

최 중
연구보고서

염소의 보더병 발생 역학조사와
진단법개발
Epidemiological Survey on and
Development of Diagnostic Method for
Border Disease of Goat

연구기관

전남대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “염소의 보더병 발생 역학조사와 진단법개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 5월 일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 조 경 오

세부연구책임자 : 조 경 오

연 구 원 : 강 문 일

연 구 원 : 이 정 길

연 구 원 : 정 재 호

연 구 원 : 김 유 정

연 구 원 : 정 현 정

협동연구기관명 : 수의과학검역원

협동연구책임자 : 권 창 희

연 구 원 : 이 오 수

연 구 원 : 현 방 훈

연 구 원 : 황 인 진

연 구 원 : 이 경 기

연 구 원 : 이 경 우

연 구 원 : 박 현 정

연 구 원 : 김 인 중

연 구 원 : 강 보 규

요 약 문

I. 제 목

염소의 보더병 발생 역학조사와 진단법개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 최종 목표는 국내 염소에서 보더병에 대한 발생 역학조사 및 진단법을 개발하는 것이다. 또한 보더병 이외에도 국내에서 발생하고 있을 것으로 예상되는 중요 질병들에 대한 혈청학적 검사를 통해 국내에서 사육 중인 염소질환에 대한 질병 모니터링을 하여 향후 이에 대한 예방, 치료, 방역 대책에 대한 기본 자료로 활용함에 있다. 특히 진단법 개발에 있어서는 염소에 흔들병을 일으킬 수 있는 보더병 외에도 보더병과 근연관계에 있는 *Flaviviridae* 내 *Pestivirus* 내의 bovine viral diarrhea virus type 및 classical swine fever virus에 대한 신속·정확한 최첨단의 감별진단법을 개발함에 있다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

90년도 후반부터 국내 염소 산업은 소규모 영세 사육형태에서 대규모 사육형태로 빠르게 변화하고 있다. 따라서 이런 사육규모의 변화에 따른 지금까지 예상하지 못했던 질병의 발병형태가 문제시되고 있다. 즉 예전의 소규모 사육형태에서는 급성의 질병이 발생하여도 문제시되지 않았지만, 사육의 대규모화에 따라 급성의 질병이 발생하게 되면 강한 전파에 의해서 대규모로 질병이 발생할 가능성이 커지고 있기 때문이다. 따라서 염소 사육의 대단위화·전업화 경향에 따른 질병의 발생 상황의 변화 등을 포함한 역학조사와 진단체계의 확립을 통한 저비용 고효율의 생산 개발체계가 시급한 실정이다. 특히 번식기 질환으로 주로 유산이나 사산을 위주로 나타나는 흔들병이라고도 불리우는 *Flaviviridae Pestivirus* 내의 border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1과 2 및 classical swine fever virus에 의한 보더병 및 보더병 유사 질병 등이 알려져 있다.

이 외에도 보더병과 유사한 질병들을 일으킬 수 있는 것들은 몇몇 세균성 및 기생충성 질병 등이 알려져 있다. 다양한 원인에 의해서 발생하고 있는 염소의 흔들병이지만, 실제로 *Flaviviridae* 내의 border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1과 2 및 classical swine fever virus에 의한 흔들병이 주요 원인이다. 염소의 흔들병은 염소를 사양하고 있는 세계 여러 나라에서 발생보

고가 있다. 국내에서도 새끼 염소들에서 흔들병이라고 알려진 질병이 발생하고 있으나 이에 대한 체계적인 연구가 진행되지 않고 있다. 더욱이 국내에서 보더병에 대한 염소군내 혈청학적 검사나 바이러스 분리는 이루어진 바 없다. 다만, 보더병에 대한 역학적 발생 정보는 국립수의과학 검역원에서 염소에서 최근 혈청학적 검사를 시도한 바 있으나 그 감염률은 매우 낮았다. 그러나 매년 번식계절과 맞물려 유산태풍과 같은 피해가 염소 목장 내에서 발생되고 있으며 생후 3주 이내의 보더병양 질병의 폐사율은 거의 70-80%에 가깝다. 따라서 일반적으로 질병에 대한 올바른 방역 대책을 마련하기 위한 그 첫 단계는 해당 질병의 정확한 발생 역학적 정보의 확보가 반드시 파악되어야 한다. 또한 신속·정확한 진단을 통한 질병의 조기 근절을 위해서는 민감도와 정확성이 확보된 신속·정밀 진단법의 개발이 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

국내 축산업은 최근의 전면적인 시장 개방으로 외국의 축산물에 대한 경쟁력 강화가 무엇보다 시급한 실정이다. 이를 위해서는 첨단과학기술을 이용한 축산물의 생산성 향상에 주력하여야 한다. 우리 축산업의 야외 상황을 고려할 때 가장 큰 걸림돌이 바로 질병 문제이다. 연간 축산 총생산액 (53,112억, 97년) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 입고 있기에 질병 문제에 보다 적극적이고 과학적인 기술 확보는 우리 축산업 기반강화에 반드시 필요한 과제가 아닐 수 없다. 국민 총생산 중 농림어업이 차지하는 비중은 점차

감소하고 있는데 비해 농림수산 중 축산업이 차지하는 비중은 약 150%나 증가 (7.8%, '80→11.7%, '95)하고 있고, 호당 농업조수입 중 축산부분 수입은 약 3 배 가량 증가 (12.1%, '80→34.9%, '98)하여 우리 축산업이 농가 전체에 미치는 경제적 영향이 해마다 증가하고 있는 상황이다. 이와 같이 대체 동물로 부각되고 있는 것이 염소이다.

염소가 외국산에 비해서 경쟁력이 있는 것은 전량 수입산인 농후사료에 의존 하지 않고 국내 부존자원인 산지를 충분히 활용할 수 있어서 사료비를 절감할 수 있기 때문이다. 또한 우리나라의 기후와 풍토에 강한 적응력을 가지고 있고, 일반적으로 여러 마리가 무리를 지어 생활하는 습성 때문에 관리하는데 용이할 뿐만 아니라 축산폐수로 인한 규제가 불필요하여 가장 친환경적인 축종이라고 할 수 있다. 최근의 조사에 의하면 국내에서 사육되고 있는 염소의 종류는 재래 염소, 젓염소 등이며, 농가에서 사육하고 있는 염소들은 염소가 대부분으로 수적으로는 교잡염소(염소)가 가장 많고, 다음으로 재래염소(염소)순 이다. 염소의 사육현황을 보면, 사육농가의 경우 90년대 초반부터 꾸준히 증가하다가 IMF를 맞아 조금 감소하였지만, 최근에는 다시 활발히 증가하고 있다고 한다. 뿐만 아니라 300두 이상 사육하는 농가 수 역시 90년도에는 8호에 불과했던 것이 96년도에는 114호까지 급격히 증가했다가 IMF를 맞아 99년에는 80호로 감소하다가 2000년도 이후에는 꾸준히 증가하고 있는 추세이다.

사육규모면에서도 소규모 사육농가는 점점 줄어든 반면 전업적으로 다두 사육하는 농가가 증가하여 1000두 이상 사육하는 기업형 농장도 더욱 늘어나고 있

다. 국내 염소의 도별 사육 분포를 보면 대전이남지역에서 70%이상의 사육편중 현상을 보이고 있었으나 최근 경기와 충청도에서 그 사육증가율이 서울 등 대도시의 소비증가에 따라 다른 시도에 비해 더 높은 현상을 보이고 있고, 이에 따라 염소의 산업화는 가일층 가속화 되고 있다고 할 수 있다. 이와 같은 소규모 영세 사육형태에서 대규모 사육형태로의 변화에 따라 전파성이 강한 질병이 한번 발생하면 농장 전체에 걸쳐 사육기반이 흔들릴 정도로 막대한 경제적 피해를 초래할 수 있다. 따라서 염소 목장에서 발생중인 질병의 역학적인 조사가 과학적이고 정밀하게 수행되어야 한다. 이러한 역학조사 결과를 근간으로 하여서 국내에서 다발하고 있는 보더병양 질환뿐만 아니라 염소의 주요 질병에 대한 예방, 치료, 방제 대책을 강구할 수 있으며, 또한 이에 대한 신속·정확한 진단법을 개발하게 될 것이다.

다. 사회·문화적 측면

예로부터 염소는 보약용으로 알려진 특수동물로 인식되어 약용으로 소비되고 있다. 특히 고기 및 젓에 함유되어 있는 칼슘의 함량은 쇠고기의 10배, 돼지고기의 20배이며, 인은 돼지와 쇠고기의 4배, 단백질은 개고기보다 3배를 함유하여 쇠고기 및 돼지고기와 비슷한 수준을 함유하고 있어 보약과 영양식으로 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 재래염소는 소와 사육역사가 비슷한 가축이면서도 일반 축산물 대상에 포함되지 않음에 따라 연구가 미진한 실정이다.

우리나라 국민의 급격한 보건인식 향상에 의해 안전성이 확보된 위생적인 식

품에 대한 욕구가 더욱 증가하고 있다. 최근 국내에서 발생한 조류 인플루엔자나 구제역 파동 등은 좋은 예라 할 수 있다. 염소에서 발생하고 있는 이 보더병양 질환은 소와 돼지 등 다른 가축으로 전염될 수 있다는 가능성을 지닌 병원체로 알려져 있다. 따라서 이러한 중간 전염성 질환뿐만 아니라 염소에 치명적인 질환을 일으키는 보더양 병원체에 대한 발생역학 정보는 염소육의 안전성 확보뿐만 아니라 양육에 대한 위생수준의 확보를 위해 꼭 필요한 자료가 될 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 제1협동과제

가. 진단법 개발

1) RT-PCR 기법개발: 본 연구과제를 통해 국내에서 처음으로 Pestivirus 내에 속해 있는 4가지 바이러스성 질병, 즉 border disease virus, bovine viral diarrhea type 1 및 type 2, 그리고 classical swine fever를 감별진단할 수 있는 RT-PCR 기법을 개발하였다. 본 진단법의 개발을 통해 Pestivirus 내에 속해 있는 border disease virus, bovine viral diarrhea type 1 및 type 2, 그리고 classical swine fever를 감별 진단할 수 있게 되었다.

2) Real-time RT-PCR 기법개발: 본 연구과제를 통해 세계에서 처음으로 Pestivirus 내에 속해 있는 4가지 바이러스성 질병, 즉 border disease

virus, bovine viral diarrhoea type 1 및 type 2, 그리고 classical swine fever를 실시간으로 그리고 정량적으로 진단할 수 있는 real-time RT-PCR 기법을 개발하여 향후 국내에서 발생하거나 혹은 검역당국에서 검역을 위한 진단법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 진단법에 대한 기법을 향후 논문화 하여 국내뿐만 아니라 세계적으로 활용할 수 있도록 하겠다.

나. 야외 증례에서 Pestivirus 검출

- 1) ELISA 기법을 이용한 Pestivirus 항체가 검출: 국내에서 발생하고 있는 혼들병의 원인이 될 수 있는 border disease virus, bovine viral diarrhoea virus, 그리고 classical swine fever의 항체가 검사를 실시한 결과 bovine viral diarrhoea virus가 국내 염소의 혼들병의 주요 원인일 가능성을 확인하게 할 수 하였다.
- 2) 중화항체기법을 이용한 Pestivirus 항체가 검출: 상술한 ELISA 검사치에서도 확인된 바와 같이 ELISA 검사치를 중화항체기법을 통하여 검사한 결과, 상술한 ELISA 결과치를 확인할 수 있었다.
- 3) RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus 검출: 국내 염소 농가에서 보더병의 발생원인체를 조사하기 위해서, 본 사업년도 이전에 수의과학검역원에 의뢰한 가검물과 본 사업년도에 채취한 가검물을 이용하여 보더병 바이러스의 검출을 시도하였다. 즉 본 사업이 시작된 2004년도 (제1차년도)에는 35개 야외 염소농장에서 채취한 혈액 재료 53두분과 조직 3두분을, 제2차년도에는 전국

223개 농가의 1,142두분의 혈액과 충청북도 충주지역에서 34개 농장으로부터 수집한 102두의 염소 비장과 신장조직을 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다. 또한 2차년도에는 상술한 보더병 바이러스에 대한 항체 양성을 나타낸 18농가의 혈액재료와 병성감정으로 접수된 조직, 만성 소모성 바이러스성 질병에 의심되는 농장의 비즙 및 설사시료를 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다. 더욱이 5-15일령의 어린 염소에서 허약증세, 호흡기 및 설사를 일으키며 약 50%의 폐사율을 나타내는 농장의 혈청을 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다. 그 결과 pestivirus에 속하는 4가지 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 PanF 및 PanR primer pair를 이용한 RT-PCR에서 총 7두의 염소 가검물에서 양성 반응의 반응을 확인할 수 있었다.

4) Real-time RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus 검출: 상술한 가검물을 이용하여 real-time RT-PCR을 수행한 결과 똑같은 결과를 확인할 수 있었다.

다. 염소에서 주요 바이러스성 질환에 대한 항체가 검출

1) 국내에서는 처음으로 염소에서 7종 바이러스 질환에 대한 혈청학적 검사를 실시한 결과, IBRV 9.33%, PI3 10.19%, BCoV 0.83%, Akabanevirus 12.69%, Ainovirus 13.02%, Chuzanvirus 0%, JEV 8.98%의 양성율을 각각 나타내었다.

2) 본 검사결과를 통하여 국내에서도 지금까지 염소에서 알려져 있지 않았던

7종의 바이러스성 질병이 발생하고 있으며, 쥘잔바이러스와 소 코로나바이러스를 제외한 전염성 비기관염바이러스, 파라인플루엔자 3, 아까바네 바이러스, 아이노바이러스, 일본뇌염 바이러스가 상당히 높은 비율로 발생하고 있음을 알 수 있었다.

3) 특히 이러한 질병들은 소에서도 다발하는 질병으로서, 이러한 염소의 질병들은 가축과 가축간의 전파의 원인으로 작용할 수 있음을 시사하며, 특히 일본 뇌염의 경우 염소에서는 백신을 수행하지 않기 때문에, 염소와 가축간 혹은 염소와 사람간의 일본 뇌염 전파의 주요한 원인으로 작용할 수 있어서, 경제적인 측면뿐만 아니라 공중보건상에도 중요한 결과임을 알 수 있었다.

라. 보더병 유관 바이러스의 분자특성 규명

1) 본 연구에서 야외 염소 시료를 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과 총 7건의 양성반응이 관찰되었다. 따라서 RT-PCR에 의해서 증폭된 산물을 염기서열하여, 계통학적 분류 검사를 실시한 결과, 모두 bovine viral diarrhea 바이러스와 연관되어 있었고, border disease와는 관련이 없었다. 특히 계통학적으로 국내에서 흔들병을 일으키는 것은 bovine viral diarrhea virus type1과 type2의 발생에 의한 것임을 알 수 있었다. 따라서 국내에서 발생한 염소의 흔들병은 bovine viral diarrhea virus type 1과 2에 의한 감염증인 것으로 결론을 내릴 수 있었다.

2. 제1세부과제

가. 전국적인 규모의 재료 채취

1) 혈액채취: 국내에서 발생하고 있는 보더병 바이러스에 대한 혈청학적 역학 조사에서 통계학적 신뢰성을 확보하기 위해서 전국 223농가의 1142두의 염소로부터 혈액을 성공적으로 채취하였다. 이렇게 대량의 혈액 가검물을 확보함으로써, 본 연구에서는 단지 보더병의 역학조사뿐만 아니라 지금까지 국내에서 전혀 수행되지 않았던 일본 뇌염 등 여러 가지 바이러스성 질환의 혈청 역학조사가 가능하게 되었다.

2) 장기 및 조직채취: 혈청을 채취하기 위해서 방문한 염소 농가에서 총 23두의 폐사 혹은 폐사직전의 염소를 부검하여 장기 및 조직들을 채취하여 본 연구에 성공적으로 사용하였다.

3) 분변채취: 또한 상술한 목적을 달성하기 위해서 방문한 농가에서 약 100여두분의 분변을 채취하여 본 연구에 성공적으로 사용하였다.

나. 병리학적 연구

1) 병리해부검사: 상술한 총 23두의 염소 가검물을 육안적으로 자세히 검사하여, 육안적인 병변들을 기록하고, 장기 및 조직재료를 채취하여 아래 항목의 검사에 활용할 수 있었다.

2) 병리조직검사: 병리해부검사에서 채취한 조직들은 H&E stain, Gram stain 등 여러 가지 조직염색기법들을 사용하여 병리조직검사를 성공적으로 수행하였다. 특히 만성 질병에 의한 아밀로이드증, 각각의 기생충 감염증, 세균성 감염증, 바이러스성 감염증 등 다양한 병변들을 확인할 수 있었으며, 이에 대하여는 아래에서 자세히 기술하였다.

다. 기생충학적 검사

1) 병리조직검사를 통한 기생충검사: 폐사체의 조직 내에서 기생하는 콕시듐, 조충 등 다양한 기생충들을 확인할 수 있었으며, 이 중에서도 아직까지 알려지지 있지 않은 미확인종들도 있어서 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2) 또한 일부 분변을 이용하여 기생충 충란 검사도 실시하였으며, 이들은 바로 위의 조직학적 결과와 비교분석하였다.

라. 세균검사

1) 세균분리 및 동정: 역학조사 시 채취한 가검물에서 세균분리를 성공적으로 수행하였으며, 또한 이의 동정도 성공적으로 수행하였다. 분리된 세균 중에서 특히 *Pasteurella multocida*균이 가장 빈번히 분리·동정되었으며, 염소 폐렴의 주요 원인체임을 확인할 수 있었다. 또한 항생제 감수성 검사를 통하여 각각의 분리·동정된 세균들에 대한 감수성이 높은 항생제를 파악할 수 있어서 향후 염소농가에서 발생하는 질병의 치료에 바로 응용할 수 있을 것으

로 사료된다.

2) 병리조직검사를 통한 세균성 질병 검사: 또한 이러한 세균성 질병들이 실제로 해당 장기에서 질병을 유발 하는지 자세한 병리조직검사를 통해서 그 의의를 파악하였다.

마. 바이러스성 질환검사

1) 병리조직검사를 통한 바이러스성 질환 검사: 본 사업을 통해 특히 *Retroviridae* 내의 lentivirus에 의한 바이러스성 간질성 폐렴과 retrovirus type B/D에 의한 바이러스성 pulmonary calcinomatosis에 의한 발생가능성을 확인할 수 있었으며, 향후 이에 대한 자세한 역학조사, 바이러스 분리·동정, 기병론 연구 및 백신개발에 대한 것을 수행하여야 할 필요성을 확인할 수 있었다.

3. 관련분야에의 기여도

본 연구가 수행되면 기술적 측면에서의 기대효과는 다음과 같이 요약된다.

가. 신속·정밀한 염소 보더병 진단법 개발을 통해 기존 기법의 단점인 검사재료 수의 한계성, 낮은 민감도 와 특이성 및 기타 복잡성, 장시간의 진단소요시간 등을 극복할 수 있게 되었다.

나. 국내 염소 농가에서 아직까지 밝혀져 있지 않았던 일본뇌염, 파라인플루엔자

3 바이러스 감염증, 코로나바이러스 감염증, 아까바네 바이러스 감염증, 쉼잔 바이러스 감염증, 아이노바이러스 감염증, 전염성 비기관염 바이러스 감염증에 대한 발생을 확인하여 향후 이러한 질병들에 대한 발생억제 및 예방대책을 강구하는데 기본적인 자료로 활용할 수 있게 되었다.

다. 본 연구를 통해서 전문 기술 인력을 양성할 수 있어서 향후 새로운 생물 산업군의 활성화에 기여할 것으로 생각된다.

라. 본 연구 과정 중에서 모든 기술의 국산화로 국내 기술의 향상에 기여할 수 있었다.

마. 본 연구를 통한 염소 보더병의 신속 정확한 진단법 및 예방기법을 확립함으로써 치료경비 및 인력낭비 의 절감, 폐사율 감소, 사료효율 향상, 성장촉진 및 염소 젖 및 고기 생산량 증가 등으로 전반적인 염소 사육 농가의 수익을 높일 수 있게 되었다.

바. 위생적이고 건강한 육류와 염소 젖 공급으로 식품의 안전성을 제고하여 소비를 획기적으로 늘릴 수 있게 되었다.

사. 염소에서 발생하고 있는 보더병양 질병이 bovine viral diarrhea virus type1과 2에 의해서 발생함을 규명하여, 국내 치료수단을 강구하는데 결정적인 기초 정보를 얻게 되었다.

아. 본 연구에서 개발한 신속·정확한 진단기법은 각 연구소나 시험소에 현지 보급화 시켜 조기 방역체계를 확립할 수 있었다.

자. 본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR 기법에 대한 노하우는 타 전염성 질

병의 현장 진단 기술에 응용할 수 있게 되었다.

차. 또한 본 연구에서 획득한 노하우는 타 질병에 대한 치료 개발 분야에 첨단기술의 파급으로 진단 및 치료약 개발의 활성화를 기대할 수 있게 되었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 본 연구를 통해서 국내 염소에서 발생하고 있는 혼들병은 진성 보더병인 border disease virus에 의한 것이 아니고, bovine viral diarrhea virus type 1과 type 2에 의한 것으로 규명되었다. 따라서 향후 이 바이러스에 대한 기병성 연구와 분리한 바이러스를 백신주로 개발하여 이에 대한 안전성 및 효능 검증을 통하여 상업화 시켜야 할 필요성이 제기되었다.

나. *Retroviridae* 내의 lentivirus에 의한 간질성 폐렴이 염소를 사육하고 있는 나라에서는 모두 발생되고 있다고 한다. 본 연구를 통해서 폐사한 염소에서 간질성 폐렴이 관찰되었기 때문에, 향후 이에 대한 자세한 역학조사, 원인체 분리·동정, 기병론 규명 등의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

다. *Retroviridae* 내의 type B/D retrovirus에 의한 pulmonary carcinomatosis가 염소를 사육하고 있는 나라에서는 모두 발생된다고 알려져 있다. 본 연구에서도 이와 유사한 pulmonary adenocarcinoma가 관찰되었기 때문에 이에 대한 자세한 역학조사, 원인체 분리·동정, 기병론 규명 등의 연구가 진행되어야 할 것이다.

라. 본 연구를 통하여 다양한 기생충이 염소에서 감염되고 있으며, 어떠한 것들

은 국내에서는 미확인종인 것으로 분석되었다. 따라서 이러한 염소의 기생충성 질병들에 대한 자세한 역학조사, 원인체 동정, 기병론 규명 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

마. 국내 염소농가에서는 아직까지 알려져 있지 않았던 소와 돼지 등의 질병 즉 소 코로나바이러스, 아까바네 바이러스, 추잔 바이러스, 아이노 바이러스, 전염성 비기관염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스에 대한 항체가가 염소의 혈청에서 검출되어, 향후 이들 질병들에 대한 자세한 역학조사, 원인체 분리·동정, 기병론 연구, 백신개발 등이 필요할 것으로 사료된다.

바. 본 연구에서 개발한 RT-PCR 및 real-time RT-PCR 기법은 세계 최첨단의 진단법으로, 이러한 기법을 국립수의과학검역원, 각 시도의 축산기술개발 연구소 및 기업의 진단기관에 전수하여 염소의 보더병 감별진단에 활용하도록 한다.

- 1) 각 기관에서 문제시 되는 인력 및 시간적 낭비를 최소화시키고 합리화시켜 다른 중요 가축질병의 예방, 방역 및 진단에 더욱 더 많은 효과를 가져 올 수 있도록 할 것임
- 2) 본 연구에서 개발한 기법을 진단 키트화 시켜 쉽고 간편하게 임상에서 적용하도록 하여 질병을 예방하고 방제하는 감시인원의 비능률적인 단면들을 개선하여 인건비의 감소와 더불어 더욱 적극적이고 체계적인 방역활동을 수립할 수 있도록 함
- 3) 궁극적으로 축산업의 국제 경쟁력이 조성 될 것임

사. 본 연구과제를 통해 개발된 진단 기법에 대한 노하우 활용

- 1) 동물의 전염성 질환에 대한 real-time RT-PCR 기법의 개발은 전 세계적으로 미미한 수준임
- 2) 따라서 본 연구를 통해 획득한 real-time RT-PCR 기법에 대한 노하우는 다른 동물질환의 진단법 개발에 바로 활용할 수 있음
- 3) 분자생물학적 연구의 유용한 자료로서 활용될 수 있으며 국내 진단업계의 수준을 향상시키는데 이바지할 수 있음

SUMMARY

I . Title

Epidemiological Survey on and Development of
Diagnostic Method for Border Disease of Goat

II. Purpose and Rationale of Research and Development

1. Purpose of Research and Development

The final goals of this study are epidemiological survey on and development of diagnostic method for border disease of goats. In order to establish the strategies of prevention, treatment and quarantine, serological surveys on putative main viral diseases occurred in goats are performed. In addition, the advanced diagnostic method we will develop is designed to diagnosis the border diseases as well as bovine viral diarrhea virus type 1 and 2, and classical swine fever virus, latter 3 viruses

causing border-like disease in the goats.

2. Rationale

Technical Aspect

Since the pattern of goat industry has been rapidly from small and poor farm sizes to large and enterprise sizes in Korea, unexpected diseases have been occurred, i.e. acute goat diseases did not cause huge economical problems in the past decade, but can lead ample economical problems now in the large and enterprise farms. Therefore, the establishment of diagnostic systems after disease survey should be performed in order to promise the increase of goat industry. The reproductive and neonatal diseases of goats are far important because they can cause huge economical disaster. Goat pestivirus containing border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1 and 2, and classical swine fever virus induce very similar symptoms as named border disease or border-like disease including abortion and still birth to dam, diarrhoea and nervous signs to their progeny. Pestivirus-inducing disease in the goat and sheep have been reported to occur worldwide. In Korea, border or border-like diseases have been suspected to be occur.

However, the precise epidemiological survey and development of diagnostic tools has not been carried out in Korea. Usually, an exterminatory measure can be established after grasping the status of the disease occurrences. Therefore, the epidemiological survey on and development of diagnostic method for border disease of goats should be done. Moreover, to establish the strategies of prevention, treatment and quarantine, serological surveys on putative main viral diseases occurred in goats must be performed. In addition, the advanced diagnostic method has to be designed to diagnosis the border diseases as well as bovine viral diarrhoea virus type 1 and 2, and classical swine fever virus, latter 3 viruses causing border-like disease in the goats.

Industrial aspect

The domestic livestock industry should develop competitive power because Korea has opened market in a full-scale. To develop competitive power, the productivity of livestock industry should be improved using the advanced scientific tools. An obstacle of livestock industry in Korea is "disease" because the diseases are attributable to decrease 20% losses in the total livestock output. Therefore, advanced methods should be applied to increase productivity of livestock industry.

The goat industry in Korea is more competitive power than that of other countries because large part of feed for goat is natural grasses in the field and do not depend on imported concentrated feed. The goats are well adapted to Korean environments and can be easily controlled due to their habit to make a herd. Therefore, the goat industry has been increased gradually from 90's. In addition, the scale of farm size has been gradually enlarged. When acute malignant diseases beat the large scale goat industry, huge economical losses are anticipated compared to the small scale industry. The border or border-like diseases caused by goat pestivirus are one of the disaster diseases of goat. It is suspected that border or border-like diseases have been occurred in Korea. Therefore, the epidemiological survey on and development of diagnostic method for border disease of goats should be done. Moreover, to establish the strategies of prevention, treatment and quarantine, serological surveys on putative main viral diseases occurred in goats must be performed. In addition, the advanced diagnostic method has to be designed to diagnosis the border diseases as well as bovine viral diarrhea virus type 1 and 2, and classical swine fever virus, latter 3 viruses causing border-like disease in the goats.

Social and public health aspect

Traditionally, Korean has treated a goat as a medicine and used for increasing the human health. The meat and milk of goat contain 10 times and 20 times more calcium than those of beef and pork, respectively. Moreover, goat meat has 4 times more phosphorus than that of beef and pork. Although goats are known for nutritionally very good, goats are not classified into general domestic animals in the law so that research on diseases has not been carried out in detail.

Since Korean have been considering their health very deeply, the safety- and efficacy-promising foods are essential in Korea. For example, the occurrences of highly pathogenic avian influenza and foot and mouth disease stunts Korean. After consequence, meat consumption is markedly decreased and then livestock industry fall down dramatically. The border disease of goat can spread into the other domestic animals including cattle and pigs. For this reason, the epidemiological study on the border disease is essential to promise the safety of goat meat and milk.

III. Results and Extents of Research and Development

A. Development of diagnostic method

1) Development of RT-PCR assay: During this study, we developed RT-PCR assay to diagnosis the border disease, bovine viral diarrhea type 1 and type 2, and classical swine fever. These four viruses which belong to the same genera, *Pestivirus*, caused very similar clinical symptoms. Therefore, the diagnostic assays are needed to differentiate these diseases. Using this assay developed, we can now differentiate these viruses-induced diseases.

2) Development of real-time RT-PCR assay: In this study, we developed the real-time RT-PCR assay to diagnosis the border disease, bovine viral diarrhea type 1 and type 2, and classical swine fever for the first time in the world. This assay provides its results timely and quantitatively. We will submit the data obtained in this study to the international journal in order to distribute the know-how to Korea as well as world.

B. Detection of Pestivirus-induced diseases (border disease, bovine viral diarrhea type 1 and type 2, and classical swine fever)

1) Seroprevalence study on the border disease virus by ELISA assay: Using ELISA kit (Svanova), 1142 sera sampled from 223 goat farms were screened for the detection of antibodies against border disease

virus. Border disease virus positive reaction was detected in 47 sera (4.12%) of 18 farms (8.07%).

2) Antibody titer detection against the pestivirus by virus neutralization test: Since border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1 and type 2, and classical swine fever virus, which belong to Pestivirus, have cross-antigenicity, it is not clear if the positive reaction against the border disease virus by ELISA detected only border disease virus antigens. Therefore, virus neutralization antibody tests against the border disease virus, bovine viral diarrhoea virus, and classical swine fever virus were carried out. The antibody titer against the bovine viral diarrhoea virus were 2 times and 4 times higher than that of border disease virus and classical swine fever virus, respectively. From this result, it is speculated that border-like disease occurred in Korea may be caused by bovine viral diarrhoea virus.

3) Detection of Pestivirus in the goats by RT-PCR assay: In order to determine the precise epidemiology of pestivirus-induced diseases in goats, retrospective study was conducted with the specimens sampled from 1998 to 2004. Within the period of this study, 53 sera and tissues sampled from 3 goats during 2004 and 1142 sera from 223

farms and spleen and kidney sampled from 102 goats obtained from 34 farms during 2005 were used for the detection of pestivirus. Moreover, we used the requested goat samples to NVRQS with chronic wasting syndrome and specimens from neonatal goats with pneumonia and diarrhea. Using the primer pair (PanF/R) which can amplify the border disease virus, bovine viral diarrhea virus and classical swine fever virus, RT-PCR assay was conducted with above mentioned samples. The expected bands was detected in the 7 samples.

4) Detection of Pestivirus in the goats by real-time RT-PCR assay: Using the samples as immediately above mentioned, real-time RT-PCR assay was carried out with the primer pairs specific to all pestiviruses, border disease virus, bovine viral diarrhea virus and classical swine fever virus, respectively. We detected 7 positive reactions as like RT-PCR assay as above mentioned.

C. Seroepidemiological studies of major goat viral diseases

1) For the first time in Korea, seroepidemiological studies were conducted against the infectious laryngotrachitis virus, parainfluenza virus 3, akabanevirus, ainovirus, Chuzanvirus, Japanese B encephalitis

virus and bovine coronavirus with the blood samples obtained from the goat farms. The rate of goats with positive antibodies was 9.33% against the infectious laryngotrachitis virus, 10.19% against the parainfluenza virus 3, 0.83% against the bovine coronavirus, 12.69% against the akabanevirus, 13.02% against the ainovirus and 8.98% against the Japanese B encephalitis virus.

