 부여하였는가?	○	
	12	연구에 지적 기여를 하지 않은 연구자에게는 저자의 자격을 제외하였는가?	○	
	13	저자들의 표기 순서와 연구 기여도가 일치하는가?	○	
부당한 중복 계재	14	자신의 이전 저작물을 활용하면서 적절한 출처 표기를 하였는가?	○	
	15	자신의 이전 저작물을 여러 번 활용하면서 모든 인용 부분들에 대해 정확하게 출처 표기를 하였는가?	○	
	16	자신의 이전 저작물을 활용하면서 출처 표기를 제대로 했으나 인용된 양 또는 질이 해당 학문 분야에서 인정하는 범위 이내 라고 확신할 수 있는가?	○	

점검결과를 위와 같이 연구윤리 위반 사항이 없음을 확인하며, 위반사실이 확인될 경우 「국가연구개발혁신법」 제32조1항에 따라 참여제한, 연구비 환수 등 처분을 받게 됨을 인지하고 아래와 같이 서명합니다.

2024 . 02 . 26 .

기관명 : 우진비앤지(주)

점검자 : 김 정 한 (서명)



농림식품기술기획평가원장 귀하