2) From these results, these viruses are suspected to occur in high rate in Korea. These viruses are known to cause enormous economic losses in cattle industry in Korea. Therefore, goats may play key role to interspecies transmitter and especially goats may be reservoir of Japanese B encephalitis virus to humans.

D. Molecular characterization of pestivirus detected in the goats

1) By RT-PCR assay with PanF/R primer pair which can amplify all pestiviruses, seven positive reactions were detected. We conducted elusion from these amplified amplicons and sequenced. Phylogenetic analysis showed that the sequences were clustered with bovine viral diarrhea virus type 1 and 2, respectively. From this result, we concluded that border-like diseases occurred in the goats in Korea are caused by either bovine viral diarrhea virus type 1 or type 2.

E. Nationwide sampling

- 1) Blood samples: In order to ensure the statistical data from this epidemiological study, 1142 blood specimens were sampled from 223 goat farms. A large number of goat blood samples make a possibility to seroprevalence of the other viral diseases.
- 2) Tissues or organ sampling: A total of 23 dead or moribund goats were collected from goat farms.
- 3) Fecal samples: Almost 100 fecal samples were sampled from goat farms.

F. Pathological study

- 1) Necropsy: A total of 23 goats were grossly observed in detail and their gross findings were recorded. After then, variable tissues and organs were sampled and used for molecular biological, pathological, parasitologies and bacteriological studies.
- 2) Histopathological study: The tissue samples were fixed in 10% neutral formalin, sectioned in 3 um and stained by H&E stain, Gram stain, etc. and then histopathologically observed under microscope. By histopathological observation, variable goat diseases including

amyloidosis, parasite infection, bacterial infection, virus infection, etc, were identified in this study.

G. Parasitologies observation

- 1) Identification of parasites by histopathology: Parasites including coccidium, tape worm, etc were histopathologically identified in this study. Because there were unidentified parasites found in this study, the future studies on these parasites will be needed to perform.
- 2) Fecal samples were examined by floating and precipitation methods to identify the parasite eggs. Variable kinds of parasites eggs including *Eimeria* spp. *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, etc were identified and its correlation to the histopathological changes were compared in this study.

H. Bacteriological examination

- 1) Isolation and identification of bacteria: Using the specimens sampled at the epidemiological study, many kinds of bacteria were isolated and identified. Among these bacteria isolated, *Pasteurella multocida* were frequently isolated and had a good correlation with pathological lesions of lungs. The data of antibiotic screening tests studied can be

applied in the farms having diseases caused by the same pathogens.

2) Identification of bacteria-induced lesions by histopathology: In order to identify if the bacteria isolated caused the histopathological changes, the tissues sampled were observed by histopathology. It is demonstrated that some of bacteria isolated seems to cause histopathological changes.

I. Viral diseases examination

1) Viral diseases examination by histopathology: In this study, viral interstitial pneumonia caused by lentivirus within *Retroviridae* and pulmonary carcinomatosis caused by retrovirus type B/D were strongly suspected. Therefore, the further studies on these viral diseases should be performed in Korea.

IV. Suggestions for the Application of Research

Results

A. From our results, we demonstrated that border-like diseases occurred in the goats in Korea are caused by either bovine viral diarrhea virus type 1 or type 2. Therefore, it is needed to conduct the pathogenesis study and vaccine development for understanding and preventing the

bovine viral diarrhea virus type 1 and 2 in the goats.

- B. In this study, viral interstitial pneumonia caused by lentivirus within *Retroviridae* and pulmonary carcinomatosis caused by retrovirus type B/D were strongly suspected. Therefore, the further epidemiological, pathological, virological studies of these viral diseases should be performed in Korea.
- C. We detected variable kinds of parasites in the goats. Some of these parasites are unidentified. Because there were unidentified parasites found in this study, the future studies on these parasites will be needed to perform.
- D. The data obtained by seroepidemiological studies against the infectious laryngotrachitis virus, parainfluenza virus 3, akabanevirus, ainovirus, Chuzanvirus, Japanese B encephalitis virus and bovine coronavirus with the blood samples obtained from the goat farms suggested that the further studies should be carried out about the isolation of each virus, pathogenesis and vaccine development.
- E. We developed the advanced RT-PCR and real-time RT-PCR. These assays are highly sensitive and specific to diagnosis the border and border-like diseases. Therefore, we will transfer the protocols to NVRQS and local diagnostic labs.

F. As above mentioned, we developed real-time RT-PCR for the first time in the world. This techniques for the detection of border and border-like diseases are applicable to the other viral diseases. Therefore, we will publish these techniques in the international journal to transfer these techniques to Korean as well as the other countries.

CONTENTS

Chapter I Purpose and Rationale of Research and Development	38
Section 1. Purpose and contents of Research and Development	38
Section 2. Ratiouale of Research and Development	38
1. Technical Aspect	38
2. Industrial Aspect	39
3. Social and Public Health Aspects	42
Chapter II Status of the Technology in Domestic and Foreign Countries	44
Section 1 Status of the Technology in Korea	44
Section 2 Status of the Technology in Foreign Countries	44
Chapter III Contents and Results of the Research and Development	46
Section 1 Contents of the Research and Development	46
The first research teem	46
1. Nationwide sampling	46
2. Pathological study	46
3. Parasitologies observation	47
4. Bacteriological examination	47
5. Viral diseases examination	47
The second research teem	48
1. Development of RT-PCR method	48
2. Development of real-time RT-PCR	48

3. Detection of Pestivirus-induced diseases -----	49
4. Seroepidemiological studies of major goat viral diseases -----	50
5. Isolation of border disease virus -----	51
6. Molecular characterization of pestivirus detected in the goats -----	51
Section 2 Results of the Research and Development -----	52
<u>1. Seroepidemiology of border disease as well as major goat viral diseases</u> -----	52
1. Seroepidemiology of border disease virus -----	52
2. Seroepidemiology of bovine infectious laryngotrachitis virus -----	58
3. Seroepidemiology of parainfluenza 3 virus -----	59
4. Seroepidemiology of bovine coronavirus -----	60
5. Seroepidemiology of Akabane, Aino and Chuzan viruses -----	61
6. Seroepidemiology of Japanese B encephalitis virus -----	63
<u>2. Pathological, bacteriological and parasitological observations</u> -----	66
<u>3. Isolation of border disease virus</u> -----	96
1. Selection of cell lines using the proliferation capability test of border disease virus -----	96
2. Isolation of border disease virus -----	97
<u>4. Development of advanced diagnostic methods for the differential diagnosis of border and border-like diseases</u> -----	99
<u>5. Apply of advanced diagnostic methods to detect border disease virus</u> -----	112
1. Detection of border disease virus using RT-PCR and real-time RR-PCR-----	112
<u>6. Molecular characterization of pestiviruses occurred in the goats in Korea</u> -----	114

1. Molecular characterization of pestivirus by retrospective study -----	114
2. Molecular characterization of pestiviruses circulated in Korea during 2004-2005 -----	122
Chapter IV Achievement and Contribution of the Research and Development -----	134
Section 1 Achievement of the first research team -----	135
Section 2 Achievement of the second research team -----	138
Section 3 Contribution -----	141
Chapter V Plan to Apply the Results and Development -----	144
Section 1 Suggestions for the application of research results -----	144
Chapter VI Information Acquired during Research and Development from Foreign Countries -----	146
Chapter VII References -----	149

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	38
제 1 절	연구개발 목표와 내용	38
제 2 절	연구개발의 필요성	38
1.	기술적 측면	38
2.	경제·산업적 측면	39
3.	사회·문화적 측면	42
제 2 장	국내외 기술개발 현황	44
제 1 절	국내 기술개발 현황	44
제 2 절	국외 기술개발 현황	44
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	46
제 1 절	연구개발 수행내용	46
	<u>제1세부과제</u>	46
가.	전국적인 규모의 재료 채취	46
나.	병리학적 연구	46
다.	기생충학적 검사	47
라.	세균검사	47
마.	바이러스성 질환검사	47
	<u>제2세부과제</u>	48
가.	진단법 개발	48
나.	Real-time RT-PCR 기법개발	48
다.	야외 증례에서 Pestivirus 검출	49

라. 염소에서 주요 바이러스성 질환에 대한 항체가 검출 -----	50
마. 보더병 바이러스 분리 -----	51
바. 보더병 유관 바이러스의 분자특성 규명 -----	51
제 2 절 연구개발 수행결과 -----	52
1. <u>염소혈청에서 보더병을 비롯한 그 외 7종 바이러스에 대한 혈청역학검사</u> -	52
가. 국내에서 사육중인 염소에서 보더병 바이러스 항체가 검사 -----	52
나. 국내에서 사육중인 염소에서 전염성 후두기관염바이러스에 대한 혈청학적 조사 -----	58
다. 국내에서 사육중인 염소에서 파라인플루엔자 3형 바이러스에 대한 혈청학적 조사 -----	59
라. 국내에서 사육중인 염소에서 소 코로나바이러스에 대한 혈청학적 조사 -----	60
마. 국내에서 사육중인 염소에서 아까바네, 아이노, 추잔 바이러스에 대한 혈청학적 조사 -----	61
바. 국내에서 사육중인 염소에서 일본뇌염 바이러스에 대한 혈청학적 조사 -----	63
2. <u>염소 폐사체를 이용한 병리학적, 세균학적, 기생충학적 검사</u> -----	66
3. <u>염소 가검물에서 보더병 바이러스 분리</u> -----	96
가. 보더병 바이러스 표준주의 세포증식능 확인을 통한 표준주 및 세포주 선발-----	96
나. 보더병 바이러스의 분리 -----	97
4. <u>염소 Pestivirus 내의 보더병 및 보더병양 질병의 감별진단을 위한 신속·정 확한 최첨단의 진단법 개발</u> -----	99
가. One step RT-PCR, Nested PCR 및 Real-Time RT-PCR 기법개발 --	99
5. <u>신속·정확한 최첨단 진단법을 이용한 국내 염소 농가에서 보더병양 질병의</u>	

<u>검출</u> -----	112
가. RT-PCR 및 Real Time RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus의 검출 --	112
6. 국내 염소 농가에서 발생하고 있는 Pestivirus의 분자역학 규명 -----	114
가. 본 사업년도 전에 염소 농가에서 발생한 보더병 바이러스의 분자역학 규명 -----	114
나. 2004-2006년도에 국내 염소 농가에서 발생한 보더병 바이러스의 분자역학 규명 -----	122
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	134
제 1 절 제1세부과제 연구목표 달성도 -----	135
제 2 절 제1협동과제 연구목표 달성도 -----	138
제 3 절 관련분야에의 기여도 -----	141
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	144
제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용 -----	144
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	146
제 7 장 참고문헌 -----	149

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목표와 내용

1. 본 연구의 목표는 국내 염소에서 보더병에 대한 발생 역학조사 및 진단법을 개발하는 것이다.
2. 또한 보더병 이외에도 국내에서 발생하고 있을 것으로 예상되는 중요 질병들에 대한 혈청학적 검사를 통해 국내에서 사육 중인 염소질환에 대한 질병 모니터링을 하여 향후 이에 대한 예방, 치료, 방역 대책에 대한 기본 자료로 활용함에 있다.
3. 특히 진단법 개발에 있어서는 염소에 흔들병을 일으킬 수 있는 보더병 외에도 보더병과 근연관계에 있는 *Flaviviridae* 내 *Pestivirus* 내의 bovine viral diarrhea virus type 1과 2 및 classical swine fever virus에 대한 신속·정확한 최첨단의 감별진단법을 개발함에 있다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면
 - 90년도 후반부터 국내 염소 산업은 소규모 영세 사육형태에서 대규모 사육형태로 빠르게 변화하고 있다.
 - 따라서 사육규모의 변화에 따른 지금까지 예상하지 못했던 질병의 발병형태가 문제시되고 있다.
 - 즉, 기존의 사육규모 형태에서는 급성의 질병이 발생하여도 문제시되지 않았지만, 사육의 대규모화에 따라 급성의 질병이 발생하면 강한 전파에 의해서 대규모로 질병이 발생할 가능성이 크기 때문이다.
 - 따라서 염소 사육의 대단위화·전업화 경향에 따른 질병의 발생 상황의 변화 등을 포함한 역학조사와 진단체계의 확립을 통한 저비용 고효율의 생산 개발체계가 시급한 실정이다.

- 특히 번식기 질환은 주로 유산이나 사산을 위주로 나타나는 선천성 저마이엘린증 혹은 흔들병이라고도 불리우는 Flaviviridae Pestivirus 내의 border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1과 2 및 classical swine fever virus에 의한 보더병 및 보더병 유사 질병 등이 알려져 있다.
- 이 외에도 보더병과 유사한 질병들을 일으킬 수 있는 것들은 몇몇 세균성 및 기생충성 질병 등이 알려져 있다.
- 다양한 원인에 의해서 발생하고 있는 염소의 흔들병이지만, 실은 Flaviviridae 내의 border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1과 2 및 classical swine fever virus에 의한 흔들병이 주요 원인이다.
- 염소의 흔들병은 염소를 사양하고 있는 세계 여러 나라에서 발생보고가 있다.
- 국내에서도 새끼 염소들에서 흔들병이라고 알려진 질병이 발생하고 있으나 이에 대한 체계적인 연구가 진행되지 않고 있다.
- 보더병에 대한 염소군내 국내의 혈청학적 검사나 바이러스 분리는 이루어진 바 없다.
- 다만, 보더병에 대한 역학적 발생 정보는 국립수의과학 검역원에서 돼지에서 최근 혈청학적 검사를 시도한 바 있으나 그 감염률은 매우 낮았다.
- 그러나 매년 번식계절과 맞물려 유산태풍과 같은 피해가 염소 목장 내에서 발생되고 있으며 생후 3주이내의 보더병양 질병의 폐사율은 거의 70-80%에 가깝다.
- 따라서 일반적으로 질병에 대한 올바른 방역 대책을 마련하기 위한 그 첫 단계는 해당 질병의 정확한 발생 역학적 정보의 확보가 반드시 파악되어야 한다.
- 또한 신속·정확한 진단을 통한 질병의 조기 근절을 위해서는 민감도와 정확성이 확보된 신속·정밀 진단법의 개발이 필요하다.

2. 경제·산업적 측면

- 국내 축산업은 최근의 전면적인 시장 개방으로 외국의 축산물에 대한 경쟁력

강화가 무엇보다 시급한 실정이다.

- 이를 위해서는 첨단과학기술을 이용한 축산물의 생산성 향상에 주력하여야 한다.
- **우리 축산업의 야외 상황을 고려할 때 가장 큰 걸림들은 바로 질병 문제이다.**
- 연간 축산 총생산액 (53,112억, 97년) 가운데 질병으로 인해 최소한 약 20%인 10,622억원의 경제적 손실을 낳고 있기에 질병문제에 보다 적극적이고 과학적인 기술 확보는 우리 축산업 기반강화에 반드시 필요한 과제가 아닐 수 없다.
- 국민 총생산 중 농림어업이 차지하는 비중은 점차 감소하고 있는데 비해 농림수산 중 축산업이 차지하는 비중은 약 150%나 증가 (7.8%, '80→11.7%, '95)하고 있고, 호당 농업조수입 중 축산부분 수입은 약 3배가량 증가 (12.1%, '80→34.9%, '98)하여 우리 축산업이 농가 전체에 미치는 경제적 영향이 해마다 증가하고 있는 상황이다.
- 이와 같이 대체 동물로 부각되고 있는 것이 염소이다.
- 염소가 외국산에 비해서 경쟁력이 있는 것은 사료를 전량 수입산인 농후사료에 의존하지 않고 국내 부존자원인 산지를 충분히 활용할 수 있어서 사료비를 절감할 수 있기 때문이다.
- 또한 우리나라의 기후와 풍토에 강한 적응력을 가지고 있고, 일반적으로 여러 마리가 무리를 지어 생활하는 습성 때문에 관리하는데 용이할 뿐만 아니라 축산폐수로 인한 규제가 불필요하여 가장 친 환경적인 축종이라고 할 수 있다.
- 최근의 조사에 의하면 국내에서 사육되고 있는 염소의 종류는 재래염소, 젓염소 등이며, 농가에서 사육하고 있는 염소들은 염소가 대부분으로 수적으로는 교잡염소 (염소)가 가장 많고, 다음으로 재래염소 (염소)순 이다.
- 염소의 사육현황을 보면, 사육농가의 경우 90년대 초반부터 꾸준히 증가하다가 IMF를 맞아 조금 감소하였지만, 최근에는 다시 활발히 증가하고 있다고 한다.

- 뿐만 아니라 300두 이상 사육하는 농가 수 역시 90년도에는 8호에 불과했던 것이 96년도에는 114호까지 급격히 증가했다가 IMF를 맞아 99년에는 80호로 감소하다가 2000년도 이후에는 꾸준히 증가하고 있는 추세이다 (Table 1).
- 사육규모면에서도 소규모 사육농가는 점점 줄어든 반면 전업적으로 다두 사육하는 농가가 증가하여 1000두 이상 사육하는 기업형 농장도 더욱 늘고 있다.

Table 1. Number of goats and farms in each year

Year	Size	>10	10 ~ 49 goats	50 ~ 99 goats	100 ~ 299 goats	<300 goats	Total
'90	No. of farm	45,720	3,058	363	132	8	49,281
	No. of goats	100,709	56,684	18,645	19,218	3,584	211,292
'92	No. of farm	66,172	9,296	1,009	332	33	76,842
	No. of goats	202,174	176,178	63,052	46,016	13,783	501,203
'95	No. of farm	70,317	9,690	1,703	937	72	82,719
	No. of goats	212,316	189,013	109,109	141,535	28,788	680,761
'98	No. of farm	50,008	7,548	1,331	789	99	59,75
	No. of goats	146,500	150,714	84,783	115,361	41,181	538,539
'99	No. of farm	45,677	6,628	1,156	630	80	54,171
	No. of goats	136,195	132,164	73,048	91,466	35,000	467,873

(기타가축통계. 농림부. 2003)

Table 2. Number of goats reared in each province (Unit; 1000)

Year	Gyeongnam	Jeonnam	Chungnam	Jeonbuk	Kyeongbuk
'92	102.3	92.9	69.5	65.6	61.7
'95	124.2	105.4	108.9	85.7	85.4
'97	94.6	93.7	90.9	80.2	94.6
'99	82.9	96.2	71.0	57.8	61.2
'00	75.4	92.0	56.1	48.6	55.5
'01	78.0	97.8	50.2	48.5	55.6

(농림통계)

- 국내 염소의 도별 사육 분포 (Table 2)를 보면 대전이남지역에서 70%이상의

사육편중 현상을 보이고 있었으나 최근 경기와 충청도에서 그 사육증가율이 서울 등 대도시의 소비증가에 따라 다른 시도에 비해 더 높은 현상을 보이고 있고, 이에 따라 염소의 산업화는 가일층 가속화 되고 있다고 할 수 있다.

- 이와 같은 소규모 영세 사육형태에서 대규모 사육형태로의 변화에 따라 전파성이 강한 질병이 한번 발생하면 농장 전체에 걸쳐 사육기반이 흔들릴 정도로 막대한 경제적 피해를 초래할 수 있다.
- 따라서 염소 목장에서 발생중인 질병의 역학적인 조사가 과학적이고 정밀하게 수행되어야 한다.
- 이러한 역학조사 결과를 근간으로 하여서 국내에서 다발하고 있는 보더병양 질환뿐만 아니라 염소의 주요 질병에 대한 예방, 치료, 방제 대책을 강구할 수 있으며, 또한 이에 대한 신속·정확한 진단법을 개발하게 될 것이다.

3. 사회·문화적 측면

- 예로부터 염소는 보약용으로 알려진 특수동물로 인식되어 약용으로 소비되고 있다.
- 특히 고기 및 젖에 함유되어 있는 칼슘의 함량은 쇠고기의 10배, 돼지고기의 20배이며, 인은 돼지고기와 쇠고기의 4배, 단백질은 개고기보다 3배를 함유하여 쇠고기와 돼지고기와 비슷한 수준을 함유하고 있어 보약과 영양식으로 사용할 수 있는 장점을 가지고 있다 (식품보감).
- 그러나 재래염소는 소와 사육역사가 비슷한 가축이면서도 일반 축산물 대상에 포함되지 않음에 따라 연구가 미진한 실정이다.
- 우리나라 국민의 급격한 보건인식 향상에 의해 안전성이 확보된 위생적인 식품에 대한 욕구가 더욱 증가하고 있다.
- 최근 국내에서 발생한 조류 인플루엔자나 구제역 파동 등은 좋은 예라 할 수 있다.
- 염소에서 발생하고 있는 이 보더병양 질환은 소와 돼지 등 다른 가축으로 전염될 수 있다는 가능성을 지닌 병원체로 알려져 있다.
- 따라서 이러한 중간 전염성 질환뿐만 아니라 염소에 치명적인 질환을 일으키

는 보더양 병원체에 대한 발생역학 정보는 염소육의 안전성 확보뿐만 아니라 양유에 대한 위생수준의 확보를 위해 꼭 필요한 자료가 될 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

- 국내 염소의 보더병 질병발생 역학 조사를 비롯하여 신속·정확한 진단법개발은 전혀 수행되지 않았다.
- 따라서 본 사업을 통해 국내 염소의 보더병 질병발생 역학조사 및 진단법개발 등의 체계적이고 지속적인 연구가 이루어져야 하는 이유는 현재 야외에서 염소의 질환들 중 가장 폭발적인 폐사와 유사산의 피해를 지속적으로 주고 있어서 그 피해가 매우 크기 때문이다.
- 또한 특별한 근절대책이 없는 한 농장에서 이웃 농장으로 전파하여 피해가 거의 영구적으로 일어나 결과적으로 막대한 경제적 손실을 유발할 수 있기 때문이다.
- 따라서 국내 염소군내 보더병의 발생역학조사를 통해서 사육형태의 변화에 따른 질병의 변화상을 정확히 파악할 수 있어서, 앞으로 발생 시 대비책을 마련할 수 있을 것이다.
- 더불어 보더병의 신속·정확한 진단법을 개발함으로써 질병의 초기에 진단하여 질병 초기에 적절한 대책을 수행하여 더 이상 질병의 확산을 방지할 수 있을 것이다.
- 또한, 비위생적인 식육의 제공에 기인한 국민 보건 상에도 악영향을 미칠 수 있는 것을 사전에 차단하여 안정적이고 위생적으로 식육을 제공할 수 있을 것이다.

제 2 절 국외 기술개발 현황

- 세계적으로 흔들병을 일으킬 수 있는 *Flaviviridae* 내의 border disease virus, bovine viral disease virus type 1 및 2, classical swine fever virus에 대한 연구는 상당히 진행 중에 있다.
- 이러한 *Pestivirus* 내에는 상술한 4가지 바이러스가 있는데, 1) border

disease virus는 실제로 보더병의 실제 원인체로서 주로 염소에서 발생하고 돼지에서 산발적으로 발생한다고 보고되어 있으며 (De Mia et al., 2005), 2) classical swine fever virus는 국내에서도 돼지 콜레라로 잘 알려진 돼지의 악성 전염병 원인체이며, 3) bovine viral disease virus type 1 및 2는 주로 소에서 발생하며, 염소와 돼지에서도 종종 질병을 유발한다고 보고되어 있다 (De Mia et al., 2005).

- 염소 보더병의 원인론적 측면에서 혼동할 수 있는 것은, 상술한 4가지 바이러스들이 모두 보더병 혹은 보더병과 유사한 양상인 “염소의 흔들병”을 일으킬 수 있다는 것이다.
- 따라서 세계적으로도 염소의 보더병을 검사하기 위해서는 상술한 4가지 질병에 대한 원인론적 접근을 시도하고 있다 (Hurtado et al., 2004).
- 염소의 보더병에 대한 진단법으로는 ELISA법이 상용화 되어 있으며, RT-PCR 기법이 세계적으로 사용되고 있지만, 상술한 4가지 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 진단법과 실시간적으로 진단할 수 있는 real-time PCR 기법은 개발되어 있지 않는 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용

1. 제1세부과제

가. 전국적인 규모의 재료 채취

- 혈액채취: 염소의 보더병의 국내 발생역학조사에서 특히 통계학적으로 신뢰성을 얻기 위해서 전국적으로 혈액을 채취하여, 보더병 및 기타 질환까지 모두 검색할 수 있도록 하며, 바이러스 검출, 분리 등에 사용한다.
- 장기 및 조직채취: 혈액 채취를 하기 위하여 방문한 농가에서 질병에 이환되어 폐사직전 혹은 폐사된 염소를 확보하여 하기 연구를 위해서 사용한다.
- 분변채취: 분변 내에서 보더병 바이러스의 검출 및 기타 염소의 소화기계 질환에 대한 검사를 위해서 혈액채취를 하기 위하여 방문한 농가에서 분변을 채취한다.

나. 병리학적 연구

- 병리해부검사: 염소의 보더병 발생이 의심되는 혹은 기존에 유사한 임상증상을 보였던 농가를 방문하여 상술한 채혈과 분변 채취와 동시에 폐사 혹은 폐사 직전의 염소를 대상으로 자세한 부검을 실시한다. 부검 시 특이한 육안소견을 기록하고, 각각의 장기 및 조직을 바이러스 분리용, 바이러스 검출용, 병리조직학적 검사에 필요한 것들을 채취하여 각각의 목적에 맞도

록 보관한다. 병리조직검사용 장기 및 조직은 10% 중성 포르말린에 보관하여 병리조직학적 검사용으로 사용한다.

- 병리조직검사: 10% 중성 포르말린에 고정된 조직을 상법에 준하여 탈수 및 파라핀 포매 후에, 세절한 후, H&E stain 및 각각의 특수염색 기법을 이용하여 염색한다. 염색 후 광학현미경으로 자세한 조직학적 변화를 검사한다.

다. 기생충학적 검사

- 분변검사: 야의 염소농가에서 채취한 분변을 대상으로 부유법이나 침전법을 이용하여 분변에서 기생충의 충란 검사를 실시한다. 특히 폐사체를 부검하였을 경우에는 소장이나 대장에서 직접도말법을 이용하여 기생충 충란사를 실시한다.
- 병리조직검사를 통한 기생충검사: 기생충란이 검출되거나 되지 않았던 증례들을 대상으로 자세한 병리조직검사를 수행하여 각 장기 및 부위별 기생충 감염 여부를 확인한다.

라. 세균검사

- 세균분리 및 동정: 상법에 준하여 세균분리 및 동정을 실시한다.
- 병리조직검사를 통한 세균성 질병 검사: 세균성으로 의심되는 증례를 병리조직검사를 자세히 수행하여, 분리된 세균과 병변과의 관련성을 규명한다.

마. 바이러스성 질환검사

- 병리해부검사를 통한 바이러스성 질환 검사: 바이러스성 질환으로 의심되

는 증례에 대하여 부검 시 자세한 해부검사를 실시한다.

- 병리조직검사를 통한 바이러스성 질환 검사: 바이러스성의 의심되는 증례를 병리조직검사를 자세히 수행하여, 병변과의 관련성을 확인한다.

2. 제1협동과제

가. 진단법개발

- RT-PCR 기법개발: Pestivirus 내에 속해 있는 border disease virus, bovine viral diarrhoea virus type 1 및 2, classical swine fever virus 는 양이나 염소에 일명 흔들병이라 할 수 있는 보더병 혹은 보더병양 질병을 유발할 수 있다. 따라서 국내에서 발생하고 있는 흔들병의 원인들을 검출하기 위해서는 단지 border disease virus에 대한 primer pair를 제작하게 되면 감별진단 등을 할 수 없게 된다. 따라서 본 연구진은 pestivirus 내의 4가지 바이러스를 모두 검출할 수 있는 primer pair를 제작한다. 또한 각각의 바이러스들에 대하여 특이적인 primer pair를 제작하도록 한다. 각각의 primer pair를 이용한 RT-PCR의 민감도와 특이도를 검사하기 위해서 상술한 각각의 바이러스와 rabies virus를 계대 희석하여 RT-PCR을 수행한다. 이렇게 개발된 RT-PCR 기법은 야외 시료를 대상으로 pestivirus 내의 4가지 바이러스 검출을 위해서 사용한다.
- Real-time RT-PCR 기법개발: Real-Time RT-PCR은 비교적 시험 비용이 저렴한 SYBR Green method를 이용하여 pestivirus 전체 및 border

virus에 대한 screening test에 활용하고, Probe hybridization method를 이용하여 수립한다. 또한 상술한 RT-PCR용 primer pair 즉, pestivirus 내의 bovine viral diarrhea virus type 1과 2, classical swine fever virus에 특이적인 primer pair를 이용하여 그 효능을 검증하고, 야외 시료를 대상으로 실험을 실시한다.

나. 야외 증례에서 Pestivirus 검출

- ELISA 기법을 이용한 Pestivirus 항체가 검출: 전국적인 규모로 채취한 혈액 가검물에서 보더병 바이러스에 대한 항체를 검사하기 위해서 Svanova사의 보더병 항체가 스크린 ELISA kit를 이용하여 검사를 수행한다.
- 중화항체기법을 이용한 Pestivirus 항체가 검출: Border disease virus는 같은 pestivirus 내의 bovine viral diarrhea virus type 1과 2, classical swine disease virus와 항원 교차반응을 하기 때문에, 각각의 바이러스들을 야외 혈청 시료와 혼합한 후, 각각의 바이러스를 증식시킬 수 있는 monolayered cell에 접종한 후, 중화항체를 검사하여, 과연 ELISA kit에서 검출된 것이 어떤 바이러스인지 검사한다.
- RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus 검출: 본 연구진에 의하여 개발된 RT-PCR 기법을 전국적인 단위로 채취한 혈액, 분변, 조직 및 장기를 대상으로 RT-PCR을 수행하여, pestivirus 내의 border disease virus, bovine viral diarrhea virus type 1 및 2, classical swine fever virus

의 검출을 시도한다.

- Real-time RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus 검출: 본 연구진에 의하여 개발된 real-time RT-PCR 기법을 전국적인 단위로 채취한 혈액, 분변, 조직 및 장기를 대상으로 RT-PCR을 수행하여, pestivirus 내의 border disease virus, bovine viral diarrhea virus type 1 및 2, classical swine fever virus의 검출을 시도한다.

다. 염소에서 주요 바이러스성 질환에 대한 항체가 검출

- 일본뇌염 바이러스에 대한 항체가 검출: 국내 염소에서 일본뇌염 바이러스에 대한 항체 양성률을 파악하기 위하여, 전국적인 단위로 채취한 혈액 시료를 대상으로 혈구응집억제반응 기법을 사용하여, 항체를 검사한다. 일본뇌염바이러스에 대한 항체를 검사하기 위한 혈구응집억제반응용 항원은 Nakayama strain을 사용한다.
- 전염성 비기관염 바이러스에 대한 항체가 검출: MDBK cell과 전염성 비기관염 바이러스 표준주를 이용하여 혈청중화시험을 통해 국내 염소에서 채취한 혈청에서 전염성 비기관염 바이러스에 대한 항체가 검출을 시도한다.
- PI3에 대한 항체가 검출: MDBK cell과 파라인플루엔자3 바이러스 표준주를 이용하여 혈청중화시험을 통해 국내 염소에서 채취한 혈청에서 파라인플루엔자3 바이러스에 대한 항체가 검출을 시도한다.
- 소 코로나바이러스에 대한 항체가 검출: 전국적으로 채취한 염소의 혈청

중에서 소 코로나바이러스에 대한 항체 양성률을 검사하기 위해서, 마우스 혈구와 소 코로나바이러스 표준주를 이용하여 혈구응집억제 시험을 수행한다.

- 아까바네, 추찬병, 아이노바이러스에 대한 항체가 검출: 전국적으로 채취한 염소의 혈청 중에서 아까바네 바이러스, 추찬병 바이러스, 아이노바이러스에 대한 항체 양성률을 검사하기 위해서, Vero cell과 각각의 바이러스를 이용하여 혈청중화시험을 수행한다.

라. 보더병 바이러스 분리:

- 보더병 바이러스의 분리를 위해 Merial사의 IRO4 세포, BGFL (black goat fetal lung) cell과 MDBK cell을 사용한다.
- 또한 과연 어떠한 세포주가 border disease virus 분리를 위해서 효율성이 높은지 확인하기 위해서 보더병 바이러스 Aveyron strain을 상술한 세포중에 실험집중하여 확인한다.
- 상술한 세포 중에서 효율이 높은 세포주를 선택하여 야외에서 채취한 시료를 대상으로 바이러스의 분리를 시도한다.

마. 보더병 유관 바이러스의 분자특성 규명

- 국내에서 발생한 보더병 혹은 보더병양 소견을 보이는 염소에서 채취한 혈액, 분변, 조직 및 장기들을 이용하여 본 연구진에 의해서 개발된 RT-PCR을 수행하고 그 증폭산물을 염기서열 분석한다.
- 이때 Vector NTI suite 8 program (Invitrogen)을 이용하여 원하는 비교

유전자 염기서열을 GenBank에서 확보한다.

- GenBank에서 확보된 유전자 염기서열은 Bioedit software (Hall, 1999)를 이용하여 trimming과 alignment를 시킨다.
- Aligned sequences는 Clustal X package (Higgins and Sharp, 1988)의 neighbor-joining method (Asitou and Nei, 1987)를 이용하여 분석한다.
- Bootstrap probabilities는 1000회가 되도록 계산하고, Phylogenetic tree 및 sequence pair distances는 DNASTAR program (Lager gene)을 이용하여 작성한다.

제 2 절 연구개발수행 결과

1. 염소 혈청에서 보더병을 비롯한 그 외 7종 바이러스에 대한 혈청역가 검사

가. 국내에서 사육중인 염소에서 보더병 바이러스 항체가 검사

- ▣ 국내 염소에서 보더병에 대한 감염실태를 파악하기 위하여 Garner 등이 보고한 통계적 접근방법을 사용하였다.
- ▣ 국내 염소를 사육하고 있는 총 54,171농가에 99%의 검사 민감도와 90%의 특이도를 가정하고, 감염된 농가 내 이병률을 35%와 95%의 신뢰도 수준으로 전국 염소사육 농가의 1%가 감염을 가정하여 농가당 4두를 채혈하였다.

- 그 결과 총 검사 농가 수는 338농가, 1,355두의 염소로 설정하였다.
- 이를 바탕으로 전국 223개 농가 1,142두의 혈청시료를 수집하였다.
- 수집된 혈청을 Svanova사의 보더병 항체가 스크린 ELISA kit와 보더병 바이러스와 BGFL 세포를 이용한 혈청 중화시험을 실시하였다.
- 실험 결과 18개 농가 (8.07%), 47두 (4.12%)에서 양성반응을 보였다.
- 223개 염소농장을 대상으로 보더병에 대한 농가별 항체가는 경남이 18%를 차지하여 가장 높은 양성률을 나타내었으며, 개체별은 충남지역이 14%로 가장 높게 나타났다.
- 보더병 양성농가 중에서 지역별 분포를 살펴보았을 때 전남 31.9% (15/47), 전북 27.6% (13/47), 경남 23.4% (11/47) 충남 8.51% (4/47)을 나타낸 반면 경기, 충북, 경북은 4%이하의 양성률을 나타내었고, 강원과 제주도에서는 양성반응을 확인 할 수 없었다 (Table 1 and Fig. 1 and 2).
- 양성으로 스크린 된 28두의 혈청을 대상으로 Pestivirus 별 교차반응을 확인하기 위하여 BVDV, BDV, CSFV에 대해 각각 혈청중화시험을 실시한 결과, BVDV에 대한 항체가가 BDV보다 평균 약 2배 정도 높게 나타났으며, CSFV보다 4배 이상의 수준을 나타내었다 (Table 2 and Fig. 3).

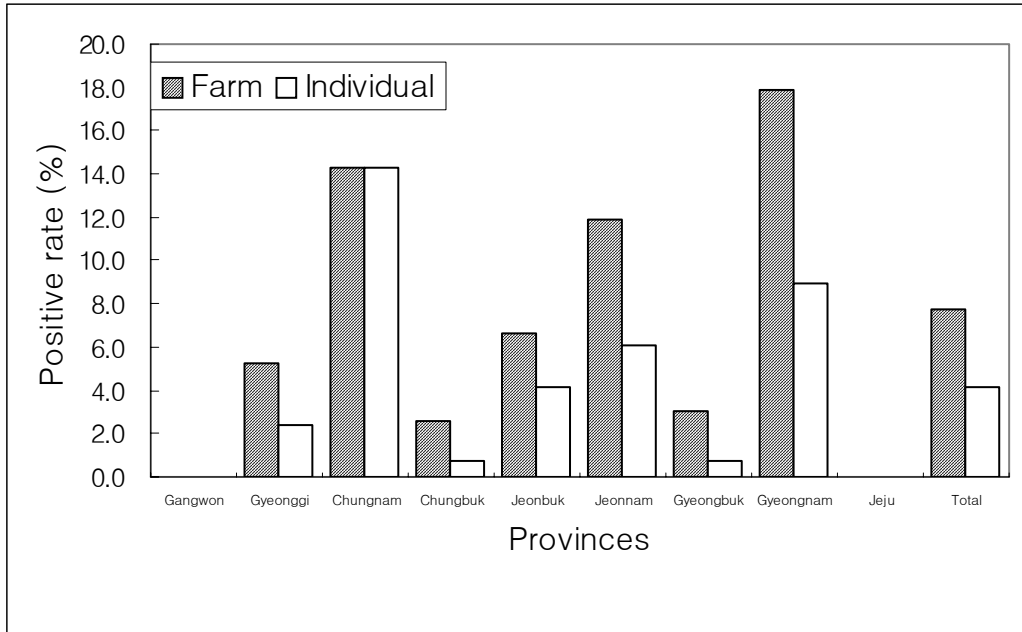


Fig. 1. Comparison of the antibody titer of border disease virus in the goats sampled from each province.

Table 1. Distribution of antibody rate against the border disease virus in each province

Province	No. of positive farm/No. of tested farm (%)	No. of positive goats/No. of tested goats (%)
Gangwon	0/3(0)	0/56(0)
Gyeonggi	1/19(5.26)	2/84(2.38)
Chungnam	1/7(14.29)	4/28(2.38)
Chungbuk	1/39(2.56)	1/138(0.72)
Jeonbuk	4/60(6.67)	13/315(4.13)
Jeonnam	5/42(11.9)	15/246(6.10)
Gyeongbuk	1/33(3.03)	1/143(0.70)
Gyeongnam	5/28(17.86)	11/123(8.94)
Jeju	0/2(0)	0/9(0)
Total	18/233(7.73)	47/1,142(4.12)

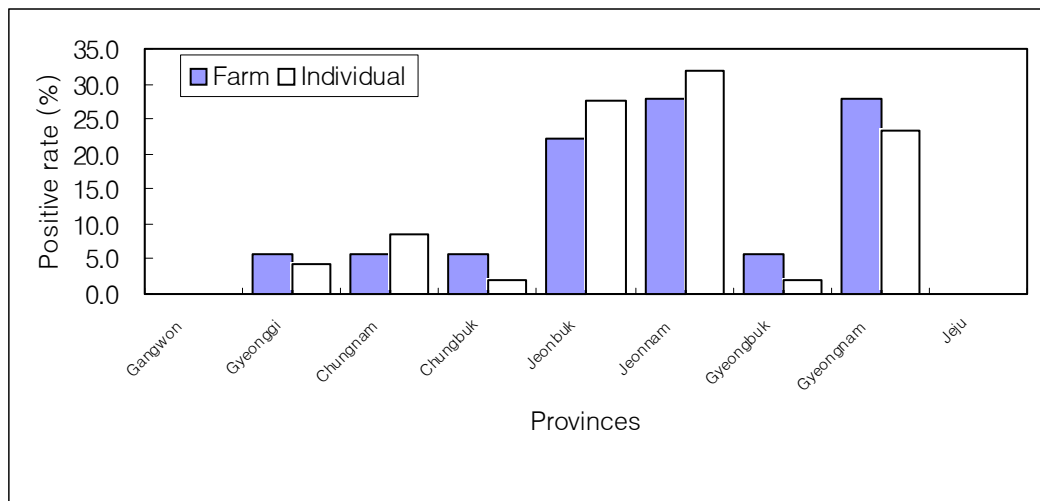


Fig. 2. Regional distribution of positive sera against the border disease virus.

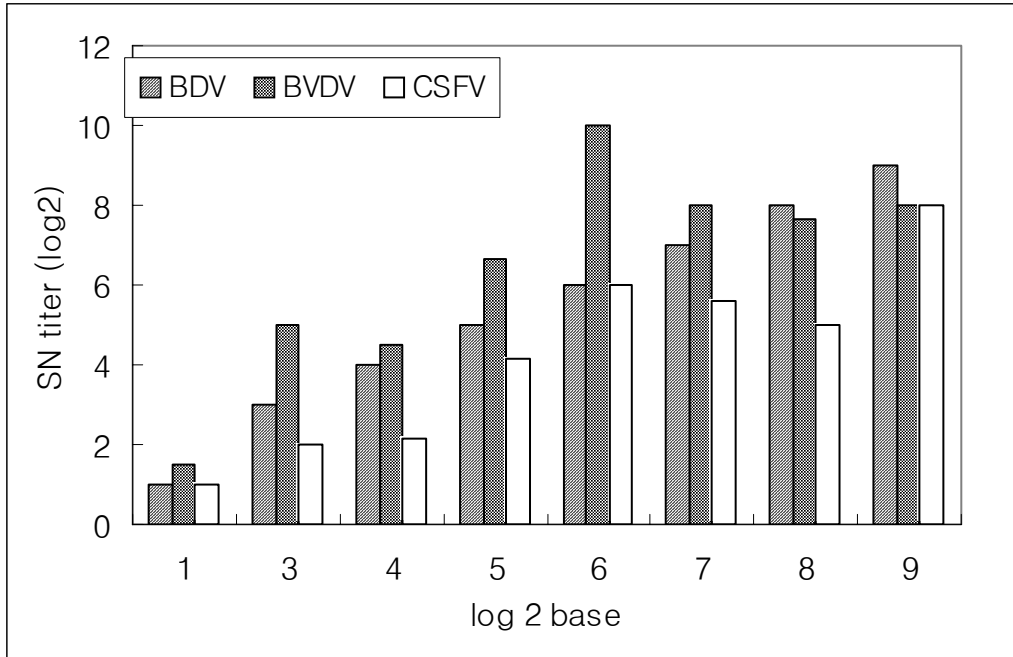


Fig. 3. Serum neutralization test results of border disease virus positive sera to bovine viral diarrhoea virus and classical swine fever virus.

Table 2. Serum neutralization test results of border disease virus positive sera to bovine viral diarrhoea virus and classical swine fever virus

No. of samples	Serum neutralization titer		
	BDV	BVDV	CSFV
1	2	2	2
2	2	4	2
3	8	32	4
4	16	32	4
5	16	32	8
6	16	8	4
7	16	32	4
8	16	16	4
9	16	32	4
10	32	128	64
11	32	1024	64
12	32	16	16
13	32	256	32
14	32	32	4
15	32	64	4
16	64	1024	64
17	128	64	16
18	128	1024	64
19	128	512	64
20	128	256	16
21	128	256	64
22	128	128	64
23	128	256	64
24	128	256	128
25	256	32	4
26	256	1024	64
27	256	256	128
28	256	256	256

나. 국내에서 사육중인 염소에서 전염성비기관염바이러스 (IBRV)에 대한 혈청학적 조사

- 국내 5개지역 110농가 461두를 대상으로 소 전염성비기관염바이러스 (IBRV)에 대한 혈청학적 조사를 실시하였다.
- 혈청검사는 MDBK cell을 이용하여 혈청중화시험을 실시하였으며, 2배 이상을 IBRV에 대해 양성으로 판정하였다.
- 그 결과 9.33% (43/461)의 항체 양성률을 나타내었다.
- 지역별 항체 양성률은 충북 16.13% (15/93), 전남 14.71% (15/102), 전북 7.62% (8/105), 경북 3.92% (2/51), 경남 2.73% (3/110)이었다 (Fig. 4).

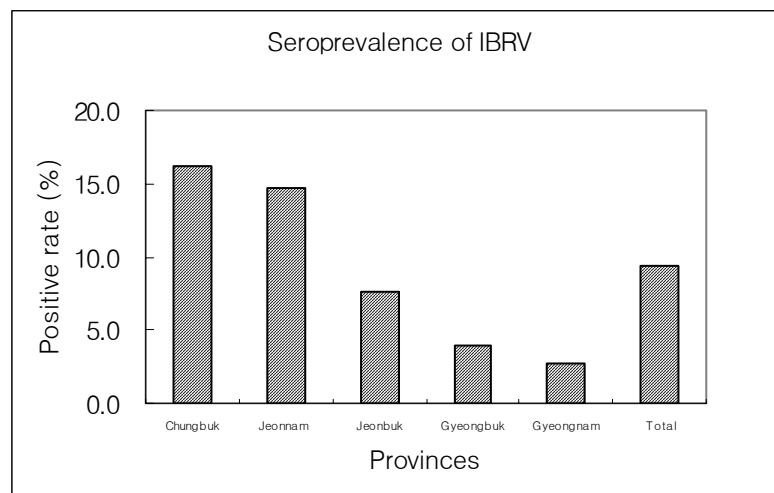


Fig. 4. Comparison of the antibody titer of infectious bovine

laryngotrachitis virus in the goats sampled from each province.

- ▣ 즉, 충북이 가장 높은 항체 양성률을 경남이 가장 낮은 항체 양성률을 나타내었다.
- ▣ 소 전염성비기관염바이러스에 대한 항체가 수준은 2배에서 32배까지였으며, 항체양성시료 43개중에서 2배의 항체가가 74.4% (32/43)를 나타내었다.

다. 국내에서 사육중인 염소에서 파라인플루엔자3형바이러스 (PI3V)에 대한 혈

청학적 조사

- ▣ 국내 7개 지역 152농가 795두를 대상으로 소 파라인플루엔자 바이러스 (PI3V)에 대한 혈청검사를 실시하였다.
- ▣ 혈청검사는 MDBK cell을 이용하여 혈청중화시험을 실시하였으며, 2배 이상을 PI3에 대해 양성으로 판정하였다.
- ▣ 그 결과 10.19% (81/795)의 항체 양성률을 나타내었다.
- ▣ 지역별 분포는 강원 25.8% (8/31), 전북 14.16% (31/219), 전남 10.67% (19/178), 충북 10.68% (11/103), 경남 10% (11/110)의 항체 양성률을 나타낸 반면, 경기 (0/55), 경북 (0/91), 제주 (0/8)에서는 항체 양성률을 나타내지 않았다 (Table 3).
- ▣ 소 파라인플루엔자 바이러스에 대한 항체가 수준은 2배에서 64배 이상까지 다양하였으며, 파라인플루엔자에 감염된 농장의 경우 대부분의 염소에서 항

체양성을 확인 할 수 있었다.

Table 3. Serum neutralization titer of the parainfluenza virus type 3 in sera sampled in each province

Provinces	Distribution of SN titer against PI3 virus							Total
	<2	2	4	8	16	32	≥64	
Gangwon	23	4	4	0	0	0	0	31
Gyeonggi	55	0	0	0	0	0	0	55
Chungbuk	92	3	2	4	1	1	0	103
Jeonbuk	188	4	4	9	10	4	0	219
Jeonnam	159	2	3	5	7	1	1	178
Gyeongbuk	91	0	0	0	0	0	0	91
Gyeongnam	99	0	0	2	5	0	4	110
Jeju	8	0	0	0	0	0	0	8
Sum	715	13	13	20	23	6	5	795

라. 국내에서 사육중인 염소에서 소 코로나바이러스 (BCoV)에 대한 혈청학적 조사

- ▣ 국내 5개 지역 113농가 480두를 대상으로 소 코로나바이러스 (BCoV)에 대한 혈청검사를 실시하였다.
- ▣ 혈청검사는 마우스 혈구를 이용하여 혈구응집억제 (HI)시험을 실시하였으며, 20배 이상을 BCoV에 대한 양성으로 판정하였다.
- ▣ 그 결과 0.83% (4/480)의 항체 양성률을 나타내었다. 지역별 분포는 경남지

역의 2개 농가에서만 BCoV에 대한 항체양성을 확인 할 수 있었으며, 그 외의 지역에서는 항체 양성을 확인 할 수 없었다.

- 소 코로나바이러스에 대한 항체가 수준은 40배에서 80배까지였으며, 국내의 염소에서 소코로나 감염증은 매우 낮은 것을 확인 할 수 있었다.

마. 국내에서 사육중인 염소에서 아까바네, 아이노, 추잔 바이러스에 대한 혈청학적 조사

- 국내 7개 지역 39농가 315두를 대상으로 소 아까바네, 추잔, 아이노바이러스에 대한 혈청검사를 실시하였다.
- 혈청검사는 Vero cell을 이용하여 각각의 바이러스에 대한 혈청중화시험을 실시하여 2배 이상을 각 바이러스에 대해 양성으로 판정하였다.
- 그 결과 아까바네 바이러스에 대한 항체 양성률은 12.7% (40/315), 아이노바이러스 13.02% (41/315), 추잔 바이러스 0% (0/315)를 나타내었다 (Table 4, 5 and 6).
- 아까바네 바이러스의 항체가 수준은 1두에서 64배 이상을 보인 반면 대부분의 중화 항체가는 2배- 4배가 85% (34/40)로 낮은 항체가를 나타내었다 (Table 4).
- 아이노바이러스의 항체가 수준도 2-4배의 낮은 항체가 수준을 나타내고 있었다 (Table 5).
- 아까바네 바이러스의 양성혈청에 대한 지역별 분포는 강원이 55% (22/40),

전북이 37.5% (15/40), 충북이 7.5% (3/40)를 나타내었으며, 아이노바이러스는 전북 46.3% (19/41), 전남 17.1% (7/41), 강원 14.6% (6/41), 충북, 12.2% (5/41), 경북 4.9% (2/41), 제주 2.4% (1/41)를 각각 나타내었다.

- ▣ 모기매개에 의한 유사산을 나타내는 3종 바이러스에 대한 혈청학적 조사를 통하여 염소에서는 아까바네 바이러스와 아이노바이러스가 국내 염소 농가에서는 낮은 항체 양성률이 있음을 확인할 수 있었다.

Table 4. Distribution of SN titer against Akabane virus

Distribution of SN titer against Akabane virus							Total
<2	2	4	8	16	32	≥64	
275	31	3	5	0	0	1	315

Table 5. Distribution of SN titer against Aino virus

Distribution of SN titer against Aino virus							Total
<2	2	4	8	16	32	≥64	
274	23	16	2	0	0	0	315

Table 6. Distribution of SN titer against the Akabane, Aino and Chuzan viruses

No. of tested goats	Virus	No. of positive (%)
315	Akabane	40 (12.7)
	Aino	41 (13.02)
	Chuzan	0 (0.0)

바. 국내에서 사육중인 염소에서 일본뇌염바이러스(JEV)에 대한 혈청학적 조사

- 염소에서 일본뇌염바이러스에 대한 항체 양성률을 알기위하여 120농가 668두에 대한 시료를 혈구응집억제반응 (HI)을 통하여 혈청검사를 실시하였다.
- 혈청검사에 사용된 HI용 항원은 Nakayama strain을 사용하였다.
- HI 역가는 20배 이상을 양성으로 판정하였다.
- 국내 염소 668두 중 60두 (8.98%)에서 양성률을 확인할 수 있었다.
- HI 역가의 지역적 분포는 경남 20.0% (22/110), 전북 18.8% (19/101), 전남 10.6% (16/151), 경기 4.4% (2/46), 경북 1.2% (1/85), 강원 0% (0/103), 충북 0% (0/73)를 각각 나타내었다 (Fig. 5A).
- 국내 유산양 124두 모두 항체 음성을 나타내었고, 국내 흑염소는 11.03% (60/544)의 양성률을 나타내었다.
- 일본뇌염바이러스에 대한 항체수준은 1:20에서 1:160이었으며, 20배의 항체가 35%를 차지하였다 (Table 7).
- 60두 양성반응을 보인 개체 중에서 연령별 분포는 2세의 연령개체에서 가장 높은 분포율을 나타내었다 (Fig. 5B).
- 국내 염소를 대상으로 일본뇌염바이러스에 대한 혈청학적조사는 처음으로 판단되며, 주로 남부지역이 JEV에 대한 높은 양성률을 보여서 일본뇌염바이러스를 옮기는 모기의 서식과 밀접한 관련이 있을 것으로 추정된다.
- 또한 가축의 일본뇌염의 감염을 모니터링 하는데 염소에 일본뇌염백신을 접

중하지 않기 때문에 자연환경에서의 일본뇌염 감염률과 감시동물로 염소가
좋은 후보일 것으로 생각된다.

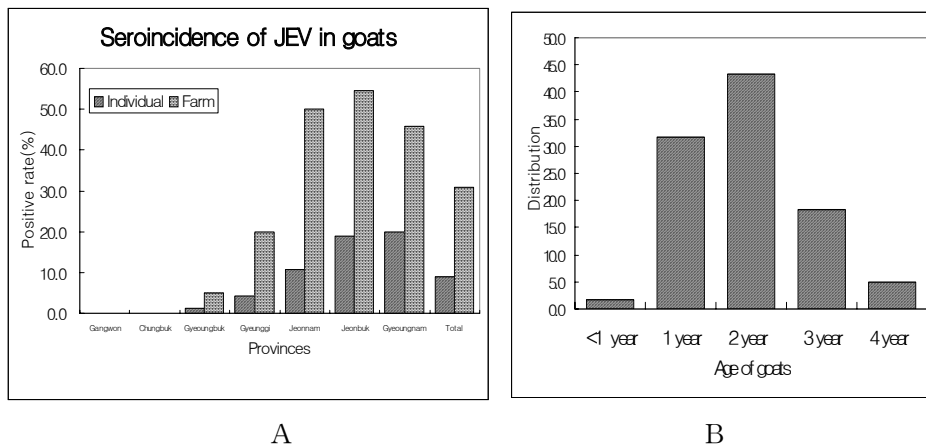


Fig. 5. (A) Comparison of the antibody titer of Japanese B encephalitis virus in the goats sampled from each province. (B) Total age distribution of the antibody titer for the Japanese B encephalitis virus in the blood specimens sampled in goats.

Table 7. Distribution of HI titer against the Japanese B encephalitis virus

Distribution of HI titer against JEV							Total
<20	20	40	80	160	320	≥640	
608	21	17	10	2	0	0	668

사. 적요

- 국내에서 사육중인 염소를 대상으로 전국 223개 농가, 1,142두의 보더병 바이러스에 대한 항체 양성률을 조사한 결과 농장별 8.07% (18/223), 개체별 4.12% (47/1,142)를 나타내었다.
- 따라서 국내에서도 흔들병을 일으키는 질병의 원인체인 Pestivirus가 발생하고 있음을 본 연구를 통하여 알 수 있었으며, 그 발생빈도도 8.07%로서 상당히 높은 수준에 있다는 것을 알 수 있었다.
- 염소 보더병바이러스에 대한 항체 양성시료 28두의 혈청을 3종 (BVDV, BDV, CSFV)의 바이러스를 이용하여 혈청 교차반응을 실시한 결과 BVDV에 대한 항체가 BDV보다 2배의 항체를 나타내었고, CSFV 항체보다 4배 이상의 수준을 나타내었다.
- 본 결과가 의미하는 것은 국내에서 발생하고 있는 흔들병은 보더병양 질병을 일으키는 bovine viral diarrhea virus에 의한다는 것을 간접 시사한다.
- 국내에서는 처음으로 염소에서 7종 바이러스 질환에 대한 혈청학적 검사를 실시한 결과, IBRV 9.33%, PI3 10.19%, BCV 0.83%, Akabanevirus 12.69%, Ainovirus 13.02%, Chuzanvirus 0%, JEV 8.98%의 양성률을 각각 나타내었다.
- 본 검사결과를 통하여 국내에서도 지금까지 염소에서 알려져 있지 않았던 7종의 바이러스성 질병이 발생하고 있으며, 추잔바이러스와 소 코로나바이러스를 제외한 전염성 비기관염바이러스, 파라인플루엔자 3, 아까바네 바이러스, 아이노바이러스, 일본뇌염 바이러스가 상당히 높은 비율로 발생하고 있음

을 알 수 있었다.

- 특히 이러한 질병들은 소에서도 다발하는 질병으로서, 이러한 염소의 질병들은 가축과 가축간의 전파의 원인으로 작용할 수 있음을 시사하며, 특히 일본 뇌염의 경우 염소에서는 백신을 수행하지 않기 때문에, 염소와 가축 간 혹은 염소와 사람간의 일본 뇌염 전파의 주요한 원인으로 작용할 수 있어서, 경제적인 측면뿐만 아니라 공중보건상에도 중요한 결과임을 알 수 있었다.

2. 염소 폐사체를 이용한 병리학적, 세균학적, 기생충학적 검사

- 2004년도부터 본 사업이 끝나는 2006년도까지 보더병 바이러스의 역학조사를 수행하기 위해서 국내 염소 농가를 방문하여, 혈액, 분변 등을 채취하였다.
- 이와 더불어 방문한 농가에서 폐사한 혹은 중증의 질병에 이환된 것을 이용하여 병리학적, 세균학적, 기생충학적 검사를 수행하였다.
- 아래에 기술된 것은 이와 같이 병리학적, 세균학적, 기생충학적 검사를 수행한 증례들 중에서 국내에서 보고 되지 않았던 것들을 중심으로 하였다.

1. 증례 1.

- 본 증례들은 300두 규모의 염소농가에서 새끼염소들이 급사라는 임상증상이 있어서 폐사한 5두의 폐사체를 검사한 것이다.
- 폐사체의 분변을 검사한 결과, 중증의 콕시듐, HOT COMplex (Haemonchus, Ostertagia, Trichostrongylus, Cooperia, Oesophagostomum), 조충 충란이 관찰되었으며, 체 표면에는 suckling lice 와 chewing lice가 기생되어 있었다.

- ▣ 부검 시 폐는 대엽성의 화농성 기관지 폐렴이 특히 앞쪽엽과 중간엽에서 관찰되었다 (Fig. 1A and B).
- ▣ 위와 소장은 HOT COmplex와 조충 및 콕시듐증에 의하여 카타르성 장염소견을 보였다.
- ▣ 비장은 위축되어 있었으며, 신장의 피질은 창백하고 수질은 암적색의 소견을 보였다.
- ▣ 심장 관상구의 지방은 장액성 위축 소견을 보였으나 그 외의 장기에서는 특이한 육안적 소견을 관찰할 수 없었다.
- ▣ 조직학적으로 관찰한 결과 폐는 심한 화농성 기관지 폐렴이 관찰되었다 (Fig. 1C and D).

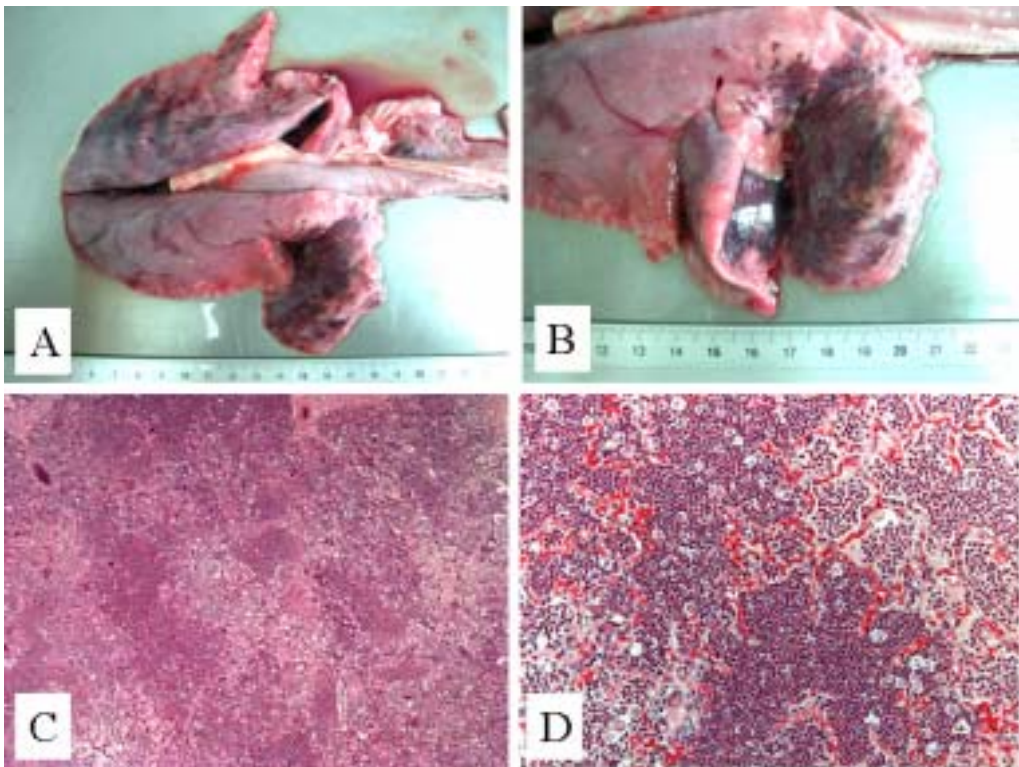


Fig. 1. Goat, lung. (A) Congestion and consolidation of apex and middle

lobes of lung are observed. The other lobes show also diffuse mild congestion and consolidation. (B) Magnification of Fig. 1A. (C) Note diffuse severe purulent pneumonia. (D) Magnification of Fig. 1C. Diffuse severe neutrophils are infiltrated into the alveoli. Fig. 1C and 1D, H&E stain.

▣ 조직학적으로 특히 소장에서는 콕시듐의 중감염, 조충 유충, HOTA COMplex 등 다양한 종류의 기생충들이 관찰되었으며, 이로 인하여 카탈성 장염과 중등도의 림프구들이 소장 용모 고유층에 침윤되어 있었다 (Fig. 2).

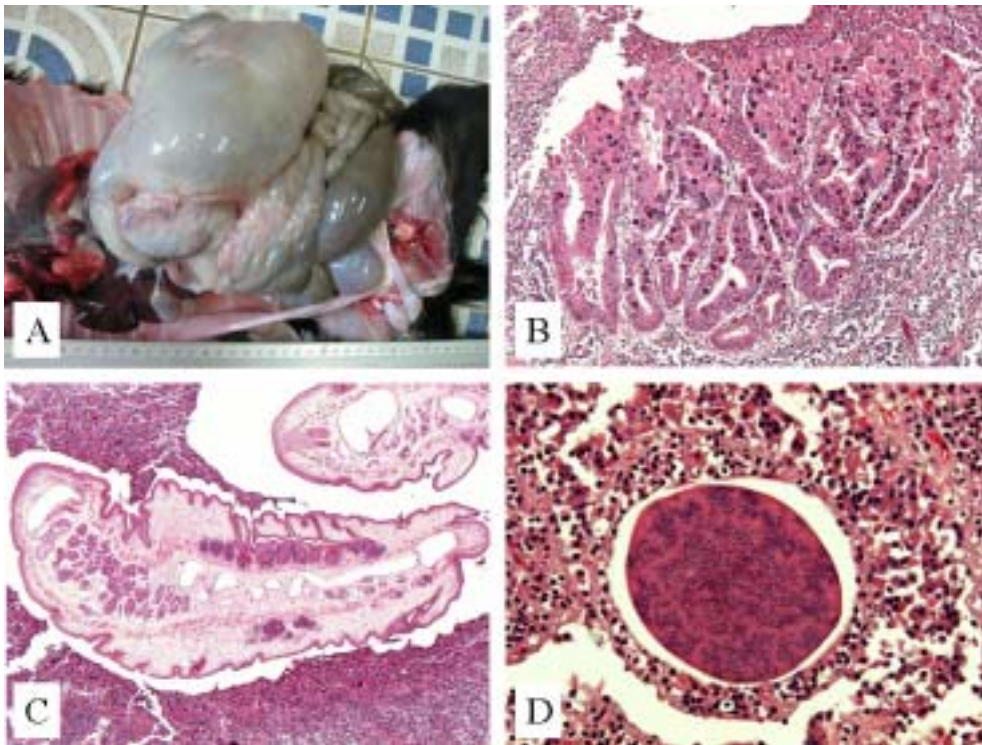


Fig. 2. Goat, gastrointestinal tract. (A) Gross appearance of gastrointestinal tract. (B) Villi epithelial cells are heavily infected with *Eimeria* spp. Note diffuse severe infiltration of lymphoid cells in the lamina propria and submucosa. (C) Note two larvae of tape worm in the

jejunal lumen. (D) Unidentified protozoa cyst is observed in the lamina propria of jejunal villi. Fig. 2B-D, H&E stain.

- 신장은 조직학적으로 다발성의 중등도 patch-form tubular degeneration 및 necrosis 소견을 보였으며, 수질의 혈관은 전반적으로 충혈 되어 있었다.
- 심장 관상구의 지방은 미만성의 심한 장액성 위축 소견을 보였으며, 제1위부터 3위의 점막은 미만성의 중등도 공포변성 및 괴사와 점막하의 림프구 침윤이 중등도로 관찰되었다.
- 비장은 다발성의 심한 림프구 결손이 백수에서 발생하였고, 적수는 충혈 소견을 보였다 (Fig. 3A).
- 대뇌를 비롯하여 중추신경계에서는 글리아세포들이 미만성으로 증가되어 있었고, 모세혈관의 충혈과 sprouting 소견이 관찰되었다 (Fig. 3B).

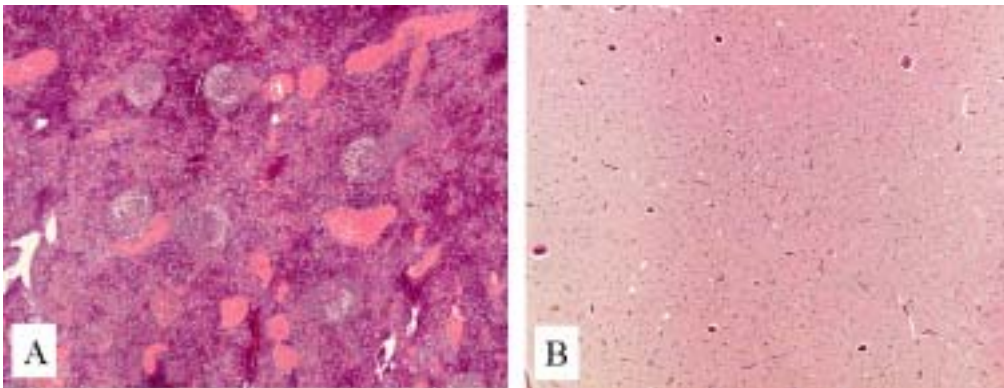


Fig. 3. Gout, spleen and cerebrum. (A) Multiple severe lymphoid cell depletions are marked in the white pulp. Note multiple moderate congestion in the red pulp. (B) The number of glial cells is increased. Capillary vessels are congested and look like capillary sprouting. H&E stain.

- ▣ 폐 조직에서 세균분리를 시도한 결과 *Haemophilus* 균이 분리되었다.
- ▣ 분리된 세균에 대하여 항생제 감수성 검사를 실시한 결과 Neomycin, Gentamicin, Tetracycline, Sulfamethoxazole, Enrofloxasime에 감수성이 있는 반면에, Tiamulin, Ceftiofur, Lincomycin, Lynco-spectin 등에는 저항성을 보였다.

Table 1. Antibiotic spectrum against the *Haemophilus* spp. isolated from lung of goat with severe purulent pneumonia

Anibiotics	Sensitivity
Neomycin	+++
Tylosin	+
Tiamulin	-
Ceftiofur	-
Lincomycin	-
Lynco-spectin	-
Amoxicillin /Clavulanic acid	++
Sulfamethoxazole-trimethoprime	+++
Gentamicin	+++
Kanamycin	++
Tetracycline	+++
Enrofloxacin	+++

- 본 증례를 요약하면, 1) 폐사는 심한 화농성 폐렴에 의한 호흡부전과 소화기계
에 심하게 감염된 기생충에 의한 영양결손이라고 생각된다.
- 이러한 호흡부전에 의하여 뇌에서는 저산소증이 발생하여, 만성적 뇌조직 손
상이 발생한 결과 글리아세포의 증가와 모세혈관의 sprouting 소견이 발생하
였을 것으로 추정된다.
- 또한 저산소증과 더불어 아마도 항생제 오남용에 의해서 신장 세뇨관 상피의
변성 및 괴사가 발생하였고, 영양결핍에 의해 심장 관상구의 지방이 장액성
위축되었다고 생각된다.
- 비장은 심한 폐렴과 기생충 감염에 의한 스트레스에 의한 림프구 결손이 심
하게 발생하였을 것으로 추정된다.

2. 증례 2

- 증례 2는 증례 1과 동일한 염소 농가에서 동일한 시점에서 의뢰된 폐사체이
다.
- 본 증례는 증례 1과는 약간 상이한 소견을 보여, 증례 1과 상이한 중심적인
병변만 자세히 기술하려고 한다.
- 증례 2는 증례 1과 동일하게 육안적으로 대엽성의 폐렴이 관찰되었지만, 특
징적으로 다발성 농포 (abscesses)도 관찰되었다 (Fig. 4A and B).
- 폐를 조직학적으로 관찰한 결과, 폐는 미만성으로 중등도 충혈과 폐포 부종이
관찰되었으며, 특징적으로 다발성의 농포가 보였다.
- 다발성의 농포는 중심부위에 괴사성 세포찌꺼기로 구성되어 있었으며, 변연부
에는 괴사되지 않은 호중구 및 대식세포가 침윤되어 있었다 (Fig. 4C).
- 또한 제일 겉 층은 얇은 섬유조직으로 둘러싸여 있었다.
- 특징적으로 아스퍼질러스 균사가 세포찌꺼기로 구성된 중심부와 변연부의 염
증세포 침윤부에서 다수 관찰되었다 (Fig. 4D).

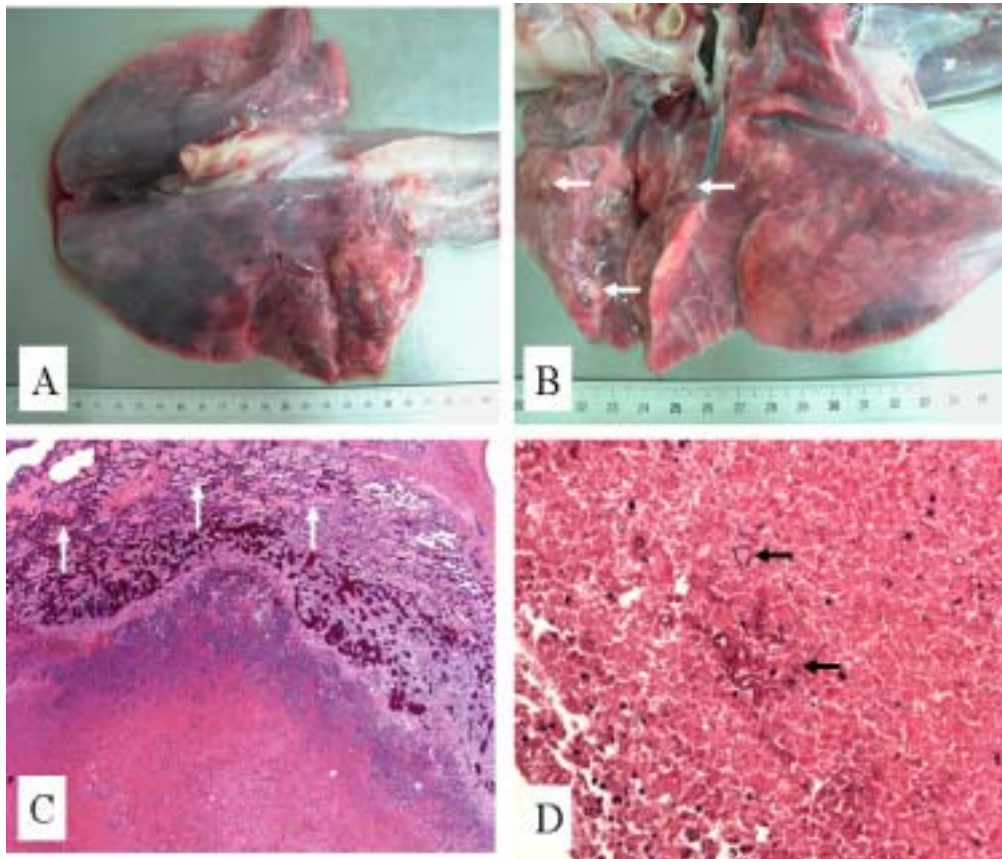


Fig. 4. Goat, lung. (A) Multiple severe congestion and consolidation throughout the lungs are observed. (B) Magnification of Fig. 4A. Multiple abscesses are formed (arrows). (C) Abscess consists of central necrotic debris and peripheral inflammatory cell infiltration. Note severe alveolar edema (arrows). (D) Magnification of central necrotic lesion of Fig. 4C. Multiple hyphae of *Aspergillus* spp. are seen in the necrotic debris. Fig. 4C and 4D, H&E stain.

▣ 그 외에 증례 1과 상이한 소견은 간 세포의 미만성 심한 위축과 (Fig. 5A and B)와 소장에서 지금까지 알려져 있지 않는 원충이 용모 고유층에서 관찰된 것이다 (Fig. 5C and D).

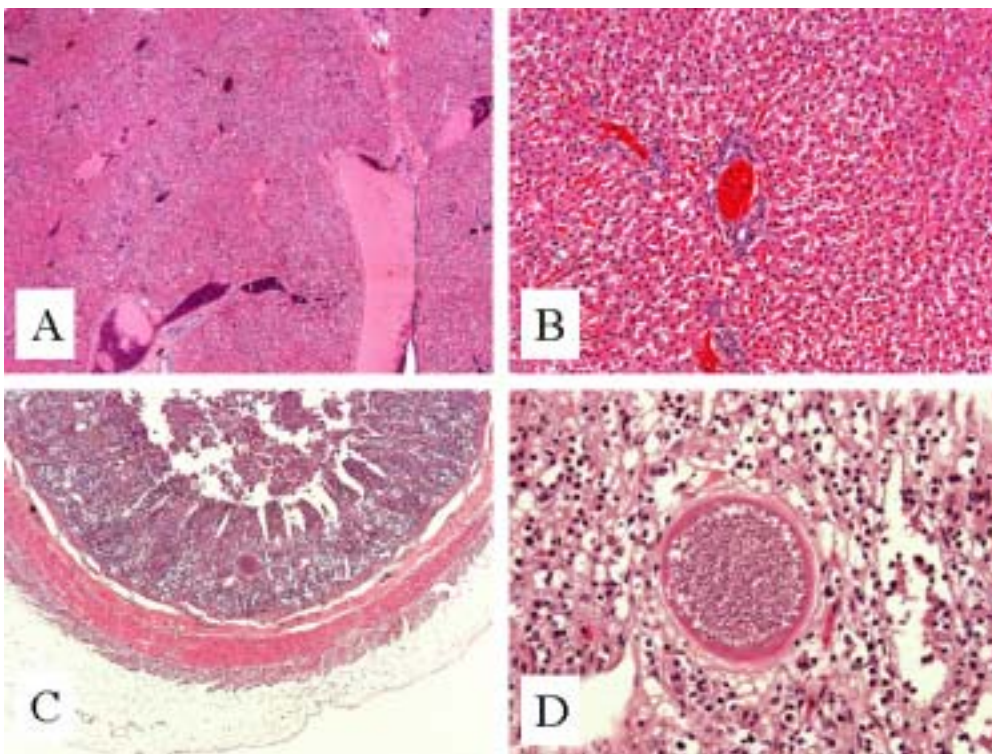


Fig. 5. Goat, liver and intestine. (A) Diffuse liver congestion. (B) Magnification of Fig. 5A. Diffuse liver cell atrophy is marked. (C) Moderate catarrhal enteritis is observed in the jejunum. Note an unknown protozoa cyst in the lamina propria. (D) Magnification of an unknown protozoa of Fig. 5C. Fig. 5A-D, H&E stain.

3. 증례 3

- ▣ 약 500두 규모의 염소를 사육하는 농가에서 출생 7일령부터 10일령 사이에 기력소실을 동반한 폐사가 발생하였다.
- ▣ 특히 겨울철에는 신생 염소새끼에서 70-80%에 달하는 높은 폐사율이 특징적으로 발생하였다.
- ▣ 부검 시 폐는 전반적으로 충혈 된 소견을 보였으며, 림프절은 종대 되어있었다.
- ▣ 조직학적으로 관찰한 결과, 폐는 미만성으로 중등도 간질성 폐렴 소견을 보였으며 (Fig. 6A), 림프절은 화농성 림프선염 소견을 보였다 (Fig. 6B).
- ▣ 그 외의 장기 및 조직에서는 어떠한 특이 소견도 관찰할 수 없었다.

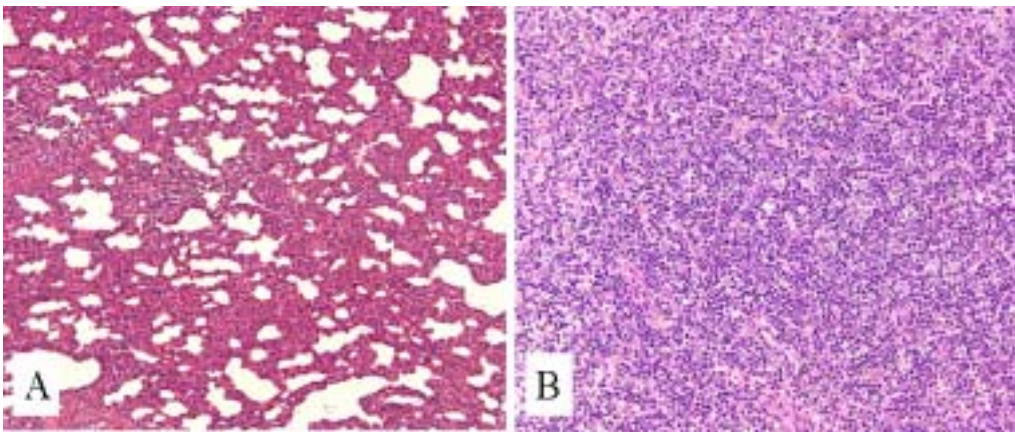


Fig. 6. Goat, lung and lymph node. (A) Diffuse severe interstitial pneumonia is observed. (B) Severe purulent lymph adenitis is seen. H&E stain.

- ▣ 폐에서 세균을 분리한 결과 *Pasturella multocida*균이 분리되었으며, 분리된 균에 대한 항생제 감수성 검사를 실시한 결과 Ceftiofur, Lynco-spectin, Enrofloxacin이 분리된 균에 가장 감수성이 높았으며, Neomycin, Tylosin,

Tiamulin, Amoxicillin/Clavulanic acid, Sulfamethoxazole-trimethoprim, Gentamicin, Kanamicin이 중등도로 감수성이 높았다.

■ 하지만 Tetracyclin에 대해서는 내성을 보였다 (Table 2).

Table 2. Antibiotic spectrum against the *Pasteurella multocida* isolated from lung of goat

Anibiotics	Sensitivity
Neomycin	+++
Tylosin	+
Tiamulin	-
Ceftiofur	-
Lincomycin	-
Lynco-spectin	-
Amoxicillin /Clavulanic acid	++
Sulfamethoxazole-trimethoprim	+++
Gentamicin	+++
Kanamycin	++
Tetracycline	+++
Enrofloxacin	+++

- 본 증례를 요약하면, 폐에서 관찰된 간질성 폐렴이 주증상 이었다는 것이다.
- 간질성 폐렴은 바이러스, 세균, 중독성 물질 등 여러 가지 원인에 의해서 발생할 수 있다.
- 하지만 염소에서 간질성 폐렴을 유발하는 것으로 대표적인 것은 *Retroviridae* 내의 lentivirus에 의한 chronic progressive pneumonia이다.
- 이 질병은 질병명에서 알 수 있듯이 어린 연령부터 천천히 간질성 폐렴이 진행되어 임상증상은 2세 이후부터 발생한다고 한다.
- 일반적으로 간질성 폐렴이 발생하면, 폐의 점막면역기능이 떨어져 2차성의 세균성 폐렴이 속발되는 경향이 있다.
- 따라서 본 증례에서 분리된 *Pasteurella multocida*는 염소에서도 화농성 기관지 폐렴을 유발하는 것으로서 이러한 2차세균의 감염에 의해 2차성의 세균성 폐렴이 이러한 농가에서는 다발할 가능성이 높을 것으로 예상된다.
- 이러한 가설을 증명할 수 있는 것이 증례 4에서 기술하겠다.
- 이 질병은 염소를 사육하는 모든 나라에서 발생하고 있다고 보고되어 있지만 국내에서는 아직 연구가 시도되지 않고 있다.
- **따라서 본 질병이 lentivirus에 의한 chronic progressive pneumonia인지 유무를 향후 규명할 필요가 있을 것으로 사료된다.**
- 또한 향후 이러한 연구를 수행하여야 할 이유가 어린 염소에서도 chronic progressive pneumonia가 관찰되었기 때문이며, 이에 대해서는 아래에 기술하였다.

4. 증례 4

- 본 증례는 증례 3의 염소 농가에서 동시에 의뢰한 폐사체이다.
- 본 증례도 증례 3과 매우 유사한 병변 발생 양상을 보였지만, 상이한 것은 폐에서 대엽성의 화농성 폐렴이 관찰된 것이다 (Fig. 7A).

- ▣ 화농성의 폐렴은 미만성으로 분포하였고, 특히 많은 부분에 걸쳐서 oat-shaped cell 즉 변형된 백혈구로 알려진 세포들이 심하게 침윤되어 있었다 (Fig. 7B and C).

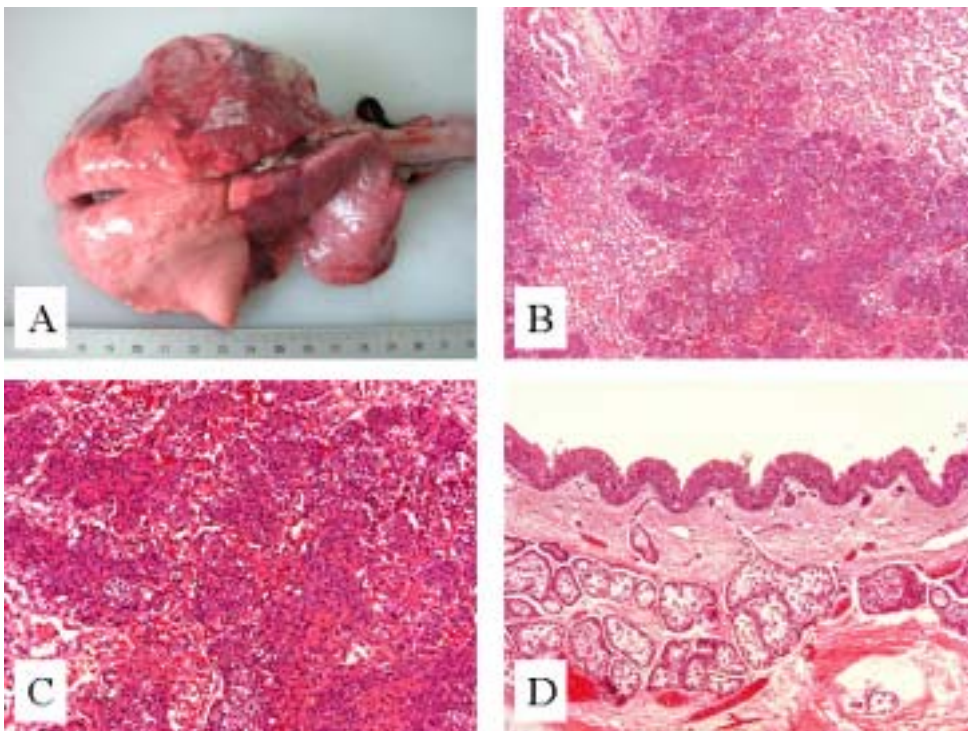


Fig. 7. Goat, respiratory tract. (A) Severe congestion and consolidation are observed in the apex, middle and a part of diaphragmatic lobes. (B) Diffuse severe purulent pneumonia is seen. (C) Magnification of Fig. 7B. Severe pneumonia lesions are occupied with the mass infiltration of oat-shaped neutrophils. (D) Trachea epithelial cells shows diffuse deciliation on their surface. Fig. 7B-D, H&E stain.

- ▣ 또한 기관의 상피세포 표면에 있는 microvilli는 미만성으로 심하게 탈락되어

있는 것이 특징이었다.

- 또한 비장은 다발성의 충혈이 적수에서, 다발성의 림프구 괴사 및 결손이 백수에서 관찰되어 결과적으로 미만성의 대식세포 침윤에 의한 탐식활동이 활발히 관찰되었다 (Fig. 8A and B).
- 그 외의 장기나 조직은 앞의 증례에서 기술한 것과 같은 폐렴에 의한 저산소증 소견을 보였다.

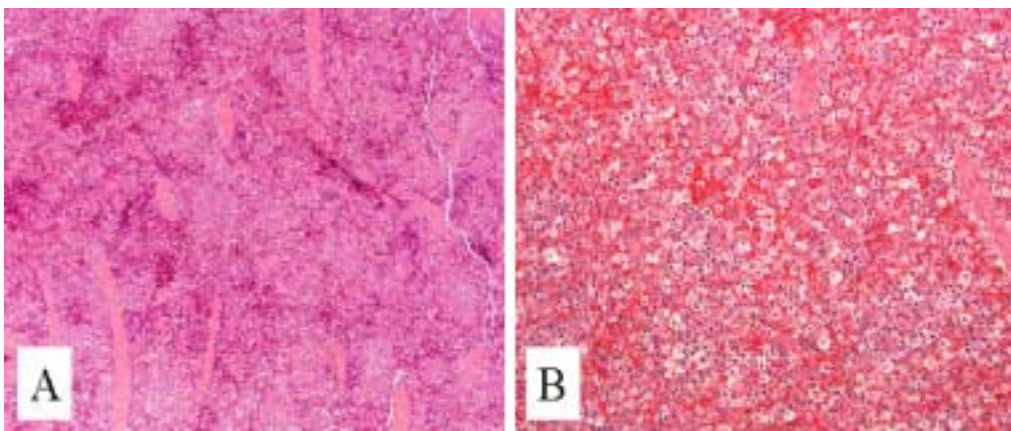


Fig. 8. Goat, spleen. (A) Multiple moderate congestion in the red pulp and lymphoid cell depletion in the white pulp. (B) Severe starry sky appearance due to active phagocytosis by macrophages. Fig. 8A and B, H&E stain.

- 폐에서는 증례 3과 같이 *Pasteurella multocida* 균이 분리되었다.
- 본 증례는 증례 3과 동일한 염소 농가에서 동일한 시점에 의뢰된 증례로서, 증례 3에서 기술한 바와 같이 간질성 폐렴이 발생한 경우에 있어서는 이와 같이 2차성의 세균성 폐렴이 다발할 수 있다는 것을 입증한다 할 수 있다.

5. 증례 5 (Case# 05-122).

- ▣ 약 1000두 규모의 염소사육 농가에서 다 자란 염소가 피부에 다발성 결절, 폐렴 증상을 보이다 폐사하여 의뢰된 증례이다.
- ▣ 부검한 결과 가슴부위 피하에 직경 약 5 cm 가량의 농양 결절 3개가 관찰되었다.
- ▣ 또한 폐와 흉벽간의 심한 유착이 관찰되었으며, 흉강 안쪽 왼쪽에 직경 약 5 cm 정도의 구형의 농양결절 3개가 형성되어 있었다 (Fig. 9B).
- ▣ 간, 비장, 신장은 약간 종대된 소견을 보였으나, 그 외의 장기나 조직에서는 육안상 특별한 병변을 관찰할 수 없었다.



Fig. 9. Goat. (A) Appearance of an adult goat carcass. (B) Abscesses containing white creamy puss observed in the thorax.

- ▣ 본 증례에서는 폐에서 특징적으로 3가지 특징적 병변이 관찰되었다.
- ▣ 첫째는 상술한 바와 같이 미만성의 간질성 폐렴, 둘째는 폐충의 감염소견이다.
- ▣ 간질성 폐렴은 미만성으로 관찰되었는데, 산발성으로 경도에서 중등도의 병변이 혼재되어 있는 양상이었다 (Fig. 10B).

- 폐충에 의한 병소가 관찰되었는데, 폐충은 여러 가지 생식단계가 병변 내에서 모두 관찰되었다 (Fig. 10C-F).
- 즉, 성충으로부터 시작하여 여러 가지 작은 유충까지 모두 관찰되었다.
- 특히 폐충은 기관지 내에서 생식하는 것이 아니고, 모두 폐포 내에서 증식하고 있는 것이 특징으로서, 이러한 특징에 의해서 본 폐충은 *Mullerius* spp. 감염으로 추정된다.
- 국내에서 소에서는 폐충의 발생보고가 있었지만, 염소의 폐충은 본 증례가 처음이다.

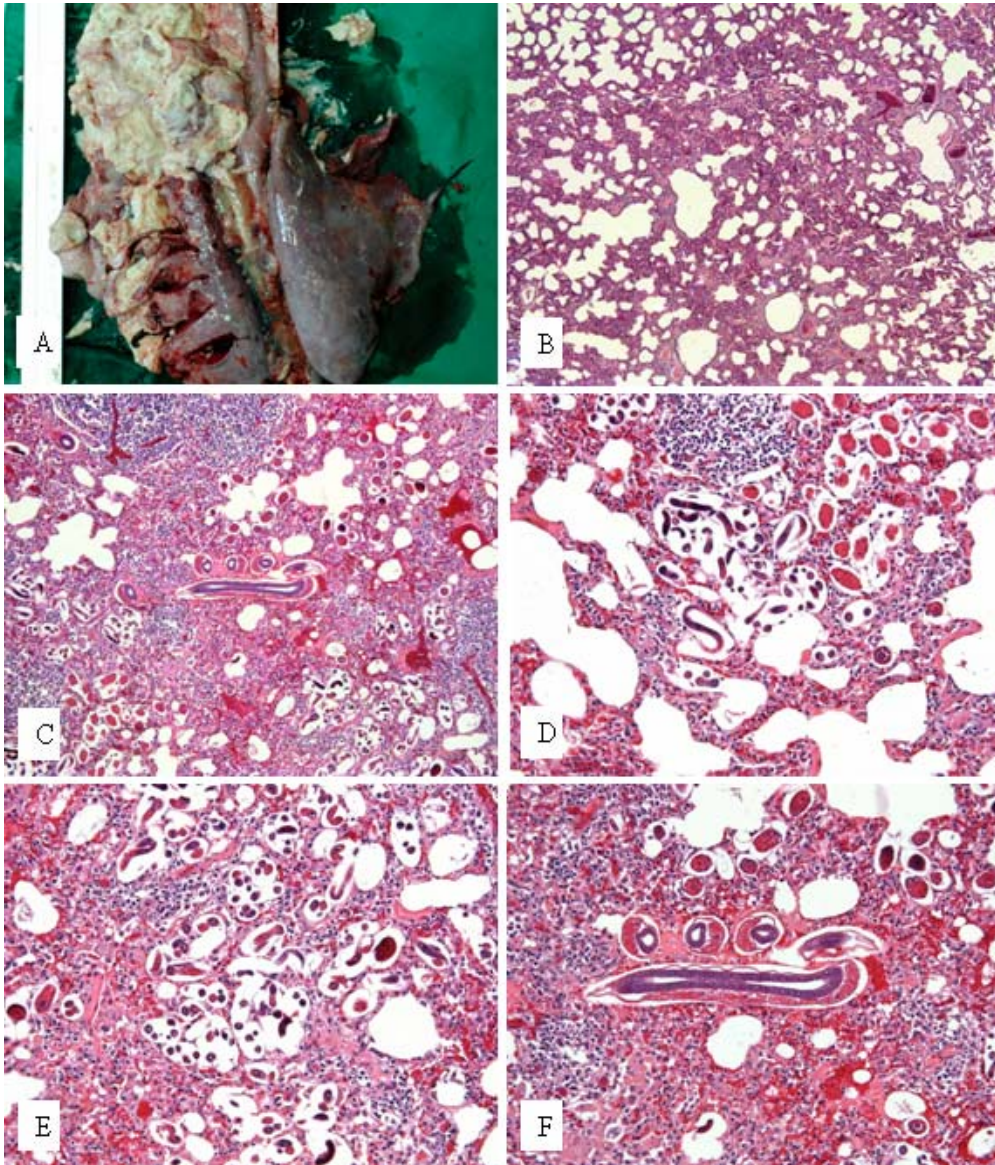


Fig. 10. Goat, lung. (A) Large ruptured abscess is seen. Note diffuse moderate congestion throughout the whole lung lobes. (B) Diffuse mild and moderate interstitial pneumonia is observed. (C-F) Variable sized lung worms are noted. Fig. 10B-F, H&E stain.

- 또한 기관의 상피세포는 미만성으로 심하게 탈락되어 있었고, 점막하 조직에는 림프구가 미만성으로 중도 침윤되어 있었다 (Fig. 11A).
- 특징적으로 점막하의 선 세포들은 증식되어 있었는데, 특히 어떤 부위에서는 선암종양 소견도 볼 수 있었다. (Fig. 11B).

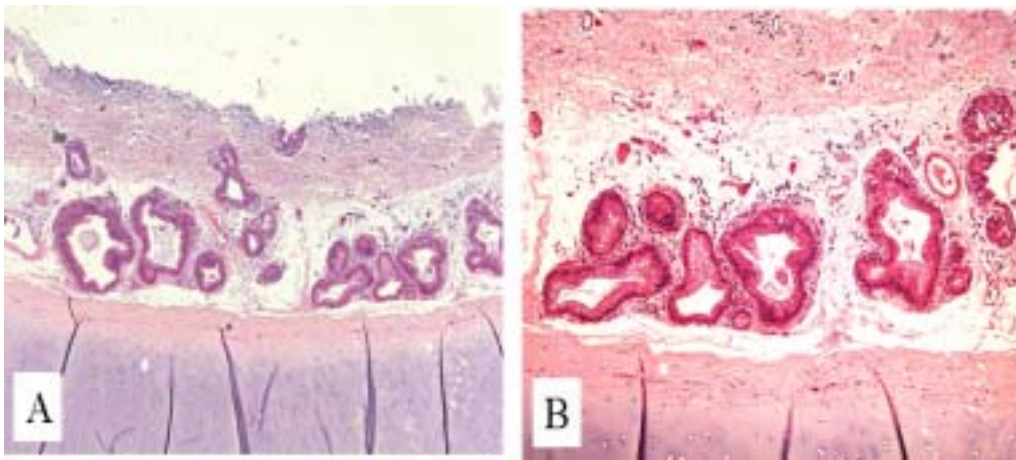


Fig. 11. Goat, trachea. (A) Note diffuse severe desquamation and lymphoid cell infiltration. (B) Magnification of Fig. 11A. Submucosal ductal hyperplasia is observed. Fig. 11A and B, H&E stain.

- 간은 육안적으로 얼룩덜룩한 소견을 보였으며 경결감을 보였고, 현미경으로 관찰한 결과 디세간극에 amorphous eosinophilic한 아밀로이드 물질이 미만성으로 심하게 채워져 있어서, 간세포는 심하게 위축된 소견을 보였다 (Fig. 12A and B).
- 비장도 약간 종대된 소견을 보였으며 경결감이 증가되었으나, 그리 외형적으로 특이한 병변은 관찰할 수 없었다 (Fig. 12C).
- 하지만 현미경으로 관찰한 결과 다발성으로 심한 아밀로이드 침착이 백수 주위에서 관찰되었다 (Fig. 12D).

- ▣ 신장은 육안적으로 약간 중대되고 경결감이 증가되어 있었고 약간 창백한 소견을 보였다 (Fig. 12E).
- ▣ 현미경으로 관찰한 결과 미만성의 분절성 아밀로이드 침착 (Diffuse segmental amyloid deposition)이 사구체에서 관찰되었다 (Fig. 12F).

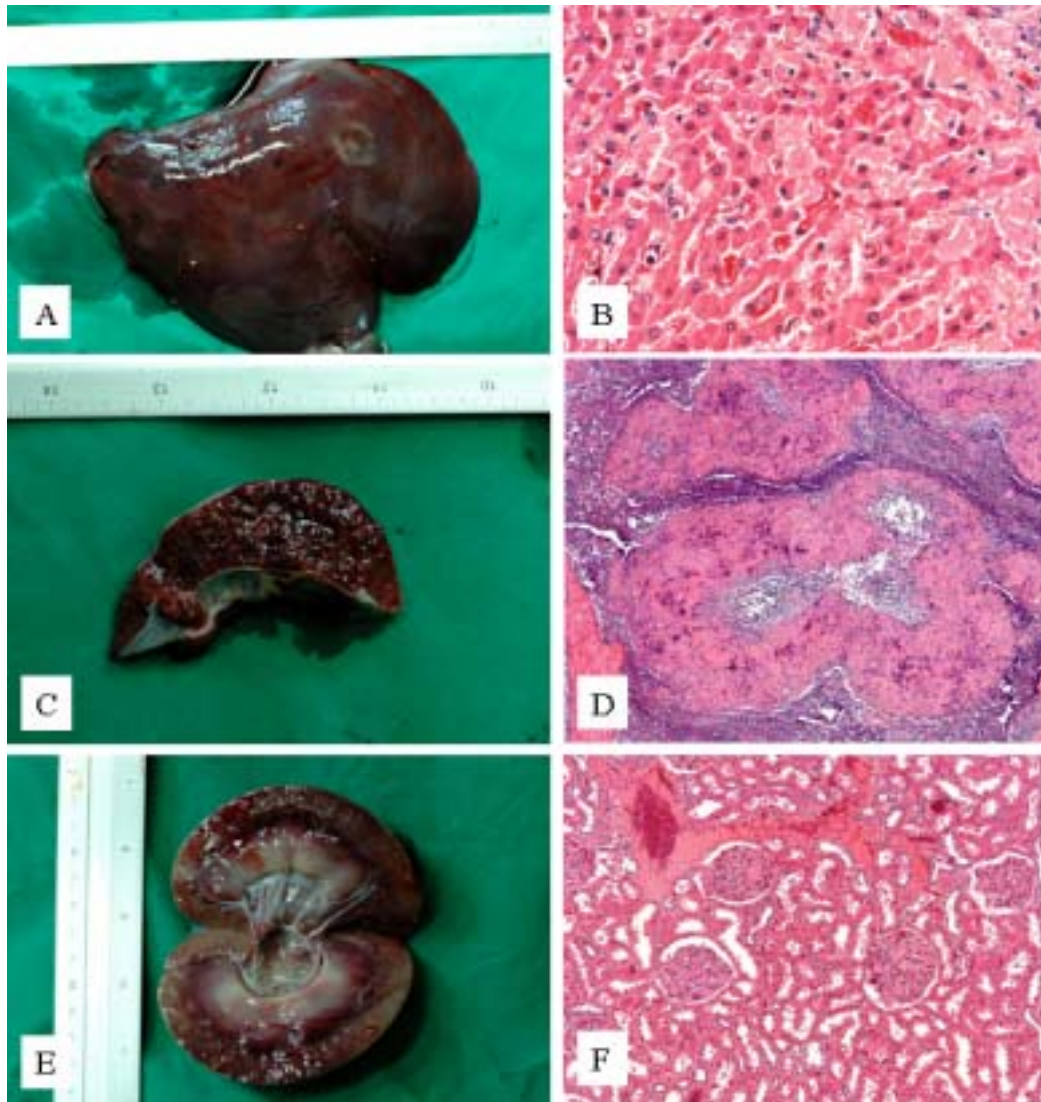


Fig. 12. Goat, liver, spleen, kidney. (A) Note severe mottled liver. (B) Disses's space is packed with amyloid, leading severe hepatocyte atrophy. (C) Multiple small white foci. (D) Heavy deposition around atrophied white pulp. (E) Pale cortex and borderline congestion between cortex and medullary. Amyloid is deposited segmentally in the glomerulus. Fig. 12B, D and F, H&E stain.

- 본 증례는 제1위에서 3위에 걸쳐서 점막표면이 약간 거칠게 보였으며, 이러한 부위를 현미경으로 관찰한 결과 상피세포의 증식이 관찰되었다 (Fig. 13A and B).
- 특히 상피세포는 과도하게 증식하여 내부로 뺏어나가고 있는 양상을 보였으며, 마치 중층편평상피암과 같은 상피세포 증식부 내에 keratin pearl을 형성하기도 하였다 (Fig. 13B).
- 그 외에 표면부의 상피세포는 변성 또는 괴사되어 있었고, 이러한 부위에 염증세포의 침윤도 관찰되었다.
- 유선은 만져보았을 때 경결감을 보였으며, 절단하여 표면부를 관찰한 결과 약간의 황색 고름양 물질이 관찰되었다 (Fig. 13C).
- 조직학적으로 관찰한 결과, 유선의 다수의 선방 내에는 호중구와 괴사된 상피세포가 침윤한 유선염 소견을 보였으며, 특히 대다수의 선방 내에서는 칼슘 결정체의 침착도 관찰되었다 (Fig. 13D).
- 본 증례에서 다발성 농양이 피하뿐만 아니라 전신 장기에 발생하는 것을 관찰하였다.
- 이러한 다발성 농양은 본 증례 외에도 대부분의 염소농가에서 발생하고 있으며, 출하할 때에도 상품성의 저하를 일으키는 등 막대한 경제적 피해를 유발

하고 있다.

- ▣ 본 연구팀에 의해서 야외 염소농가에 대한 역학조사를 수행한 결과, 이러한 다발성 농양은 염소 농가 주위를 둘러싸고 있는 철조망에 염소들이 띄어 넘어려고 할 때나 서로간에 싸움이 발생하였을 때, 창상이 발생하여 생긴 것으로 분석되었다.
- ▣ 이러한 농양 결절은 야외 농가의 사육가들에 의해서 제거하여도 쉽게 치료되는 등 치료에는 문제가 없지만, 내부 장기나 조직에서 발생하였을 경우에는 치료가 매우 어려워 출하할 때까지 잔존하는 경우가 많았다.

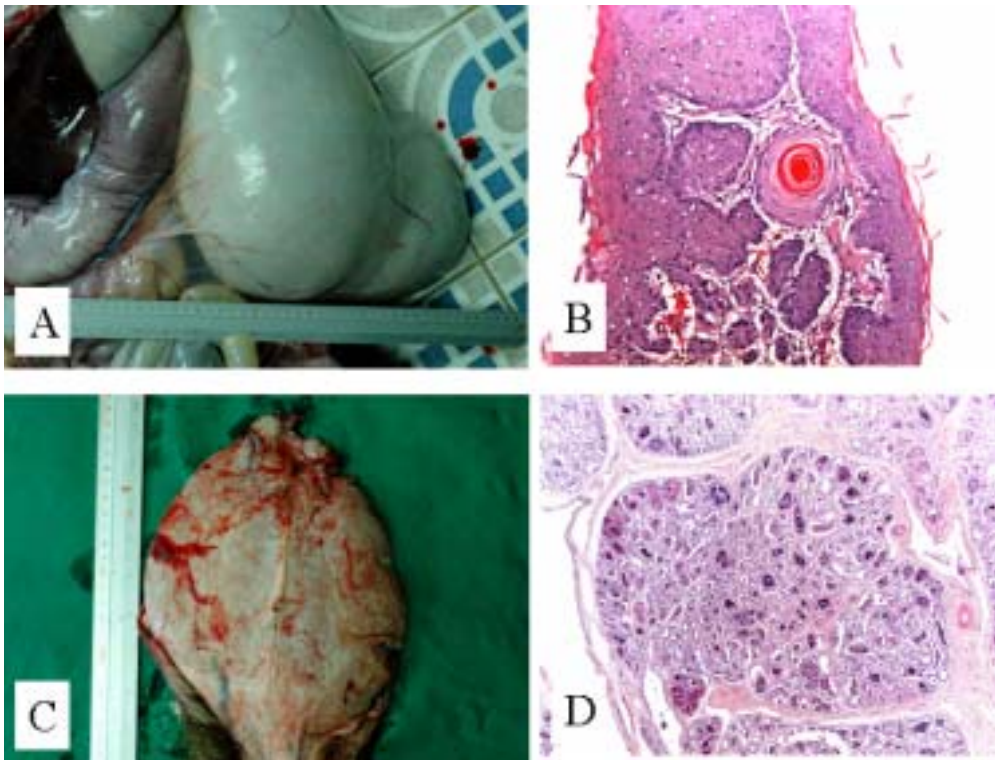


Fig. 13. Goat, stomach and mammary gland. (A) Stomach with nonspecific lesions. (B) Marked epithelial cell hyperplasia invade into submucosa, leading ridge and keratin pearl formations. (C) Mammary gland. (D)

Purulent mastitis with multiple calcium crystals are formed. Fig. 13B and D, H&E stain.

- 이러한 농양병변에서 균 분리를 시도한 결과 어떠한 병원성 세균도 검출되지 않았는데, 이는 아마도 농양결절이 형성된 후 사멸되었던 것으로 사료된다.
- 따라서 본 증례를 예방하기 위해서는 철조망의 높이를 더욱 높여야 하며, 창상이 발생하였을 경우에는 적절한 소독과 항생제의 투여가 필요할 것으로 사료된다.
- 상술한 바와 같이 본 증례에서도 간질성 폐렴이 관찰되었다. 간질성 폐렴의 원인은 여러 가지 원인에 의하지만 상술한 것과 같이 *Retroviridae* 내의 lentivirus가 염소에서 간질성 폐렴을 전 세계적으로 유발하고 있기 때문에 향후 이에 대한 역학조사를 수행할 필요가 있을 것 같다.
- 본 증례에서 국내에서 처음으로 폐충을 관찰하였다.
- 폐충은 *Muellerius capillaris*라는 양과 염소의 폐에 기생하는 기생충으로서, 세계적으로 매우 다발하는 기생충이다.
- 이 기생충은 간혹 결절성 폐충이라고도 불리우는데, 왜냐하면 성충은 폐포의 실질에서 기생하면서 거의 대부분 결절성 육아종성 병변을 일으키기 때문이다.
- 본 충에 감염된 개체는 체중감소와 2차성의 세균성 및 바이러스성 폐렴을 유발한다고 알려져 있다.
- 특히 이 기생충은 육아종성 병변의 주위에 간질성 폐렴을 일으킨다고 알려져 있으며, 병변은 어느 부위에서나 발생할 수 있지만, 특히 뒤쪽엽의 배쪽부위에서 다발한다고 한다.
- 이 기생충이 왜 간질성 폐렴을 유발하고, 왜 이러한 특이 부위에 병변을 일으키는지는 알려져 있지 않다.

- 아마도 이러한 간질성 폐렴은 전 세계적으로 발생하고 있는 상술한 lentivirus에 의한 간질성 폐렴과 연관이 있을 것으로 추정된다고 보고되었다.
- 아미로이드는 균질한 원섬유성 단백질로 비장, 간, 신장에 흔히 침착되며 다량의 아미로이드가 침착될 때 이 장기들은 종대되고 창백해지며 waxy양으로 보인다.
- 아미로이드증은 단백질 대사에 있어서 산재된 세포학적 결함에 의해서 발생하며, 새로운 단백질이 정상적인 과정을 거쳐 합성되지 못하고, 그 대신 펩타이드 단위들이 결집하여 원섬유 (fibrils)를 이루어 발생한다.
- 아미로이드 원섬유는 물리적으로 균질하지만 알부민, 면역글로블린, 인슐린, 성장호르몬, 혈청 아미로이드 A 그리고 염증의 급성기 단백질 같은 다양한 단백질이 비정상적인 펩타이드 분절에 의해서 발생한다.
- 아미로이드증은 병리학적으로 만성 염증, 면역성, 종양성 질병과 관련되어 잘 발생한다고 한다.
- 본 증례에서도 만성화된 여러 가지 질병들이 발생하고 있었던 것을 비추어보면, 본 증례에서 발생한 아미로이드증은 만성 염증에 기인한 것으로 사료된다.
- 본 증례에서는 전위 상피세포의 증식이 특징적으로 관찰되었다. 반추수에서 전위 상피세포의 증식은 대부분 곡물사료의 과비에 의한 것이 많다고 보고되었다.
- 왜냐하면 과도한 곡물사료의 급여는 제1위의 산성증을 유발하고, 결과적으로 증가된 산도에 의해서 전위 상피세포가 손상되기 때문인 것으로 분석되고 있다.
- 따라서 본 증례에서 확인된 바와 같이 앞으로 염소에게 있어서 곡물사료의 과량 투여를 예방할 수 있는 방법을 강구하여 야외 농가에 보급하여야 할 것

으로 사료된다.

6. 증례 6 (Case # 05-155)

- 본 증례는 국내에서 사육중인 젓염소 농가에서 심한 호흡부전을 보인다 폐사한 암컷 젓염소이다.
- 본 증례를 부검 시, 폐는 미만성으로 충혈되어 있었으며 소엽간 중격은 부종에 의해서 확장되어 있었다 (Fig. 14A).

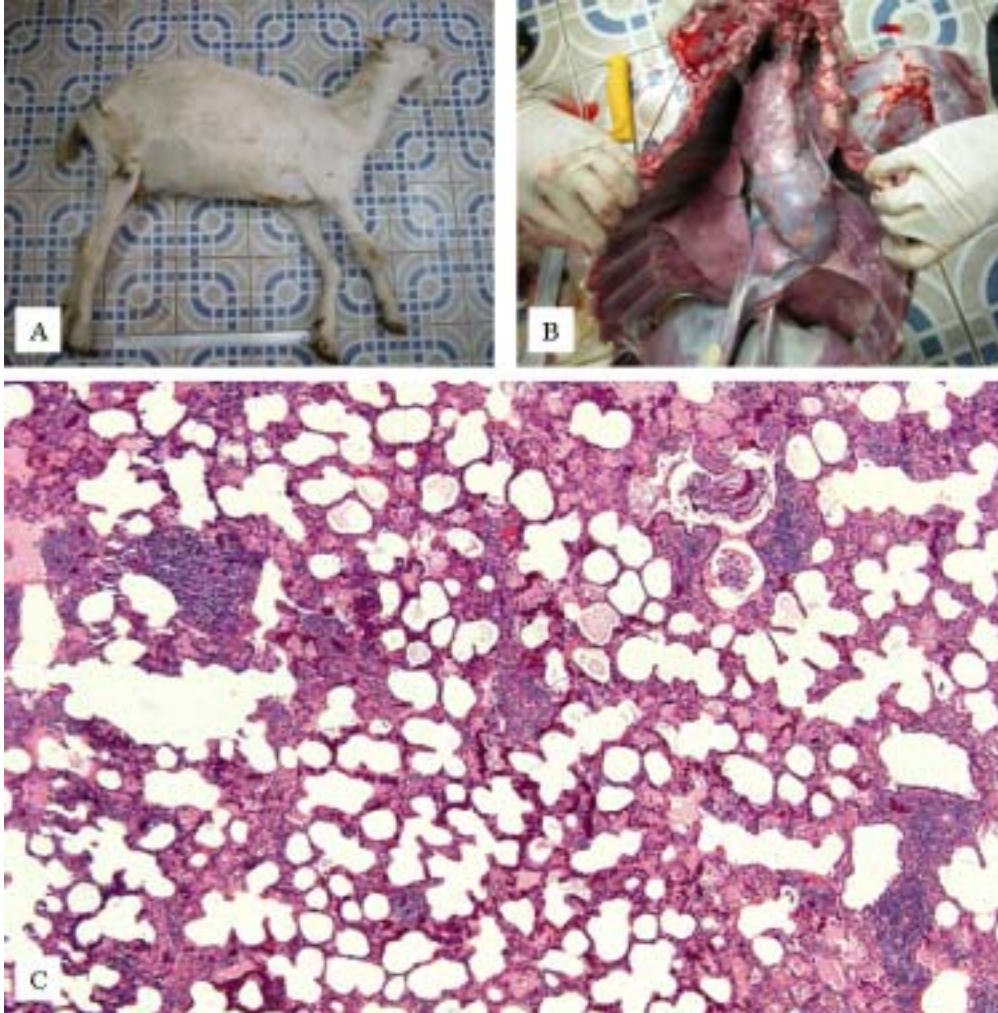


Fig. 14. Goat, lung. (A) Dairy goat carcass. (B) Diffuse congestion and septal edema. (C) Diffuse moderate interstitial pneumonia with lung edema. Note multiple lymphoid cell aggregations. Fig. 14B and C, H&E stain.

▣ 또한 폐에서는 간질성 폐렴의 특징적 소견인 미만성의 고무양 (rubbery appearance) 느낌을 확인할 수 있었으며, 좌측 뒤쪽엽에서 결절성 병변이 관

찰되었다.

- 조직학적으로 폐 병변을 관찰한 결과, 미만성의 간질성 폐렴과 폐 수종이 특징적으로 관찰되었다 (Fig. 14C).
- 또한 부검 시, 결절성 병변이 관찰되었는데, 조직학적으로 관찰한 결과 유두양 선암종 (papillary adenocarcinoma)였다.

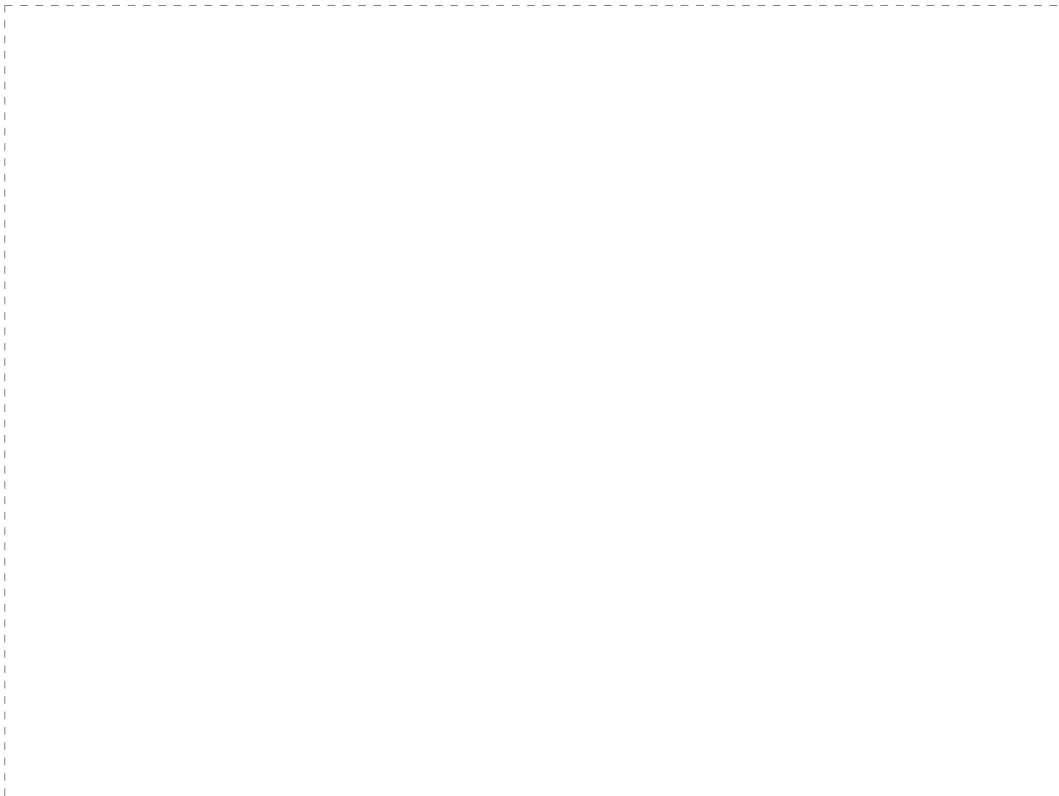


Fig. 15. Goat, lung. Papillary adenocarcinoma. Tumor lesion shows multiple papillary projections which cover with low columnar epithelial cells. Note severe infiltration of neutrophils in the lumens and peripheral lymphoid cell infiltration. H&E stain.

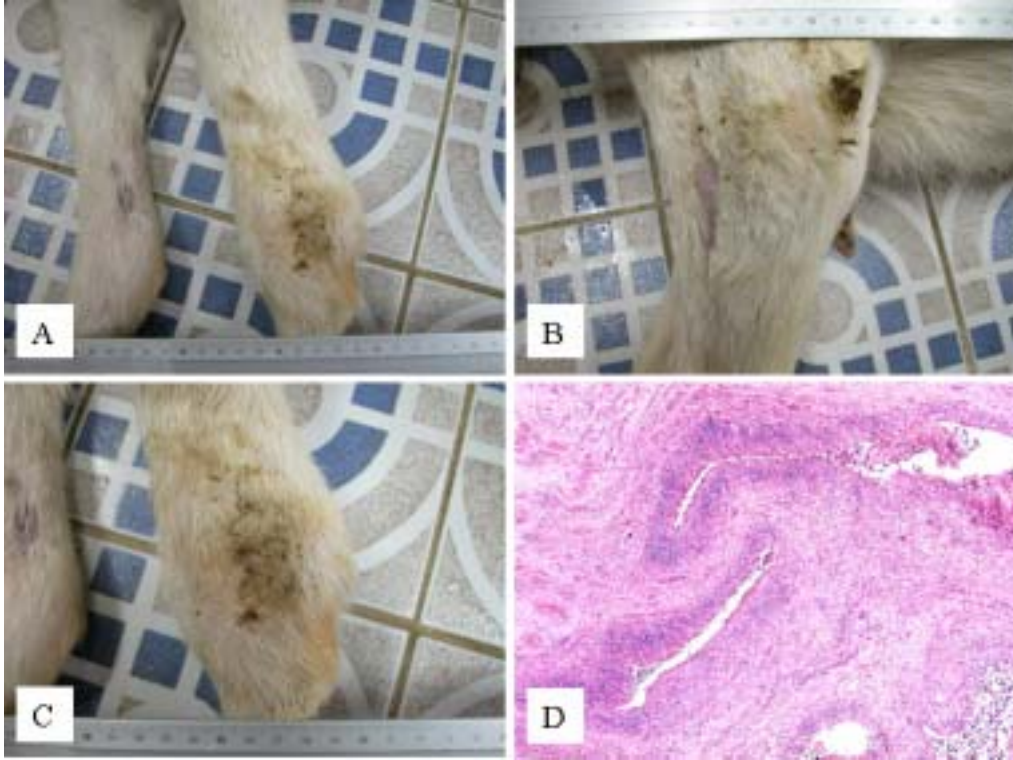


Fig. 16. Goat, joints. (A) Periarticular inflammation around carpal joint. (B) Periarticular inflammation around elbow joint. (C) Magnification of Fig. 16A. (D) Purulent inflammation and hyperplasia of synovial cells. Fig. 16D, H&E stain.

- 이 유두양 선암종 내에는 다수의 유두양 선암종 세포들로 구성되어 있었으며, 선암종 관강 내에는 다수의 염증세포들이 침윤되어 있었다.
- 또한 선암종 병변 내 혹은 주위에는 다수의 림프구양 세포의 결집소 (lymphoid cell aggregation)들이 관찰되었다.
- 또한 다수의 관절 외측면에 염증성 병변이 관찰되었으며, 병변부를 절개하였을 때 염증이 관절관강 내로 파급되어 있었다 (Fig. 16A-C).

- 조직학적으로 관절 관강 내를 관찰한 결과, 활액막 세포의 증식과 화농성 염증세포의 침윤을 관찰할 수 있었다(Fig. 16D).
- 본 증례에서는 특징적으로 제1위 및 소장 장관막 주위에 직경 약 5 cm 크기의 낭포가 3개 관찰되었다 (Fig. 17A and B).
- 조직학적으로 관찰한 결과 낭포는 선상피세포로 피복된 용모양 돌기가 관강 내면을 향하여 있었으며, 용모양 조직 밑에는 두꺼운 결합조직으로 구성되어 있었다 (Fig. 17C).
- 또한 이러한 결합조직의 중심부에도 도관양 조직도 관찰되었다 (Fig. 17C).
- 상술한 증례에서 관찰된 바와 같이 본 증례에서도 만성염증에 의한 아밀로이드 침착이 간의 디세간극, 비장의 백수 주위에서 관찰되었다 (Fig. 18A).
- 신장에서는 단백질양 물질들이 보우만씨강 내와 세뇨관 강 내에서 관찰되었지만, 사구체에서는 사구체 신염을 비롯하여 어떤 특징적인 병변도 관찰되지 않았다 (Fig. 18B).
- 따라서 이는 사람에서 보고된 minimal change glomerulonephritis와 매우 유사하였다.
- 또한 본 증례에서는 심장 내막이 두꺼운 섬유결합조직으로 둘러싸여 있었는데, 이는 아마도 endocardial fibrosis 혹은 restricted cardiomyopathy일 것으로 추정된다 (Fig. 18C).
- 또한 본 증례의 전위에서는 상술한 증례와 유사하게 곡류 사료의 과비에 의한 것으로 사료되는 전위 상피세포의 증식, 변성 및 괴사, 염증세포 침윤이 관찰되었다 (Fig. 18D).
- 본 증례의 특징적인 병변은 폐에서 관찰된 유두양 선암종이라 할 수 있다.
- 본 증례가 다자란 염소에서 발생하여, 본 증례의 폐에서 관찰된 유두양 선암종이 자연발생적일 가능성도 있다.
- 하지만 양과 염소에서는 전염성의 폐 선암종이 발생하고 있으며, 이의 원인은

type B/D retrovirus로 알려져 있다.

- 이 바이러스에 의해서 발생하는 폐의 선암종은 low grade carcinoma를 유발하기 때문에 현재는 pulmonary carcinomatosis라고 부른다.
- Pulmonary carcinomatosis는 양을 기르는 모든 국가에서 발생하고 있다고 보고되었으며, 특히 과밀 사육하는 지역에서 공기전파에 의해서 발생한다고 한다.
- Retrovirus에 의해 발생하는 pulmonary carcinomatosis는 국내에서는 아직 발생보고가 없으며, 따라서 국내에서도 이에 대한 자세한 역학조사를 수행하여야 할 것으로 사료된다.
- 본 증례에서도 간질성 폐렴이 관찰되었다. 따라서 이러한 결과는 앞에서 기술한 증례 3번과 5번과 같이 *Retroviridae* 내의 lentivirus에 의해서 유발될 가능성이 높다는 것을 시사하고 있다. 따라서 향후 이에 대한 자세한 역학조사와 원인체 검출이 수반되어야 할 것으로 사료된다.

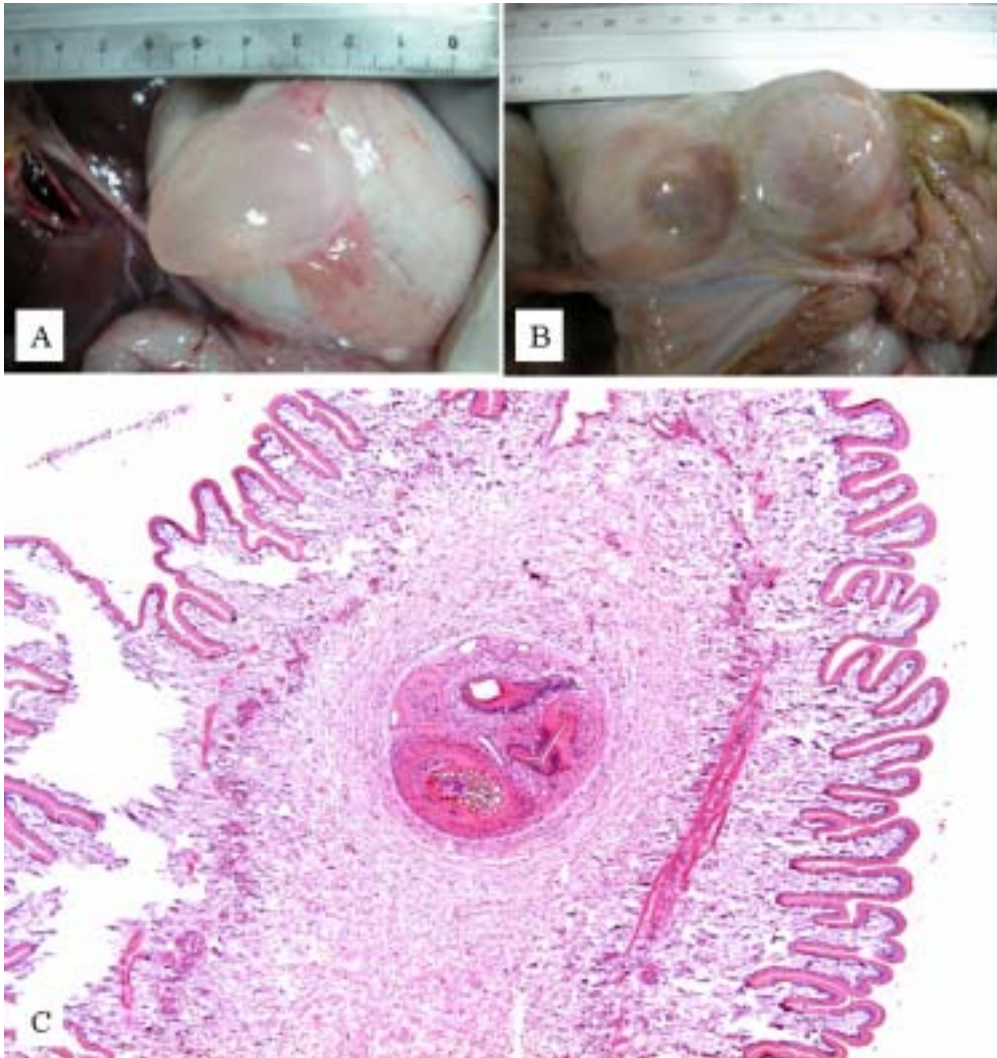


Fig. 17. Goat, rumen and mesentery. (A) Single translucent cyst measuring 5 cm in diameter is attached to serosal surface of rumen. (B) Two cysts (4 and 5 cm in diameter, respectively) are attached to the mesentery. (C) Cyst lined with cuboidal epithelial cells bulging up villi like structure. Inner connective tissues contain duct like structure. Fig. 17C, H&E stain.

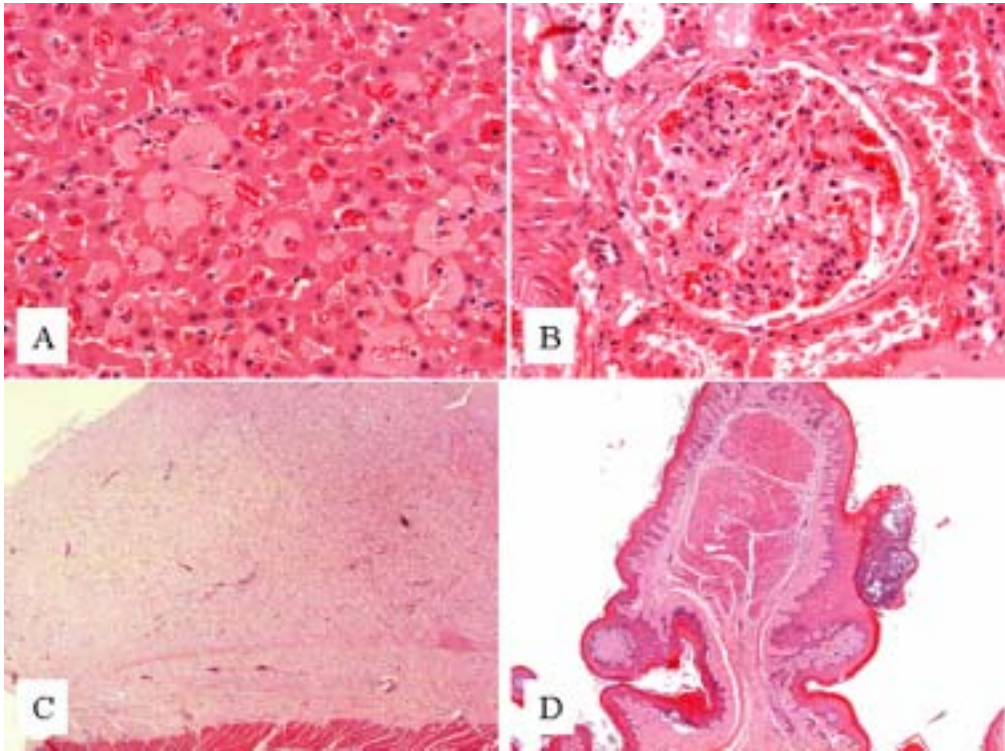


Fig. 18. Goat, liver, kidney, heart, rumen. (A) Severe deposition of amyloid in the Disses's space, leading hepatocyte atrophy. (B) Severe leakage of eosinophilic protaneous materials in the Bouman's space and the lumen of tubules. Note minimal change of glomerulus. (C) Endocardium is markedly thickened by fibrose tissue. (D) Diffuse mild hyperplasia with a pustule is observed in the rumen. Fig. 18A-D, H&E stain.

3. 염소 가검물에서 보더병 바이러스 분리

가. 보더병 바이러스 표준주의 세포증식능 확인을 통한 표준주 및 세포주 선발

- ▣ 보더병 바이러스의 분리를 위한 실험으로 Aveyron strain을 BGFL(black goat fetal lung) cell과 MDBK cell에 접종하여 그 증식성을 살펴본 결과 각각 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml 이상 증식한 것을 확인하였다 (Fig. 1B).
- ▣ Merial사의 IRO4세포에 보더병 바이러스 접종한 결과 BGFL 세포에서보다 낮은 증식성을 보였다.
- ▣ 따라서 보더병 바이러스를 특이적으로 분리할 수 있다고 알려진 BGFL cell을 이용하여 보더병 바이러스 분리를 시도하였다.

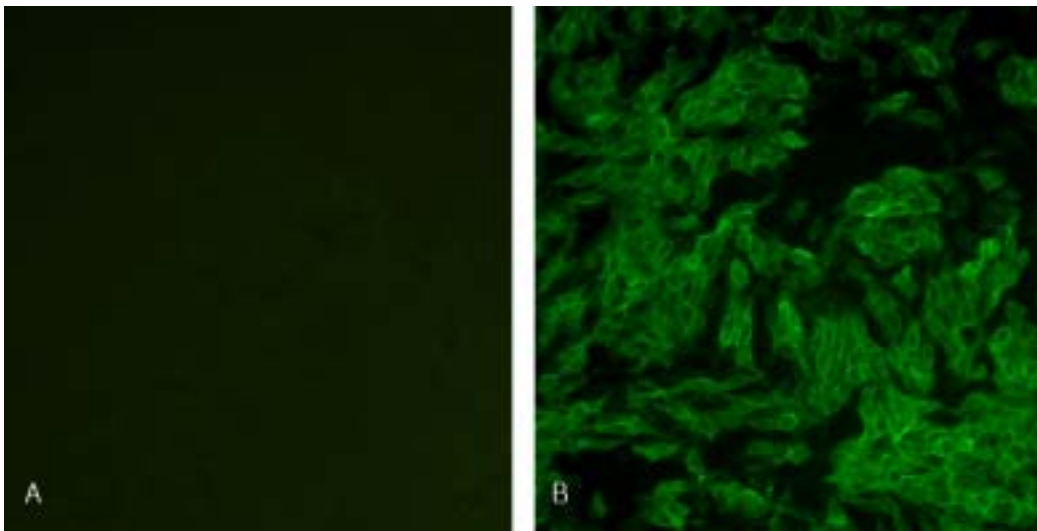


Fig. 1. (A) Mock inoculated MDBK cell. No positive signals are observed. (B) Aveyron strain-inoculated MDBK cells show strong positive reaction in the cytoplasm.

나. 보더병 바이러스 분리

- 제1차년도에는 흔들병 발생경력이 있는 13개 농장과 22개 염소에서 혈액과 분변을 보더병 분리를 위하여 사용하였다.
- 제2차년도에는 보더병 바이러스의 분리를 위하여 충청북도 충주지역에서 34개 농장으로부터 수집한 102두의 염소 비장과 신장조직을 유제하여 MDBK와 BGFL cell에 접종하였다.
- 하지만 이러한 가검물을 이용하여 blind passage를 다수 실시하였음에도 불구하고, 특이적인 세포변성효과가 나타난 증례를 확인할 수 없었다.
- 따라서 조직배양세포에서 특이적인 세포변성 효과를 나타내지 않는 보더병 바이러스가 감염될 가능성도 있기 때문에, 이러한 배양세포에 보더병 특이적 단클론 항체를 사용하여 형광항체법을 이용한 실험을 수행하였지만, 어떤 특이적인 양성 형광반응도 관찰할 수 없었다.
- 최종적으로 세포배양액에 다음에 기술할 보더병 바이러스 검출 정밀 진단법인 RT-PCR을 이용하여 적용한 결과 모두 음성이었다.
- 또한 2차년도에는 보더병 바이러스에 대한 항체 양성을 나타낸 18농가의 혈액재료와 병성감정으로 접수된 조직, 만성 소모성 바이러스성 질병에 의심되는 농장의 비즙 및 설사시료를 대상으로 BGFL세포, MDBK cell에서 바이러스 분리를 시도한 결과, 보더병 바이러스의 증식을 확인 할 수 없었다.

■ 더욱이 5-15일령의 어린 염소에서 허약증세, 호흡기 및 설사를 일으키며 약 50%의 폐사율을 나타내는 농장의 혈청을 이용하여 보더병 바이러스에 대한 항원 및 항체검사를 실시한 결과 보더병 바이러스에 대한 양성반응은 확인할 수 없었지만, 본 연구에서 수행한 기타 7종의 바이러스 중에서 Parainfluenza 3 바이러스에 대한 항체가 모축과 자축 모두에서 검출되었다.

Table 1. Summary of region, samples, virus isolation and diagnosis

Region	Sample kinds and number	Virus isolation		Remarks
		MDBK cell	BGFL cell	
Gyeonggi Incheon	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV
Chungbuk Chungju	Spleen, 102	-	-	
Chungbuk Jinchun	Tissue 2, Feces 1	-	-	
Chungbuk Yongnam	Blood, 16	-	-	Arthritis
Chungnam Buyeo	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV
Chungnam Yesan	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV
Jeonbuk Sunchang	Blood, 3	-	-	Serum positive for BDV
Jeonbuk Sunchang	Blood, 6	-	-	Serum positive for BDV
Jeonbuk Sunchang	Blood 11, Feces 4, Nasal swab, 8	-	-	<i>E. coli</i> isolated
Jeonbuk Namwon	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV
Jeonbuk Namwon	Blood, 21	-	-	
Jeonbuk Changsu	Blood, 8	-	-	
Jeonbuk Changsu	Blood, 7	-	-	
Jeonbuk Changsu	Blood, 5	-	-	
Jeonbuk Changsu	Blood, 7	-	-	
Jeonbuk Changsu	Blood, 7	-	-	
Jeonnam Damyang	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV
Jeonnam Hwasun	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV
Jeonnam	Blood, 4	-	-	Serum positive for BDV

Yongkwang				
Jeonnam Kohueng	Blood, 18	-	-	Serum positive for BDV
Jeonnam Sunchun	Blood, 5	-	-	Serum positive for BDV
Jeonnam Hampyung	Blood, 12	-	-	Abortion
Gyeongbuk Munkyeong	Blood, 20	-	-	Serum positive for BDV
Gyeongbuk Sangju	Tissue, 2	-	-	
Gyeongnam Haman	Blood, 17	-	-	Serum positive for BDV
Gyeongnam Kimhae	Blood, 3	-	-	Serum positive for BDV
Gyeongnam Changwon	Blood, 5	-	-	Serum positive for BDV
Gyeongnam Kimhae	Blood, 6	-	-	Serum positive for BDV
Total	Blood: 195, Tissue: 106, Feces:5, Nasal swab: 8			

4. 염소 Pestivirus 내의 보더병 및 보더병양 질병의 감별진단을 위한 신속·정확한 최첨단의 진단법 개발

가. One Step RT-PCR, nested PCR 및 Real-Time RT-PCR 기법의 개발

- ▣ 상술한 바와 같이 국내 염소 농가에서는 보더병 혹은 보더병양 질병들이 발생하고 있어서 막대한 경제적 손실이 발생하고 있다.
- ▣ 또한 혈청검사에 의해서도 보더병 혹은 보더병양 질병을 유발하는 바이러스들의 항원을 이용하여 ELISA나 혈청중화항체검사법으로 검사한 결과 이러한 바이러스들에 대하여 양성 반응을 확인할 수 있었다.
- ▣ 하지만 이러한 혈청검사의 한계점은 보더병 혹은 보더병양 질병을 일으킬 수 있는 Pestivirus 내의 bovine viral diarrhea virus type 1 및 2, border disease virus, classical swine fever virus 4종의 바이러스가 서로 교차반

응을 일으킨다는 점이다.

- 비록 이들 4종 바이러스에 대한 혈청가 검사에서 bovine viral diarrhea virus에 대한 항체가 border disease virus나 classical swine fever virus에 비해서 높게 나와, 검사에 사용한 혈청 내에서 bovine viral diarrhea virus가 감염되었을 가능성은 높지만, 확실히 border disease virus나 classical swine fever virus에 의한 항체가 아님을 배제하기 위해서는 정밀 진단법의 개발이 필요하였다.
- 먼저 RT-PCR 기법을 개발하기 위하여 primer pairs의 선정을 하였다 (Table 1 and Fig. 1).
- Primer pairs는 Pestivirus genome 내에서도 질병마다 보존성이 높다는 5'-NCR 부위에서 선정하였다.
- 또한 border disease virus (BDV)는 소에서 발생하는 bovine viral diarrhea/Mucosal disease virus (BVDV)와 아주 유사하여 염소와 소 사이에서 이 두 질병이 교차감염하기 때문에 BVD와 감별할 수 있는 primer pairs를 개발하였다.

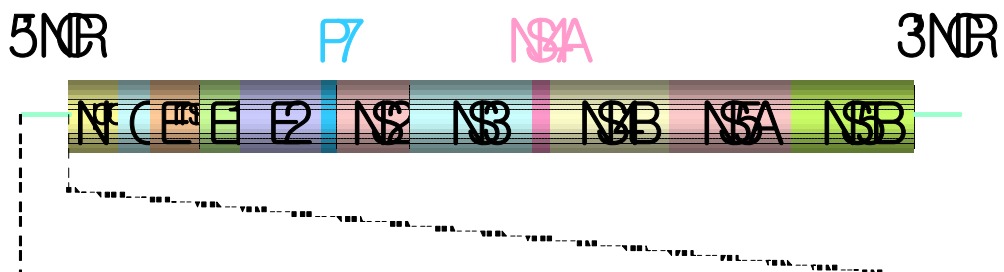


Fig. 1. Genomic structures of pestivirus. Primer pairs are designed from 5' NCR region. Using these primer pairs, border disease virus and bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus can be differentiated.

Table 1. Primer sequence for the amplification of border disease and bovine viral diarrhoea and mucosal disease viruses

Primers	Sequence	Region
V324	ATGCCCWTAGTAGGACTAGCA	108-395
V326	TCAACTCCATGTGCCATGTAC	
A11	AGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCG	169-381
A14	CAACTCCATGTGCCATGTACAGCAG	
pBD1	TCGTGGTGAGATCCCTGAG	136-361
pBD2	GCAGAGATTTTTTATACTAGCCTATRC	
RB21	CGACACTCCATTAGTTGAGG	75-191
RB22	GTCCATAACGCCACGAATAG	

- 이상의 primer pairs를 이용하여 Reverse Transcription을 55℃에서 10 분간 수행하였고, primary heating을 95℃에서 30초가 수행하였다.
- 그 후 PCR cycle을 95℃ 1분, 58℃에서 30초, 72℃에서 10초간 총 30 cycles을 수행하였다.
- 또한 그림과 같이 V324와 V326으로 RT-PCR을 수행 후 증폭이 되지 않았을 경우에는 각각의 primer pair로 nested PCR을 수행하였다.
- 이상의 primer pairs로 RT-PCR과 nested PCR을 Pestivirus 내의 bovine viral diarrhea virus, border disease virus, classical swine fever virus의 표준주를 이용한 검사에서 각각의 바이러스에 특이적인 양성의 증폭 산물을 확인할 수 있었다. 또한 대조군으로 사용한 Rabies Virus (ERA)는 증폭되지 않았다.
- 즉 본 연구를 통해 개발한 보더병 및 보더병양 질병의 원인체들을 검출하기 위한 RT-PCR 및 nested PCR은 이들 질병들에 대하여 특이도와 정확도가 높음을 알 수 있었다.
- 보더병 및 보더병양 질병들을 신속·정확하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라 정량적으로 검사할 수 있는 Real-Time RT-PCR 기법은 비교적 시험 비용이 저렴한 SYBR Green method를 이용하여 pestivirus 전체 및 Border virus에 대한 screening test에 활용하고, Probe hybridization method를 이용하여 수립하였다.
- 즉 SYBR Green Methods에 사용될 primer pairs로는 다음과 같다 (Fig. 2).
- V324 & V326 은 Pestivirus-common이며 pBD1 & pBD2은 Border Disease

virus specific한 primer pair이다.

- 모든 probe는 V324와V326 primer의 증폭부위에서 가장 중간차별성이 뛰어나면서도 변이도가 적은 부위를 찾아서 선발하였다.

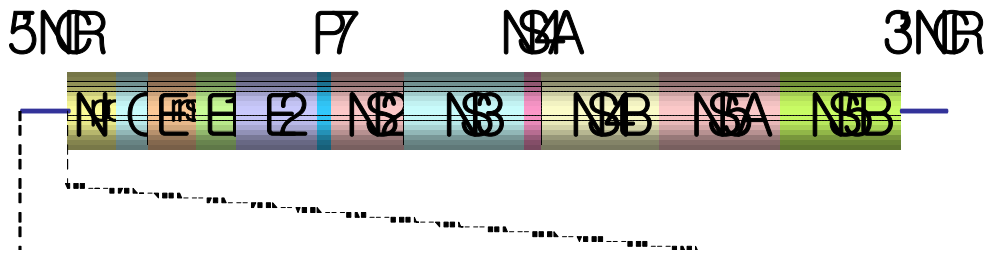


Fig. 2. Development of real-time RT-PCR for the detection of border disease virus. Primer pair and probe are designed from 5'-NCR located at the 5' terminal of border disease virus.

- 이상 개발한 real-time RT-PCR 기법을 확립하기 위하여 다음의 바이러스를 표준주로 사용하였다.
- 즉 Border Disease virus (Averyon, Lyon)-CNEVA alford, Bovine Viral Diarrhea virus (NADL), Classical Swine Fever virus (ROM)을 표준주로 사용하였으며, 대조군으로는 Rabies Virus (ERA)을 사용하였다.
- Fig. 3.과 같이 V324 & V326 primer를 이용한 Primer 조건 설정 실험에서 Pestiviurs속에 속하는 모든 바이러스 즉, BD-Averyon과 BD-Lyon, BVDV, CSFV 등 3종의 바이러스는 Ct Value가 BD는 15, BVDV는 22, CSF는25로 나

타났으며, NTC와 ERA는 30 cycles 이후에서 non specific한 것으로 추정되는 signal의 검출을 확인하였다.

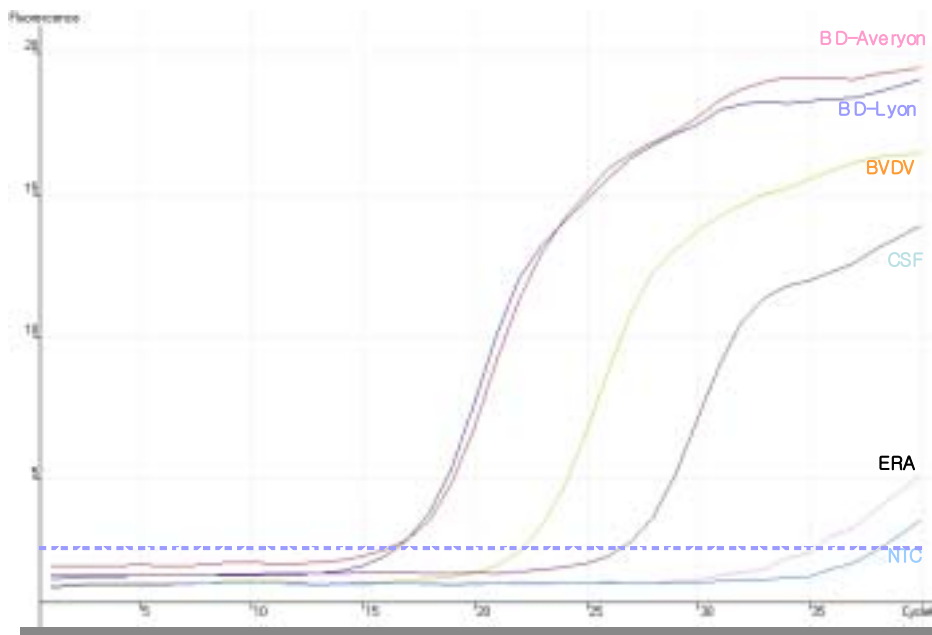


Fig. 3. Primer pair, V324 and V326 amplify all virus belonging to Pestivirus including BD-Averyon, BD-Lyon, BVDV and CSFV. The Ct Value is as follows; BD=1; BVDV=22; CSF=25; NTC and ERA = non-specific signaling is detected after 30 cycles.

■ Melting analysis를 통해 각각의 증폭산물의 melting temperature를 측정할 결

과 BDV, BVDV, CSFV 모두 약 85의 T_m value를 보여 거의 동일한 산물이 생산되었음을 추정할 수 있었다.

- 또한 ERA와 NTC는 약 75의 T_m value를 보였는데, 이는 일반적으로 amplicon의 T_m이 80 이상을 보이기 때문에 primer dimer로 추정하였다 (Fig. 4).

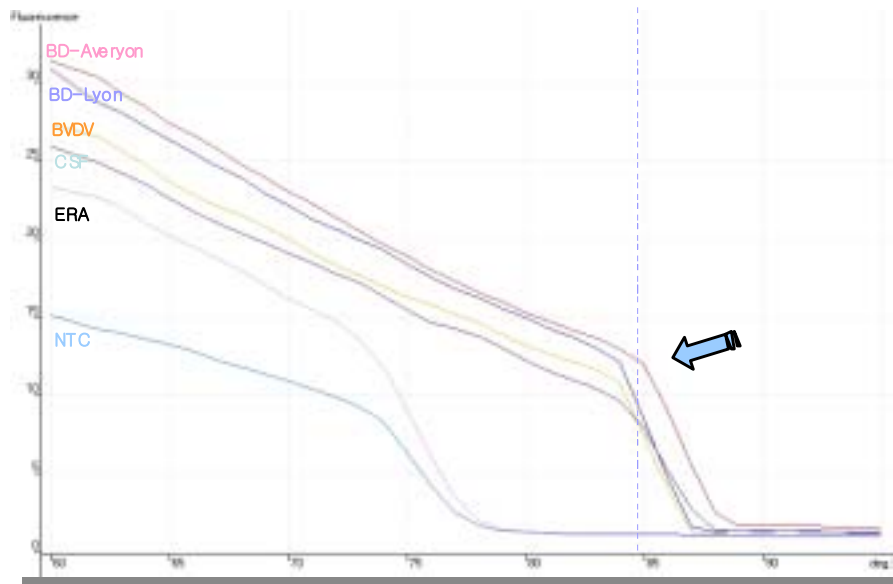


Fig. 4. Melting temperature of BDV, BVDV and CSFV by melting analysis are 85 T_m value, indicating same products are amplified. However, ERA and NTC are 75, indicating amplified products seem to be primer dimer.

- 이러한 증폭된 산물을 gel electrophoresis를 통해 amplicon의 사이즈를 확인한 결과, 3종의 바이러스 모두 약 288 bp의 뚜렷한 밴드를 보여 모두 증폭이 이루어졌다.

어짐을 알 수 있었고 NTC와 ERA는 증폭산물이 없었다 (Fig. 5).

- 따라서 대조군에서는 미약한 수준의 primer dimer가 생산이 되어 30 cycles 이후에서 미약한 signal의 검출되었지만 Tm 값이 약 75로 85의 amplicon과는 10 이상의 확연히 다른 Tm을 보임으로서 증폭의 유무를 확인하는데 문제가 없음을 확인하였다.

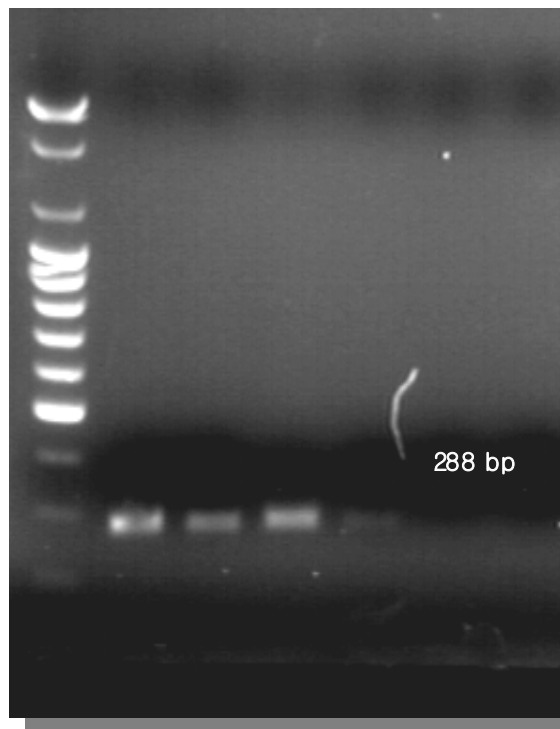


Fig. 5. Real-time RT-PCR results using the reference strains. Primer pair designed amplifies BDV, BVDV and CSFV (lanes 2-4) and expected band, 288 bp, is detected. NTC and ERA are not amplified with this primer pair.

- 또한 BDV-specific primer set인 pBD1 & pBD2를 이용하여 real-time RT-PCR을 수행한 결과 Averyon주와 Lyon주 모두 각각 Cp value가 15 및 20으로 나타났으며, 같은 pestivirus 속이지만 다른 바이러스인 BVDV, CSFV 및 이종의 바이러스인 rabies virus와 NTC에서는 증폭이 약 35 cycles 이후에 나타났다 (Fig. 6).

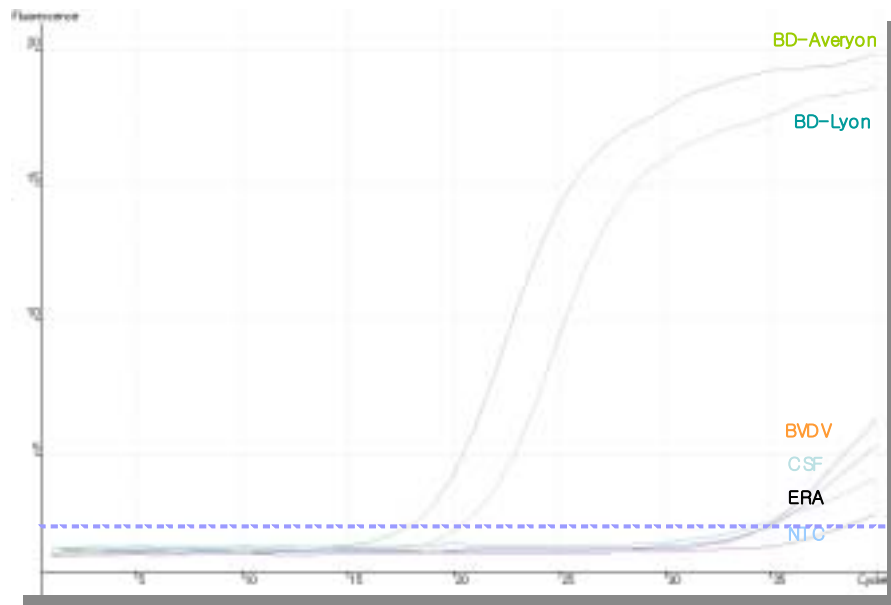


Fig. 6. Border disease virus (BDV) specific primer pair, pBD1 and pBD2, amplify BDV strains Averyon and Lyon at Cp value 15 and 20, but BVDV and CSFV, and rabies virus and NTC at 35 Cp.

- Melting analysis를 수행한 결과 BDV인 averyon과 lyon 모두 약 85의 Tm값을

보였으나 다른 바이러스 및 NTC는 약 70 근처의 T_m 값을 보여 primer dimer로 추정하였다 (Fig. 7).

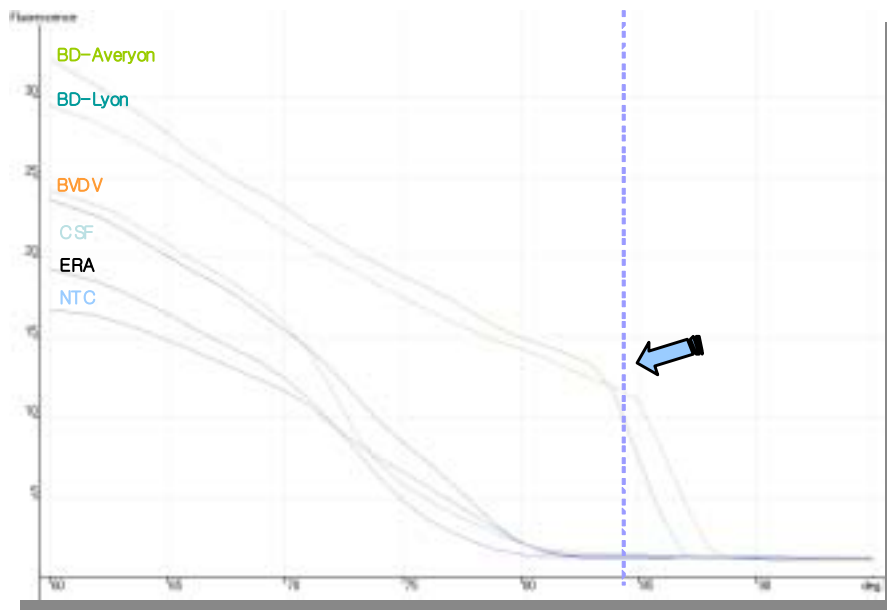


Fig. 7. Melting temperature of border disease virus (BDV) strains Averyon and Lyon are 85 T_m value, meaning same products are amplified. However, ERA and NTC are 75, indicating amplified products seem to be primer dimer.

■ 이러한 증폭 산물을 Gel electrophoresis로 확인한 결과 BDV는 약 225 bp의 amplicon을 확인할 수 있었고, 나머지는 검출이 되지 않아 primer dimer로 결론지었다 (Fig. 8).

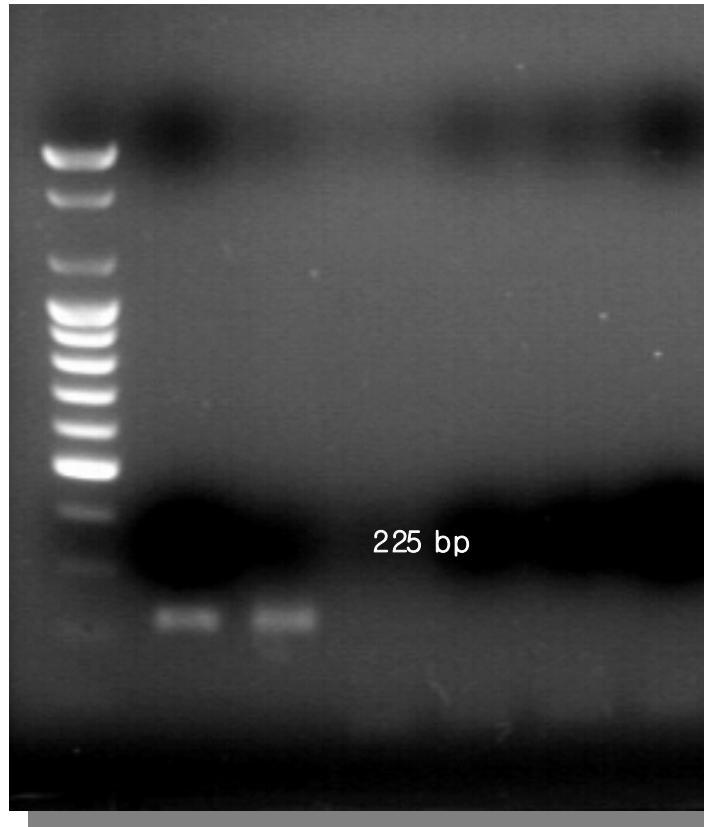
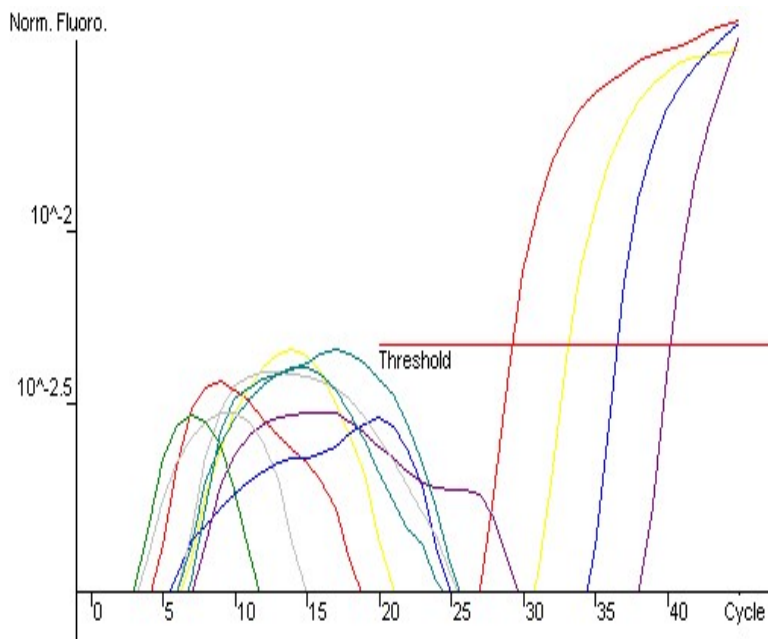


Fig. 8. Real-time RT-PCR results using the border disease virus reference strains. Primer pair designed amplifies BDV strains Averyon and Lyon (lanes 2 and 3) but not the other viruses even in same genus, BVDV and CSFV (lanes 4-5).

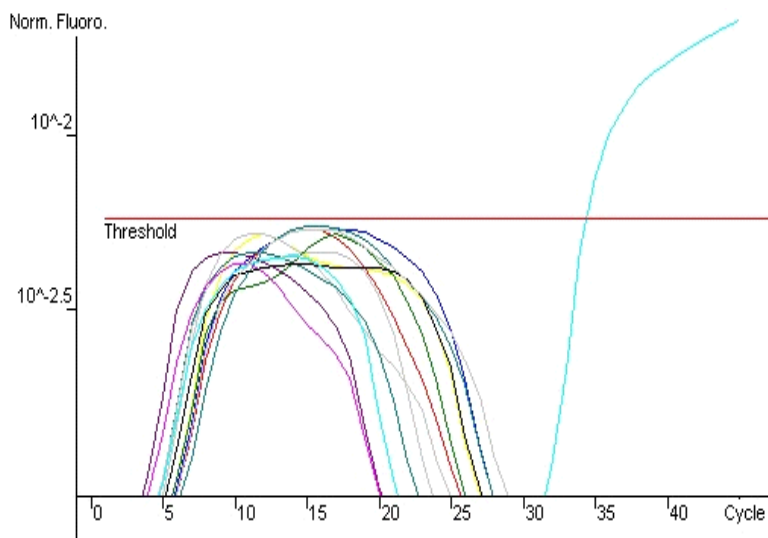
- ▣ 또한 real-time RT-PCR의 민감도를 검사하기 위해서 Aveyron strain에서 증식한 BDV를 10배수 계단희석하여 real-time RT-PCR에서 검출한계를 확인하

있던 바 10^2 TCID₅₀/ml까지 검출할 수 있었다 (Fig. 9A). 또한 보더병 의심시료를 대상으로 real-time RT-PCR을 적용하였던바 양성시료에서만 특이적인 반응을 확인 할 수 있었다 (Fig. 9B).

A.



B.



B

Fig. 9. Sensitivity of real-time RT-PCR against the BDV (A) and application of field samples (B).

▣ 이상의 결과를 종합하면, V324 & V326 primer set (PanR 및 PanF primer pair)는 Pestivirus 전체의 감염여부를 확인하는데 있어 탁월하며, pBD1 & pBD2 primer set는 Border Disease Virus에 특이적임을 확인 할 수 있었다.

5. 신속·정확한 최첨단 진단법을 이용한 국내 염소 농가에서 보더

병양 질병의 검출

가. RT-PCR, nested PCR 및 Real-Time RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus의 검출

- 국내에서 사육중인 염소 농가에서 Pestivirus 내의 border disease virus, bovine viral diarrhea virus type 1과 2, classical swine fever virus의 발생여부를 검사하기 위하여 다음과 같은 가검물을 사용하였다.
- 즉 본 사업연도가 시작되기 전인 1999년도부터 2004년도까지 수의과학검역원에 의뢰된 염소 분변 및 병성감정 의뢰된 조직에서 채취한 조직가검물을 pestivirus 검출을 위해서 사용하였다.
- 본 사업이 시작된 2004년도 (제1차년도)에는 35개 야외 염소농장에서 채취한 혈액 재료 53두분과 조직 3두분을, 제2차년도에는 전국 223개 농가의 1,142두분의 혈액과 충청북도 충주지역에서 34개 농장으로부터 수집한 102두의 염소 비장과 신장조직을 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다.
- 또한 2차년도에는 병성감정으로 접수된 조직, 만성 소모성 바이러스성 질병에 의심되는 농장의 비즙 및 설사시료를 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다.
- 더욱이 5-15일령의 어린 염소에서 허약증세, 호흡기 및 설사를 일으키며 약 50%의 폐사율을 나타내는 농장의 혈청을 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용

하여 pestivirus 검출을 시도하였다.

- 그 결과 pestivirus에 속하는 4가지 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 PanF 및 PanR primer pair를 이용한 RT-PCR에서 총 7두의 염소 가검물에서 양성 반응을 확인할 수 있었다 (Fig 1).



Fig. 1. RT-PCR results with primer pair which can amplify pan-pestiviruses. M; 100 bp marker. Lanes 1-13; field goat samples. Lane +; border disease virus. Lane -; mock sample.

- 이러한 가검물을 border disease virus에 특이적인 primer pair와 classical swine fever virus에 특이적인 primer pair를 이용한 각각의 RT-PCR을 수행한 결과 모두 음성이었다.
- 하지만 bovine viral disease virus에 특이적인 primer pair를 이용한 RT-PCR을 수행한 결과 모두 양성이었다.
- 따라서 국내에서 발생하고 있는 흔들병의 원인체는 bovine viral diarrhea virus라고 잠정적으로 진단할 수 있었다.

- 이러한 추론은 국내 염소 농가에서 채취한 다수의 혈청 가검물에서 보더병 진단용 ELISA kit에서 1) 보더병 양성의 반응을 확인하였고, 2) 하지만 이러한 양성의 반응은 pestivirus 내의 4가지 바이러스 항원과 교차반응을 하기 때문에, 3) 이러한 양성의 반응이 진성의 보더병 양성인지 아니면 그 외의 3가지 바이러스에 의한 교차반응인지 확증하기 어렵기 때문에, 4) pestivirus 내의 4가지 바이러스에 대한 항원을 이용하여, 보더병 ELISA kit에 양성 반응을 보인 혈청을 이용하여 중화항체검사를 실시한 결과 모두 bovine viral diarrhea virus만이 강한 양성의 반응을 확인할 수 있었기 때문에, 5) 결론적으로 RT-PCR 결과와 중화항체검사결과를 바탕으로 국내에서 발생하고 있는 염소의 혼들병은 bovine viral diarrhea virus에 의한 가성 보더병이라고 결론을 내리게 되었다.

6. 국내 염소 농가에서 발생하고 있는 Pestivirus의 분자역학 규명

- 가. 본 사업년도 전에 염소 농가에서 발생한 보더병 바이러스의 분자역학 규명
 - 본 사업을 시작하게 된 동기는 1998년도부터 심한 설사, 운동장애, 악액질, 생후 2주령 이내 새끼 염소의 높은 폐사, 높은 유산과 조산을 특징으로 하는 보더병 유사 질병이 국내 염소농가에서 다발하여 막대한 경제적 피해를 유발하였기 때문이었다.
 - 따라서 본 사업년도 이전에 수의과학검역원에 의뢰된 가검물에 대하여도 보더병 바이러스에 대한 분자역학규명을 시도하였다.

- 본 절에서는 분자역학을 규명하기 위한 여러 가지 단계에 대하여 자세히 기술함으로써 향후 본 질병에 대한 연구를 수행하려는 연구자들에게 도움을 주고자 한다.
- 1999년 4월 28일 전남지방 1700두 염소 농가에서 심한 설사, 운동장애, 악액질, 생후 2주령 이내 새끼 염소의 폐사, 높은 유산과 조산을 특징으로 하는 보더병 임상증상과 유사한 질병이 총 600두에서 발생하여 이중 500여두가 폐사하였다.
- 본 농장에서 총 3두의 자축과 2두의 모축이 수의과학검역원에 의뢰되어 부검을 실시하여 병변을 확인한 결과, 어떠한 육안적 병변은 관찰되지 않았다.
- 또한 조직학적 검사를 실시한 결과 오직 회장의 Payer's patch에서만 림프구 결손이 관찰되었고, 그 외의 특이한 병변은 관찰되지 않았다.
- 또한 세균학적 검사나 기생충학적 검사를 실시한 결과 어떤 특이한 결과도 얻을 수 없었다.
- Border disease virus Lyon2 strain을 이용하여 본 농가에서 채취한 혈청을 대상으로 중화항체가 시험을 수행한 결과 혈청가가 1:4에서 1:8이었다.
- 따라서 pan-pestivirus, border disease virus, bovine viral diarrhea virus type 1에 특이적인 primer pair를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 pan-pestivirus 및 border disease virus에 대해서는 양성이었지만, bovine viral diarrhea virus type 1에 대해서는 음성이었다.
- 따라서 상술한 black goat feal lung (BGFL) primary cell를 이용하여 부검

시 채취한 뇌, 장, 신장, 간장, 폐, 비장, 위 조직을 분쇄한 것을 접종하여 바이러스 분리를 시도하였다.

■ 그 결과 분리된 바이러스는 연속 계대배양에서 세포변성효과를 보이지 않았다.

■ 또한 반추류에서 유행하고 있는 전염성 소 비기관염, 아까바네병, 아이노바이러스 감염증, 이바라기병과 같은 호흡기 및 번식기 질환에 대한 검사를 형광항체법과 혈청중화항체법으로 검사한 결과 채취한 혈청, 조직, 분리한 바이러스는 모두 음성이었다.

■ 또한 채취한 분변 가검물에 대하여 negative staining을 한 후 전자현미경으로 관찰한 결과, 특이적인 바이러스 입자는 관찰되지 않았다.

■ 따라서 본 증례를 임상증상, 염소에서 발생하였던 점, 그리고 실험실 검사결과를 바탕으로 보더병에 의한 것으로 분류하였다.

■ 하지만 이러한 분류에 대한 면밀한 검토를 수행한 결과, RT-PCR에 의한 보더병 양성반응은 위양성 반응으로 교정하였는데, 그 이유는 초기에 사용한 보더병에 특이적으로 생각된 primer pair가 bovine viral diarrhea virus type 2도 증폭할 수 있기 때문이었다.

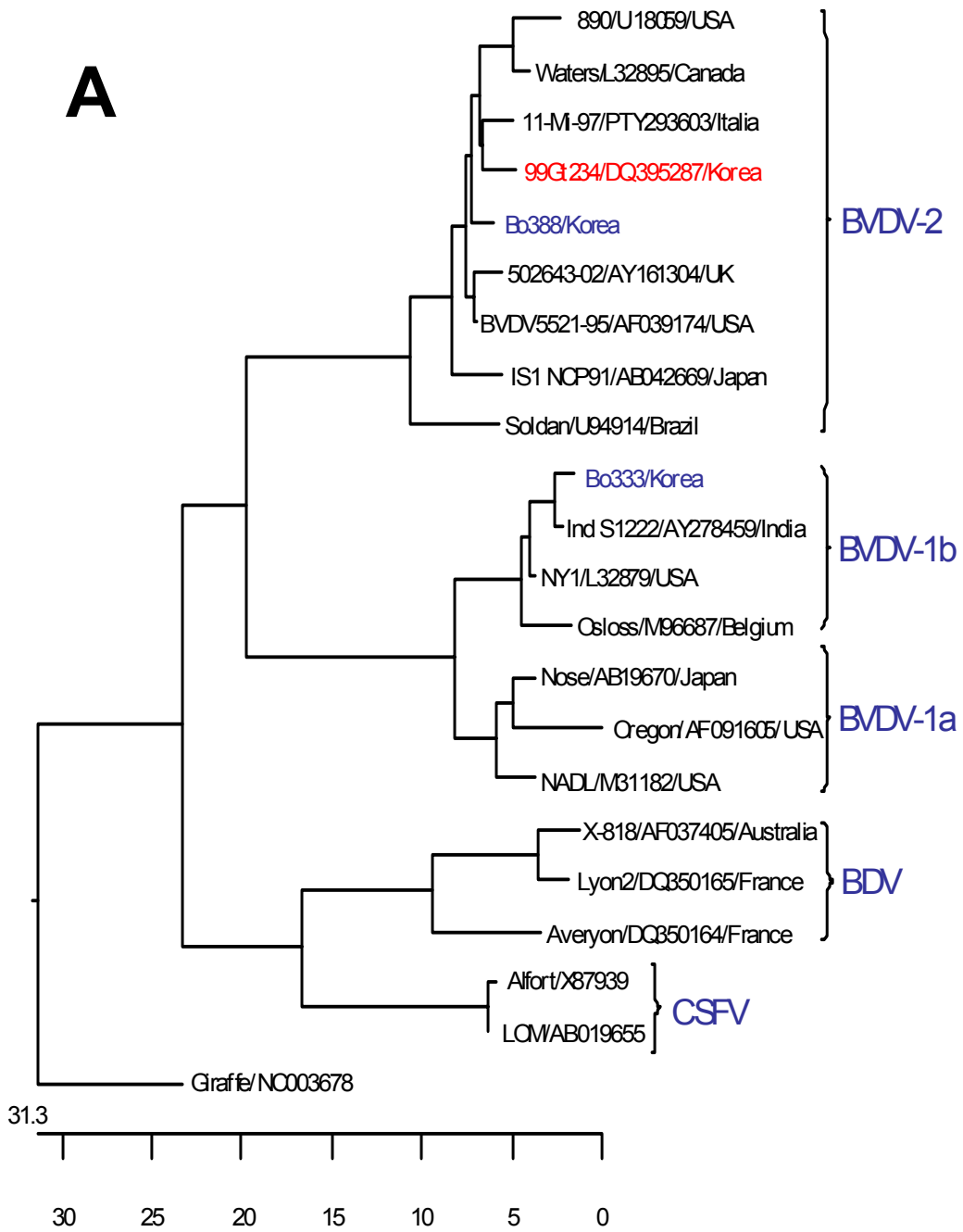
■ 따라서 1998년부터 2004년까지 국립수의과학검역원에 의뢰된 가검물을 이용하여 retrospective study를 다시 시작하였다.

■ 의뢰되어 보관중인 시료를 대상으로 RNA를 채취한 후, real-time RT-PCR과 conventional RT-PCR을 pan-pestivirus primer pair V324/V326을 이

용하여 수행하였다. V324/V326 primer pair는 pestivirus genome의 5' non-coding region (5'-NCR)을 증폭시킬 수 있다 (Vilcek et al., 1994; Kim et al., 2005).

- 그 결과 expected band가 99D234 증례인 장 내용물과 배양세포 상층액에서 검출되었다.
- 유전자 염기서열 분석을 위해서 5'-NCR과 N^{pro} 부위를 V324/V326 primer 와 V324/1400R primer (Becher et al., 1997)를 이용하여 증폭시켰다.
- 그 후 증폭 산물인 288 bp와 1338 bp를 ABI377 automated sequencer (Applied Biosystems)를 이용하여 유전자 염기서열 분석을 하였으며, 분석된 염기서열을 99Gt234로 명명하였고, 여기에서 얻어진 유전정보는 GenBank data library에 DQ395287로 등록되어 있다.
- Phylogenetic analysis는 기존에 보고된 pestivirus의 5'-NCR과 N^{pro} 서열을 대상으로 실시하였다.
- 이때 Vector NTI suite 8 program (Invitrogen)을 이용하여 원하는 비교 유전자 염기서열을 GenBank에서 확보하였다.
- GenBank에서 확보된 유전자 염기서열은 Bioedit software (Hall, 1999)를 이용하여 trimming과 alignment를 시켰다.
- Aligned sequences는 Clustal X package (Higgins and Sharp, 1988)의 neighbor-joining method (Asitou and Nei, 1987)를 이용하여 분석하였다.
- Bootstrap probabilities는 1000회가 되도록 계산하였다.

- Phylogenetic tree 및 sequenc pair distances는 DNASTAR program (Lager gene)을 이용하여 작성하였다.
- 그 결과 99Gt234는 phylogenetic tree에서 BVDV-2에 해당된다는 것을 확인하였다 (Fig. 1).
- 실제로 BVDV-2는 전 세계적으로 염소에서는 전혀 보고가 없었으며, 한국의 소에서도 매우 드물게 발생한다고 보고되었다.
- 99Gt234 유전자 염기서열은 미국에서 보고된 BVDV5521-95 (AF039174)와 97.2%를 BVDV2-AzSpln (AF145970)과는 96.2%라는 높은 상동성을 보였다.
- 특히 흥미 있는 것은 99Gt234 유전자 염기서열은 계통학적으로 지리학적으로 가까운 일본에서 발생한 BVDV-2보다 북미나 유럽에서 발생한 BVDV-2에 가깝다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1).
- 이러한 결과는 우리나라 소에서 관찰된 BVDVs (Bo333과 Bo388)에서 얻어진 결과와 매우 유사하였다 (Park et al., 2004).
- 또한 국내 소에서 분리된 BVDV-1 (Bo333) 분리주는 BVDV-1b에 속한다는 것도 규명하였다.



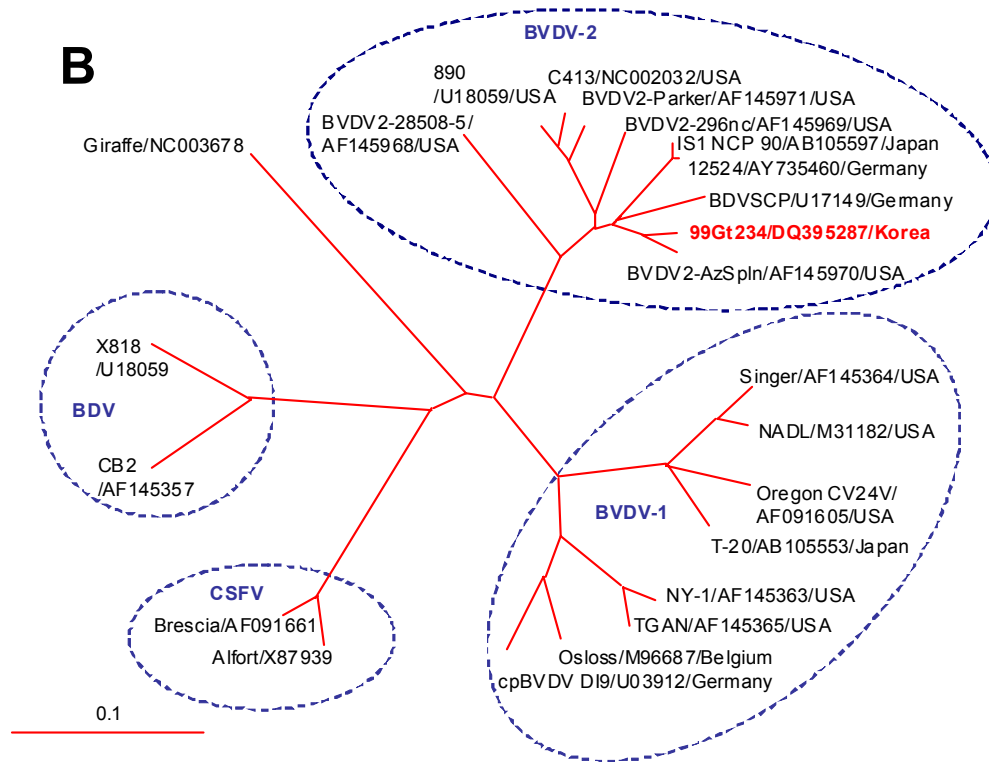


Fig. 1. Phylogenetic tree of 5' non-coding region (5'-NCR) (A) and N^{pro} region (B) sequences from Korean native goat isolate and other pestivirus isolates representing the major four genotypes and subgroups. Giraffe isolate was designated as outgroup. The aligned sequences correspond to nucleotides 142 to 371 of 5'-NCR and 486 to 793 of N^{pro} in the BVDV-1 NADL sequence. Individual sequences are listed by Name/GenBank accession number/isolated country. Averyon and Lyon2 sequences were from NVRQS stock strains that were kindly donated

from CNEVA, France. Bo333 and Bo388 sequences were kindly provided by Dr. Bong-Kyun Park of Seoul National University, Korea.

- 99Gt234 유전자 염기서열 내에는 variable region II (VR-II)와 variable region III (VR-III)가 있는데, 이 부위는 pestivirus 내에서도 염기서열 다양성이 있어서 pestivirus 분류에 자주 사용된다 (Ridpath and Bolin, 1995).
- 이 부위들에 대한 염기서열을 기존에 보고된 BVDV-2 표준주인 BVDV-2 prototype 890 주와 염기서열을 비교 분석한 결과 단지 몇 개의 염기서열 치환이 있음을 알 수 있었다.
- 특히 핵산 유전자 염기서열 치환 패턴은 이탈리아에서 분리된 bovine-origin BVDV-2인 11-Mi-97과 미국에서 분리된 BVDV5521-95와 매우 유사한 반면에, 한국에서 보고된 bo388과는 다르다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

	VR-II		VR-III	
	211	225	287	324
890	CCTTTAGTCGAGGAG		CGTGGGTGAAAGCGCCATTC-GTGGCGTCATGGACACAG	
Waters	..A.....		.A.....T.....T.....	
11-Mi-97	..ACC.....		.A.....-.....T.....A	
BVDV5521-95	..ACC.A.....		.A.....A.....T.....T.....	
99Gt234	..ACC...T.....		.A.....A.....T.....CT...A.....	
502643-02	..AC..A.....		.A.....T-A...T..T.....	
Bo388	..A.C.A..C....		.A.....-.....T..T.....	
IS1 NCP91	..A.C...TGC....		.A.A..C.....A.....-..C..T..T.....	
Soldan	.TGGC.ACAAGA...		...A.....AT...CTT...AT..T.....	

Fig. 2. Alignment of 5' non-coding region sequences from Korean black

goat isolate and other BVDV-2 isolates. Aligned sequences correspond to VR-II (211 to 225) and VR-III (287 to 324) of BVDV-2 prototype strain 890. Dots and dash indicate the identity with 890 sequence and putative nucleotide deletion, respectively.

- 국내에서는 일반적으로 염소는 백신접종을 수행하지 않기 때문에, 국내 염소는 BVDV를 전파에 있어서 전파원임을 본 연구를 통해서 규명하였다.
- 또한 본 연구를 통해서 국내 염소에서 발생하고 있는 보더병양 질병은 진성의 border disease virus에 의한 것이 아니고 BVDV-2에 의해서 유발된다고 추정된다.
- 또한 본 연구에서 규명된 염소의 BVDV-2는 전 세계적으로 보고되지 않았으며, 본 연구자들에 의해서 세계에서 처음으로 보고하게 되었다.
- 본 연구결과는 현재 국제적으로 저명한 과학잡지인 "Virus Research"에 게재 승인을 받았다.

나. 2004-2006년도에 국내 염소 농가에서 발생한 보더병 바이러스의 분자역학 규명

- 국내에서 사육되고 있는 염소의 혈장에서 RNA를 추출하고, denaturation 한 후 pestivirus 내의 4종 바이러스를 모두 증폭할 수 있는 PanF 및 PanR

pmimer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 총 5개의 양성 증폭산물을 확인할 수 있었다.

- ▣ 이 PCR product를 정제하여, pGEM-T vector에 cloning하였다.
- ▣ 유전자의 삽입을 확인하기 위하여 Sac I, II의 제한효소로 처리하여 5'NTR부위의 삽입을 확인하였다 (Fig. 3).

Table 1. Information about farmer, city, breed and name of clones containing amplicons amplified by RT-PCR with PanF and PanR primer pair

Farmer	Address	Breed	Name of clones
Seong-Uk Jeong	Yong-Wheol, Wheol-Ya, Ham-Phoung, Jeonnam	Saanen	달맞이
Sang-Don Koh	Kum-Jeong, Sim-Cheon, Yeong-Dong, Chungbuk	Saanen	자아넨
Yeol-Kyu Jin	Han-Lym, Kim-Hae, Kyungnam	Korean goat	진열규
Hyoung-Yong Park	Dong-Kang, Koh-Heung, Jeonnam	Korean goat	박형용
Ja-Kyun Jeong	An-euh, Ham-Yang, Kyungnam	Korean goat	정자균함양

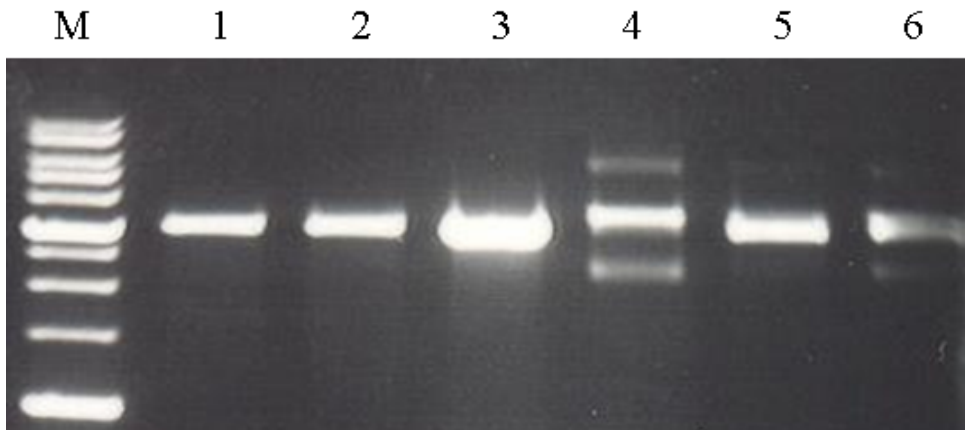


Fig. 3. Confirmation of pestivirus-expected band inserted into pGEM-T vector using SacI and II restriction endonucleases. M: 100 bp marker. Lanes 1-6: pestiviruses detected by RT-PCR with PanF and PanR pestivirus specific primer pair.

- ▣ 삽입이 확인된 clone에 대하여 유전자의 염기서열을 분석 하였던 바, 국내의 염소로부터 cloning된 3개의 유전자 (진열규, 박형용, 정자균함양)는 BVDV type I과 96%의 상동성을 나타내어 genotype I 으로 확인할 수 있었다 (Fig. 4-6).
- ▣ 또한 British Saanen 종에서 유래한 유전자 “충북 영동의 자아넨”은 bovine viral diarrhea type II 주인 BVDV5521-954와 98%의 상동성을 나타내었다(Fig. 7).
- ▣ 더욱이 전남 함평의 “달맞이”는 BVDV type II인 890주와 98%의 상동성을, Border disease virus 주인 C413 주와 97%의 높은 상동성을 나타내었다

(Fig. 8).

```
1
ATGCCCATAGTAGGACTAGCAAACAAGGAG GGTAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATGG 60
CTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAG TGGTTCGACGCTTAGTATGACAAACCTCGA
GATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAG CACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCGCTCAG
GCAAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAAT ACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCAC
TGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACA TGGCACATGGAGTTGA

>gi|32745545|gb|AY323880.1| Bovine viral diarrhea virus 1 isolate
T-482/99 polyprotein gene, partial CDs Length=937 Score=490 bits
(247),Expect = 1e-135 Identities = 278/287 (96%), Gaps = 1/287 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 ATGCCCATAGTAGGACTAGCAA-ACAAGGAGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATG 59
||||| ||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 3 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAGACAAGGAGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATG 62
Query 60 GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTTAGTATGACAAACCTCG 119
||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||| |||||
Sbjct 63 GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCGACGCTTTGTTTGACAAGCCTCG 122
Query 120 AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCGCTCA 179
||||||||||||||| ||||||||||||||||||||| |||
Sbjct 123 AGATGCCACGTGGACGAGGGCACGCCACAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTCGTTCA 182
Query 180 GGCAAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA 239
|| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 183 GGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA 242
Query 240 CTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA 286
|||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 243 CTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA 289
```

Fig. 4. Nucleotide sequence and alignment of 5'NTR amplified in the serum sample obtained from the Yeol-Kyu Jin's goat farm. Aligned sequences is bovine diarrhea virus type 1 strain, T-482/88.

1

60

ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAATAAGGG GGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATG
GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCA GTGGTTCGACGCTTAGTATGACAAGCCTCG
AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACACA GCACATCTTAATCTGGACGGGGTTCGTTCA
GGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAA TACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA
CTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTAC ATGGCACATGGAGTTGA

>gi|32745506|gb|AY323878.1| Bovine viral diarrhea virus 1 isolate C-1332/00-41 nonstructural protein
Npro gene, partial CDs Length=671 Scor = 521 bits (263), Expect = 4e-145 Identities = 281/287 (97%),
Gaps = 0/287 (0%) Strand=Plus/Plus

Query 1 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAATAAGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCGTTGGATG 60
|||||
Sbjct 3 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAATAAGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTAGTTGGATG 62
Query 61 GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCAGTGGTTCGACGCTTAGTATGACAAGCCTCG
120
|||||
Sbjct 63 GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCAGTGGTTCGACGCTTGGGAGGACAAGCCTCG 122
Query 121 AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAATCTGGACGGGGTTCGTTCA
180
|||||
Sbjct 123 AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGTTCGTTCA 182
Query 181 GGTGAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA
240
|||||
Sbjct 183 GGTGAAAACGGTTTAACCAATCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA 242
Query 241 CTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA 287
|||||
Sbjct 243 CTGTATTGCTACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA 289

Fig. 5. Nucleotide sequence and alignment of 5'NTR amplified in the serum sample obtained from the Hyoung-Yong Park's goat farm. Aligned sequences is bovine diarrhea virus type 1 strain, C-1332/00-41 strain.

```

1
60
ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAATAAGGG GGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCATTGGATG
GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCA GTGGTTCGACGCCTTGAGGACAGGCCCTCG
AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACA GCACATCTTAACCTGGACGGGGTTCGTCA
GGTAAAAACGGTTTAACCAACCGCTATGAA TACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA
CTGTATTGCTACTGAAAATCTCTGCTGTAC ATGGCACATGGAGTTGA

>gi|2149468|gb|U86600.1|PTU86600 Pestivirus type 1 noncytopathic genomic RNA, complete genome
Length=12267 Score= 529 bits (267),Expect = 1e-147 Identities = 282/287 (98%), Gaps = 0/287 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAATAAGGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCATTGGATG 60
|||||
Sbjct 108 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAATAAGGGGGGTAGCAACAGTGGTGAGTTCATTGGATG 167
Query 61 GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAAGTGGTTCGACGCCTTGAGGACAGGCCCTCG 120
|||||
Sbjct 168 GCTGAAGCCCTGAGTACAGGGTAGTCGTCAAGTGGTTCGACGCCTTGAGGACAGGCCCTCG 227
Query 121 AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGTTCGTCA 180
|||||
Sbjct 228 AGATGCCACGTGGACGAGGGCATGCCACAGCACATCTTAACCTGGACGGGGTTCGTCA 287
Query 181 GGTAAAAACGGTTTAACCAACCGCTATGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA 240
|||||
Sbjct 288 GGTAAAAACGGTTTAACCAACCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCA 347
Query 241 CTGTATTGCTACTGAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA 287
|||||
Sbjct 348 CTGTATTGCTACTGAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA 394

```

Fig. 6. Nucleotide sequence and alignment of 5'NTR amplified in the serum sample obtained from the Ja-Kyun Jeong's goat farm. Aligned sequences is bovine diarrhea virus type 1 strain, C-1332/00-41 strain.

1 60

ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAAGGAGGG GACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATG
GCCGAATCCCTGAGTACAGGGAAGTCGTCA ATGGTTCGACACTCCATCAATCGAGGAGTC
TCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCC ACGGCACATCTTAACCTATGCGGGGGTTGC
ATGGGTGAAAGCACCATTAGCGGTGTTATG GACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACC
TGCTATCCGCTAGTAAAACTCTGCTGTA CATGGCACATGGAGTTGA

>gil3786379|gb|AF039174.1|AF039174 Pestivirus type 2 strain BVDV5521-95 5' untranslated region
Length=386 Score = 527 bits (266), Expect = 6e-147 Identities=275/278 (98%), Gaps = 0/278 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATG 60
|||||
Sbjct 109 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATG 168

Query 61 GCCGAATCCCTGAGTACAGGGAAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCATCAATCGAGGAGTC 120
|||||
Sbjct 169 GCCGAATCCCTGAGTACAGGGAAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCACCAATCGAGGAGTC 228

Query 121 TCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCTATGCGGGGGTTGC 180
|||||
Sbjct 229 TCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCTATGCGGGGGTTGC 288

Query 181 ATGGGTGAAAGCACCATTAGCGGTGTTATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACC 240
||||| |
Sbjct 289 ATGGGTGAAAGCACCATTGTGGTGTATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACC 348

Query 241 TGCTATCCGCTAGTAAAACTCTGCTGTACATGGCAC 278
|||||
Sbjct 349 TGCTATCCGCTAGTAAAACTCTGCTGTACATGGCAC 386

Fig. 7. Nucleotide sequence and alignment of 5'NTR amplified in the serum sample obtained from the Sang-Don Koh's goat farm. Aligned sequences is bovine viral diarrhea virus type II strain, BVDV5521-95.

1

60

```
ATGCCCATAGTAGGACTAGCAAAAGGAGGG GACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATG
GCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAATCGTCA ATGGTTCGACACTCCTTTAGTCGAGGAGTC
TCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCC ACGGCACATCTTAACCCACGCGGGGGTTGC
ATGGGTGAAAGCGCCATTCGTGGCGTCATG GACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACC
TGCTACTCCGCTAGTAAAACTCTGCTGTA CATGGCACATGGAGTTGA
```

>gi|902376|gb|U18059.1|BVU18059 Bovine viral diarrhea virus 2 polyprotein gene, complete CDs
Length=12513 Score=529 bits (267), Expect = 1e-147 Identities = 282/287 (98%), Gaps = 0/287 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 ATGCCCATAGTAGGACTAGCAAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATG 60
      ||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 108 ATGCCCTTAGTAGGACTAGCCAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTCCATTGGATG 167
Query 61 GCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAATCGTCAATGGTTCGACACTCCTTTAGTCGAGGAGTC 120
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 168 GCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAGTCGTCAATGGTTCGACACTCCTTTAGTCGAGGAGTC 227
Query 121 TCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCCACGCGGGGGTTGC 180
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 228 TCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGCACATCTTAACCCACGCGGGGGTTGC 287
Query 181 ATGGGTGAAAGCGCCATTCGTGGCGTCATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACC
240
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 288 GTGGGTGAAAGCGCCATTCGTGGCGTCATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACC 347
Query 241 TGCTACTCCGCTAGTAAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTG 287
      ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
Sbjct 348 TGCTACTCCGCTAGTAAAACTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTG 394
```

Fig. 8. Nucleotide sequence and alignment of 5'NTR amplified in the serum sample obtained from the Seong-Uk Jeong's goat farm. Aligned sequences is bovine viral diarrhea virus type II strain, 896.

- ▣ 계통분석을 위해서 지금까지 보고된 외국의 bovine viral diarrhea virus type 1과 type 2 유전자 정보를 Genbank에서 다운받아 국내 염소에서 검출한 것과 비교하였다 (Table 2).

Table 2. Pestivirus type 1 and type 2 strains compared for the phylogenetic analysis

Pestivirus type 1 strains	Pestivirus type 2 strains
U86600(ILLNC)-USA	
AF220247(CP7-5A)-GER	U18059(890)-USA-BVDV2
U86599(ILLC)-USA	AF002227(C413)-USA-Border disease
AY451338(1/A/00)-ITALY	AF039180(BVDV890)-USA-Classical swine fever
AY159549(3336/00)-Spain	
AY323880(T-482/99)-Slovenia	AY149215(p11Q)-CANADA-BVDV2
AY323878(C-1332/00-41)-Slovenia	AF502399(NY'93/C)-GER-BVDV2
AY363075(HOL_ca_02)-Denmark	AB003619(KZ-91-CP)-JAPAN-TYPE1
AJ585412(VEDEVEC)-HUNGARY-?	AB003620(KZ-91-NCP)-JAPAN-TYPE1
M96687(Osloss)	AB003621(OY89)-JAPAN-BVDV
NC_001461(NADL)-USA	AF039174(BVDV5521-95)-USA
AF041040(Oregon)	-Classical swine fever
KOR/JYK-Yeol-Kyu Jin	KOR/GSD-Sang-Don Koh
KOR/PHY-Hyoung-Yong Park	KOR/JSU-Seong-Uk Jeong
KOR/JJK-Ja-Kyun Jeong	

- ▣ 그 결과 진열규 농장 (KOR/JYK-Yeol-Kyu Jin), 박형용 농장 (KOR/PHY-Hyoung-Yong Park), 정자덕 농장 (KOR/JJK-Ja-Kyun Jeong)에서 검출되어 염기서열 분석된 것들은 bovine viral diarrhea type 1에 속해 있으며, 고상돈 농가 (KOR/GSD-Sang-Don Koh)와 정성욱 농가 (KOR/JSU-Seong-Uk Jeong)의 것은 bovine viral diarrhea type 2에 속해

있음을 알 수 있었다 (Fig. 9).

- 또한 지금까지 bovine viral diarrhoea type 1으로 알려져 있었던 일본의 KZ-91-CP, KZ-91-NCP, OY89 bovine viral diarrhoea virus는 본 검사결과 type 2 바이러스임으로 규명되었다 (Fig. 9).

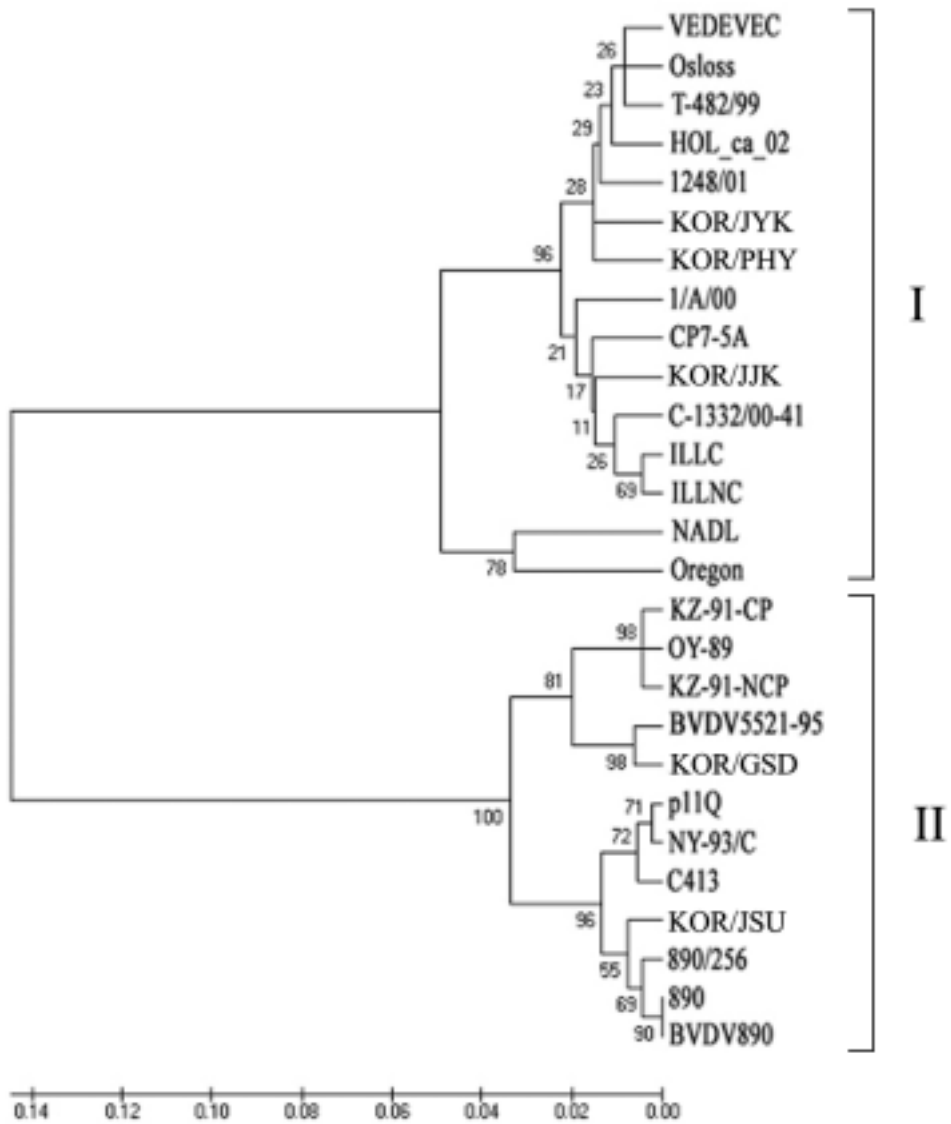


Fig. 9. The phylogenetic tree of the 5'NTR of pestivirus type 1 and type 2 strains. Type 1 strains: ILLNC, CP7-5A, ILLC, 1/A/00, 3336/00, T-482/99, C-1332/00-41, HOL_ca_02, VEDEVVEC, Osloss, NADL, Oregon, KOR/JYK, KOR/PHY,KOR/JJK, KZ-91-CP, KZ-91-NCP, OY89. Type 2 strains: 890 (bovine viral diarrhea virus type 2; BVDV2), C413 (border disease virus), BVDV890 (classical swine fever virus), p11Q (BVDV2), NY'93/C (BVDV2), BVDV5521-95 (BVDV2), KOR/GSD (BVDV2), KOR/JSU (BVDV2). The phylogenetic tree was made using PhyloDraw at the Graphics Application Laboratory, Pusan National University.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연도 세부과제 및 주요내용	2004년도 (1차년도)	2005년 (2차년도)
제1세부과제		
<ul style="list-style-type: none"> ▣ 전국적인 규모의 재료 채취 <ul style="list-style-type: none"> ● 혈액채취 ● 장기 및 조직채취 ● 분변채취 ▣ 병리학적 연구 <ul style="list-style-type: none"> ● 병리해부검사 ● 병리조직검사 ▣ 기생충학적 검사 <ul style="list-style-type: none"> ● 병리조직검사를 통한 기생충검사 ▣ 세균검사 <ul style="list-style-type: none"> ● 세균분리 및 동정 ● 병리조직검사를 통한 세균성 질병 검사 ▣ 바이러스성 질환검사 <ul style="list-style-type: none"> ● 병리해부검사를 통한 바이러스성 질환 검사 ● 병리조직검사를 통한 바이러스성 질환 검사 		
제1협동과제		
<ul style="list-style-type: none"> ▣ 진단법 개발 <ul style="list-style-type: none"> ● RT-PCR 기법 개발 ● Real-time RT-PCR 기법개발 ▣ 야외 증례에서 Pestivirus 검출 <ul style="list-style-type: none"> ● ELISA 기법을 이용한 Pestivirus 항체가 		

확보함으로써, 본 연구에서는 단지 보더병의 역학조사뿐만 아니라 지금까지 국내에서 전혀 수행되지 않았던 일본 뇌염 등 여러 가지 바이러스성 질환의 혈청역학조사가 가능하게 되었다.

- 장기 및 조직채취: 혈청을 채취하기 위해서 방문한 염소 농가에서 총 23두의 폐사 혹은 폐사직전의 염소를 부검하여 장기 및 조직을 채취하여 본 연구에 성공적으로 사용하였다.
- 분변채취: 또한 상술한 목적을 달성하기 위해서 방문한 농가에서 약 100여두분의 분변을 채취하여 본 연구에 성공적으로 사용하였다.

■ 병리학적 연구

- 병리해부검사: 상술한 총 23두의 염소 가검물을 육안적으로 자세히 검사하여, 육안적인 병변들을 기록하고, 장기 및 조직재료를 채취하여 아래 항목의 검사에 활용할 수 있었다.
- 병리조직검사: 병리해부검사에서 채취한 조직들은 H&E stain, Gram stain 등 여러 가지 조직염색기법들을 사용하여 병리조직검사를 성공적으로 수행하였다.

■ 기생충학적 검사

- 병리조직검사를 통한 기생충검사: 폐사체의 조직 내에서 기생하는 다양한 기생충들을 확인할 수 있었으며, 이 중에서도 아직까지 알려져 있지 않는 미확인종들도 있어서 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.
- 또한 일부 분변을 이용하여 기생충 총란 검사도 실시하였으며, 이들은 바

로 위의 조직학적 결과와 비교분석하였다.

■ 세균검사

- 세균분리 및 동정: 역학조사 시 채취한 가검물에서 세균분리를 성공적으로 수행하였으며, 또한 이의 동정도 성공적으로 수행하였다. 또한 항생제 감수성 검사를 통하여 각각의 분리·동정된 세균들에 대한 감수성이 높은 항생제를 파악할 수 있어서 향후 염소농가에서 발생하는 질병의 치료에 바로 응용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 병리조직검사를 통한 세균성 질병 검사: 또한 이러한 세균성 질병들이 실제로 해당 장기에서 어떠한 작용을 하는지 자세한 병리조직검사를 통해서 그 의미를 파악하였다.

■ 바이러스성 질환검사

- 병리조직검사를 통한 바이러스성 질환 검사: 본 사업을 통해 특히 *Retroviridae* 내의 lentivirus에 의한 바이러스성 간질성 폐렴과 retrovirus type B/D에 의한 바이러스성 pulmonary calcinomatosis에 의한 발생가능성을 확인할 수 있었으며, 향후 이에 대한 자세한 역학조사, 바이러스 분리·동정, 기병론 연구 및 백신개발에 대한 것을 수행하여야 할 필요성을 확인할 수 있었다.

제 2 절 제1협동과제 연구목표 달성도

▣ 진단법 개발

- RT-PCR 기법개발: 본 연구과제를 통해 국내에서 처음으로 Pestivirus 내에 속해 있는 4가지 바이러스성 질병, 즉 border disease virus, bovine viral diarrhea type 1 및 type 2, 그리고 classical swine fever를 감별 진단 할 수 있는 RT-PCR 기법을 개발하였다. 본 진단법의 개발을 통해 Pestivirus 내에 속해 있는 border disease virus, bovine viral diarrhea type 1 및 type 2, 그리고 classical swine fever를 감별진단할 수 있게 되었다.
- Real-time RT-PCR 기법개발: 본 연구과제를 통해 세계에서 처음으로 Pestivirus 내에 속해 있는 4가지 바이러스성 질병, 즉 border disease virus, bovine viral diarrhea type 1 및 type 2, 그리고 classical swine fever를 실시간적으로 그리고 정량적으로 진단할 수 있는 real-time RT-PCR기법을 개발하여 향후 국내에서 발생하거나 혹은 검역당국에서 검역을 위한 진단법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 진단법에 대한 기법을 향후 논문화 하여 국내뿐만 아니라 세계적으로 활용할 수 있도록 하겠다.

▣ 야외 증례에서 Pestivirus 검출

- ELISA 기법을 이용한 Pestivirus 항체가 검출: 국내에서 발생하고 있는

흔들병의 원인이 될 수 있는 border disease virus, bovine viral diarrhea virus, 그리고 classical swine fever에 항체가 검사를 실시한 결과 bovine viral diarrhea virus가 국내 염소의 흔들병의 주요 원인일 가능성을 확인하게 하였다.

- 중화항체기법을 이용한 Pestivirus 항체가 검출: 상술한 ELISA 검사치에서도 확인된 바와 같이 ELISA 검사치를 중화항체기법을 통하여 검사한 결과, 상술한 ELISA 결과치를 확인할 수 있었다.
- RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus 검출: 국내 염소 농가에서 보더병의 발생원인체를 조사하기 위해서, 본 사업년도 이전에 수의과학검역원에 의뢰한 가검물과 본 사업년도에 채취한 가검물을 이용하여 보더병 바이러스의 검출을 시도하였다. 즉 본 사업이 시작된 2004년도 (제1차년도)에는 35개 야외 염소농장에서 채취한 혈액 재료 53두분과 조직 3두분을, 제2차년도에는 전국 223개 농가의 1,142두분의 혈액과 충청북도 충주지역에서 34개 농장으로부터 수집한 102두의 염소 비장과 신장조직을 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다. 또한 2차년도에는 상술한 보더병 바이러스에 대한 항체 양성을 나타낸 18농가의 혈액재료와 병성감정으로 접수된 조직, 만성 소모성 바이러스성 질병에 의심되는 농장의 비즙 및 설사시료를 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다. 더욱이 5-15일령의 어린 염소에서 허약증세, 호흡기 및 설사를 일으키며 약 50%의 폐사율을 나타내는 농장의

혈청을 대상으로 RT-PCR 기법 등을 이용하여 pestivirus 검출을 시도하였다. 그 결과 pestivirus에 속하는 4가지 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 PanF 및 PanR primer pair를 이용한 RT-PCR에서 총 7두의 염소가검물에서 양성 반응을 확인할 수 있었다.

- Real-time RT-PCR 기법을 이용한 Pestivirus 검출: 상술한 가검물을 이용하여 real-time RT-PCR을 수행한 결과 똑같은 결과를 확인할 수 있었다.

▣ 염소에서 주요 바이러스성 질환에 대한 항체가 검출

- 국내에서는 처음으로 염소에서 7종 바이러스 질환에 대한 혈청학적 검사를 실시한 결과, IBRV 9.33%, PI3 10.19%, BCV 0.83%, Akabanevirus 12.69%, Ainovirus 13.02%, Chuzanvirus 0%, JEV 8.98%의 양성률을 각각 나타내었다.
- 본 검사결과를 통하여 국내에서도 지금까지 염소에서 알려져 있지 않았던 7종의 바이러스성 질병이 발생하고 있으며, 추잔바이러스와 소 코로나바이러스를 제외한 전염성 비기관염바이러스, 파라인플루엔자 3, 아까바네 바이러스, 아이노바이러스, 일본뇌염 바이러스가 상당히 높은 비율로 발생하고 있음을 알 수 있었다.
- 특히 이러한 질병들은 소에서도 다발하는 질병으로서, 이러한 염소의 질병들은 가축과 가축간의 전파의 원인으로 작용할 수 있음을 시사하며, 특히 일본 뇌염의 경우 염소에서는 백신을 수행하지 않기 때문에, 염소와 가축

간 혹은 염소와 사람간의 일본 뇌염 전파의 주요한 원인으로 작용할 수 있어서, 경제적인 측면뿐만 아니라 공중보건상에도 중요한 결과임을 알 수 있었다.

▣ 보더병 유관 바이러스의 분자특성 규명

- 본 연구에서 야외 염소 시료를 대상으로 RT-PCR을 수행한 결과 총 7건의 양성반응이 관찰되었다.
- 따라서 RT-PCR에 의해서 증폭된 산물을 염기서열을 분석하여, 계통학적 분류 검사를 실시한 결과, 모두 bovine viral diarrhea 바이러스와 연관되어 있었고, border disease와는 관련이 없었다.
- 특히 계통학적으로 국내에서 흔들병을 일으키는 것은 bovine viral diarrhea virus type1과 type2의 발생에 의한 것임을 알 수 있었다.
- 따라서 국내에서 발생한 염소의 흔들병은 bovine viral diarrhea virus type 1과 2에 의한 감염증인 것으로 결론내릴 수 있었다.

제 3 절 관련분야에의 기여도

- 본 연구가 수행되면 기술적 측면에서의 기대효과는 다음과 같이 요약된다.
- 신속·정밀한 염소 보더병 진단법 개발을 통해 기존 기법의 단점인 검사재료 수의 한계성, 낮은 민감도 및 특이성 및 기타 복잡성, 장시간의 진단소요시간 등을 극복할 수 있게 되었다.

- 국내 염소 농가에서 아직까지 밝혀져 있지 않았던 일본뇌염, 파라인플루엔자3 바이러스 감염증, 코로나바이러스 감염증, 아까바네 바이러스 감염증, 추잔 바이러스 감염증, 아이노바이러스 감염증, 전염성 비기관염 바이러스 감염증에 대한 발생을 확인하여 향후 이러한 질병들에 대한 발생억제 및 예방대책을 강구하는데 기본적인 자료로 활용할 수 있게 되었다.
- 본 연구를 통해서 전문 기술인력을 양성할 수 있어서 향후 새로운 생물 산업군의 활성화에 기여할 것으로 생각된다.
- 본 연구 과정에서 모든 기술의 국산화로 국내 기술의 향상을 할 수 있었다.
- 본 연구를 통한 염소 보더병의 신속 정확한 진단법 및 예방기법을 확립함으로써 치료경비 및 인력낭비 의 절감, 폐사율 감소, 사료효율 향상, 성장촉진 및 염소 젖 및 고기 생산량 증가 등으로 전반적인 염소 사육 농가의 수익을 높일 수 있게 되었다.
- 위생적이고 건강한 육류와 염소 젖 공급으로 식품의 안정성을 제고하여 소비를 획기적으로 늘릴 수 있게 되었다.
- 염소에서 발생하고 있는 보더병양 질병이 bovine viral diarrhoea virus type1과 2에 의해서 발생함을 규명하여, 국내 치료수단을 강구하는데 결정적인 기초 정보를 얻게 되었다.

- 본 연구에서 개발한 신속·정확한 진단기법은 각 연구소나 시험소에 현지 보급화 시켜 조기 방역체계를 확립할 수 있었다.
- 본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR 기법에 대한 노하우는 타 전염성 질병의 현장 진단 기술에 응용할 수 있게 되었다.
- 또한 본 연구에서 획득한 노하우는 타 질병에 대한 치료 개발분야에 첨단 기술의 과급으로 진단 및 치료약 개발의 활성화를 기대할 수 있게 되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성 및 타연구에의 응용

- 본 연구를 통해서 국내 염소에서 발생하고 있는 혼들병은 진성 보더병인 border disease virus에 의한 것이 아니고, bovine viral diarrhoea virus type 1과 type 2에 의한 것으로 규명되었다. 따라서 향후 이 바이러스에 대한 기병성 연구와 분리한 바이러스를 백신주로 개발하여 이에 대한 안전성 및 효능 검증을 통하여 상업화 시켜야 할 필요성이 제기되었다.
- *Retroviridae* 내의 lentivirus에 의한 간질성 폐렴이 염소를 사육하고 있는 나라에서는 모두 발생되고 있다고 한다. 본 연구를 통해서 폐사한 염소에서 간질성 폐렴이 관찰되었기 때문에, 향후 이에 대한 자세한 역학조사, 원인체 분리·동정, 기병론 규명 등의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.
- *Retroviridae* 내의 type B/D retrovirus에 의한 pulmonary carcinomatosis가 염소를 사육하고 있는 나라에서는 모두 발생된다고 알려져 있다. 본 연구에서도 이와 유사한 pulmonary adenocarcinoma가 관찰되었기 때문에 이에 대한 자세한 역학조사, 원인체 분리·동정, 기병론 규명 등의 연구가 진행되어야 할 것이다.
- 본 연구를 통하여 다양한 기생충이 염소에서 감염되고 있으며, 어떠한 것들은 국내에서는 미확인종인 것으로 분석되었다. 따라서 이러한 염소의 기생충성 질병들에 대한 자세한 역학조사, 원인체 동정, 기병론 규명 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.
- 국내 염소농가에서는 아직까지 알려져 있지 않았던 소와 돼지 등의 질병 즉 소 코로나바이러스, 아까바네 바이러스, 추잔 바이러스, 아이노 바이러스, 전

염성 비기관염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스에 대한 항체가가 염소의 혈청에서 검출되어, 향후 이들 질병들에 대한 자세한 역학조사, 원인체 분리·동정, 기병론 연구, 백신개발 등이 필요할 것으로 사료된다.

■ 본 연구에서 개발한 RT-PCR 및 real-time RT-PCR 기법은 세계 최첨단의 진단법으로, 이러한 기법을 국립수의과학검역원, 각 시도의 축산기술개발 연구소 및 기업의 진단기관에 전수하여 염소의 보더병 감별진단에 활용하도록 한다.

▶ 각 기관에서 발생하는 인력 및 시간적 낭비를 최소화시키고 합리화시켜 다른 중요 가축질병의 예방, 방역 및 진단에 더욱 더 많은 효과를 가져 올 수 있도록 할 것임

▶ 본 연구에서 개발한 기법을 진단 키트화시켜 쉽고 간편하게 임상에서 적용하도록 하여 질병을 예방하고 방제하는 감시인원의 비능률적인 단면들을 개선하여 인건비의 감소와 더불어 더욱 적극적이고 체계적인 방역활동을 수립할 수 있도록 함

▶ 궁극적으로 축산업의 국제 경쟁력이 조성 될 것임

■ 본 연구과제를 통해 개발된 진단 기법에 대한 노하우 활용

▶ 동물의 전염성 질환에 대한 real-time RT-PCR 기법의 개발은 전 세계적으로 미미한 수준임

▶ 따라서 본 연구를 통해 획득한 real-time RT-PCR 기법에 대한 노하우는 다른 동물 질병의 진단법 개발에 바로 활용할 수 있음

▶ 분자생물학적 연구의 유용한 자료로서 활용될 수 있으며 국내 진단업체의 수준을 향상 시키는데 이바지 할 수 있음

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- 최근 Deregt D et al.은 border disease virus, bovine viral diarrhea virus types 1 및 2, classical swine fever virus를 동시에 감별할 수 있는 oligonucleotide suspension microarray를 개발하여 그 결과를 J Virol Methods에 게재하였다. 하지만 본 진단법을 사용하기에는 아직까지 고가이기 때문에 당장 상업화 하기는 어렵지만, 향후 본 진단법은 자주 사용되는 진단법으로 될 가능성이 높다고 생각된다. 따라서 향후 이의 진단법 개발에 관한 연구도 국내에서 수행되어야 할 것으로 사료된다.
- Genus Pestivirus 내에는 border disease virus, bovine viral diarrhea virus types 1 및 2, classical swine fever virus, 4가지 종류의 바이러스가 알려져 있었다. 하지만 최근 border disease virus 내에도 border disease virus type 1, border disease virus type 2, border disease virus type 3가 있음이 규명되었다.
- 본 연구에서는 비록 이들 바이러스가 검출 및 분리되지 않았지만, 이에 대한 정보를 보유하여 향후 이러한 질병이 발생하였을 경우를 대비하여야 할 것이다.
- Patel JR et al.은 실험적으로 송아지에 border disease virus, bovine viral

diarrhea virus types 1 및 2, classical swine fever virus를 접종하여 얻어진 혈청을 이용하여 각각의 바이러스들에 대한 교차 중화항체 반응을 검사한 결과 각각의 바이러스들에 대한 교차반응이 강하게 있음을 확인하였다고 한다. 이 결과를 중심으로 살펴본다면, 따라서 국내에서 현재 혹은 향후에 발생할지도 모르는 pestivirus 내의 4가 질병에 대하여 한 가지 백신으로도 충분히 방어할 수 있다는 중요한 연구결과라고 사료된다.

■ Bovine viral diarrhea virus 는 MDBK cell뿐만 아니라 sheep kidney cell 에도 잘 자란다고 한다. 하지만 border disease virus는 MDBK cell에는 잘 자라지 않는 반면에 sheep kidney cell에서는 잘 자란다고 한다. 특히 세포감염에 있어서 envelope glycoprotein E2는 매우 중요하다고 한다. 따라서 Liang D et al.은 border disease virus의 E2 gene을 bovine viral diarrhea virus E2 유전자와 교환하여 MDBK cell과 sheep kidney cell에서 비교 배양한 결과 역시 MDBK cell에서 잘 자라지 않았으나, sheep kidney cell에서는 잘 자랐다고 한다. 본 결과를 바탕으로 pestivirus의 cell culture 상의 tropism를 확인할 수 있었다고 한다.

■ Vilcek S (2001)는 세포 배양이나 바이러스 분리 등에서 자주 사용되는 fetal calf serum, porcine ST cell line, 5가지 bovine cell lines에서 다양한 종류의 pestivirus를 분리할 수 있었다고 한다. 본 연구결과가 의미하는 것은 향후 국내외에서 분양 혹은 구입하는 이러한 재료에 의해서 pestivirus가 전파 및 확산될 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 부분에 대해서도 검역을

철저히 수행하여야 할 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

1. Akkina RK, Raisch KP. Intracellular virus-induced polypeptides of pestivirus border disease. *Virus Res* 1990;16:95-105.
2. Baker JA, York CJ, Gillespie JH, et al. Virus diarrhea in cattle. *Am J Clin Med* 1954; 15:525-531.
3. Barlow RM, Rennie JC, Keir WA, et al. Experiments in Border disease. VII. The disease in goats. *J Comp Pathol* 1975; 85:291-297.
4. Barlow RM, Patterson DSP. Border disease of sheep: A virus-induced teratogenic disorder. In: Parey P. eds. *Advances in Veterinary Medicine*. Berlin and Hamburg; 1982,36.
5. Becher P, Konig M, Paton DJ, Thiel HJ. Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus. *Virology* 1995; 209:200-206.
6. Becher P, Orlich M, Shannon AD, et al. Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* 1997; 78:1357-1366.
7. Bernard G, Bourdin P. et al. Immunitaire actuel, naturel ou acquis du cheptel senegalais vis-a-vis de la peste bovine, de la maladie des muqueuses, de la rhinotracheite infectieuse et de la maladie respiratoire a virus parainfluenza 3. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1971; 24:183-189.
8. Bolin SR, McClurkin AW, Cutlip RC, et al. Severe clinical disease induced in cattle persistently infected with noncytopathic bovine viral diarrhea

- virus by superinfection with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* 1985; 46:573-576.
9. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ. Experimental production of fatal mucosal disease in cattle. *Vet Rec* 1984; 114:535-536.
 10. Carlsson U, Fredriksson G, Kindahl H, et al. Effect of bovine virus diarrhoea virus on pregnancy in the ewe monitored by ultrasound scanning and levels of 15-keto-13,14-dihydro-PGF₂alpha and progesterone. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 14:91-98.
 11. Cay B, Chappuis G, Coulibaly C, et al. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestivirus: report of an international workshop. *Vet Microbiol* 1989; 20:123-129.
 12. Collett MS, Moennig V, Horzinek MC. Recent advances in pestivirus research. *J Gen Virol* 1989; 70:253-266.
 13. De Mia GM, Greiser-Wilke I, Feliziani F, et al. Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52:206-210.
 14. Depner K, Hubschle OJB, Liess B. BVD-virus infection in goats - experimental studies on transplacental transmissibility of the virus and its effect on reproduction. *Arch Virol Suppl* 1991; 3:253-256.
 15. Deng R, Brock K. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21:1949-1957.
 16. Deregt D, Gilbert SA, Dudas S, et al. A multiplex DNA suspension microarray for simultaneous detection and differentiation of classical

- swine fever virus and other pestiviruses. *J Virol Methods* 2006; Epub ahead of print.
17. Done JT, Terlecki S, Richardson C, et al. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: Pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet Rec* 1980; 106:473-479.
 18. Doyle LG, Heuschele WP. Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183:1257-1259.
 19. Duffell SF, Harkness JW. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec* 1985; 117:240-245.
 20. Edwards S. Characterization of a border disease-like virus isolated from pigs: Pathogenicity for pigs and sheep, molecular studies. In: Report on Nat Swine Fever Lab Europ Com, Luxembourg, CEC, 1991; 82-84.
 21. Edwards S, Sands JJ, Harkness JW. The application of monoclonal antibody panels to characterise pestivirus isolates from ruminants in Great Britain. *Arch Virol* 1988; 102:197-206.
 22. Evermann JF, Faris MA, Niemi SM, et al. Pestivirus persistence and pathogenesis: comparative diagnostic aspects of Border disease virus of sheep and bovine viral diarrhoea virus. In: Proceedings of the 24th Meeting Am Assoc Vet Lab Diagnost 1981; 407-426.
 23. Fraser GC, Littlejohns IR, Moyle A. The isolation of a probable pestivirus from a goat. *Aust Vet J* 1981; 57:197-198.
 24. French EL, Hore DE, Snowdon WA, et al. Infection of pregnant ewes with mucosal disease virus of ovine origin. *Aust Vet J* 1974; 50:45-54.

25. Gardiner AC, Barlow RM. Experiments in Border disease. III. Some epidemiological considerations with reference to the experimental disease. *J Comp Pathol* 1972; 82:29-35.
26. Gunn HM, Edwards S, Sands JJ. Interspecies transmission of ruminant pestiviruses: changes in epitope expression related to host species. In: *Proceedings of the 2nd Symposium on Pestiviruses 1992*; 163-166.
27. Hall T.A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999; 41:95-98.
28. Harkness JW. Classical swine fever and its diagnosis: A current view. *Vet Rec* 1985; 116:288-293.
29. Higgins DG, Sharp PM, CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 1988; 73:237-244.
30. Horzinek MC. Pestiviruses - taxonomic perspectives. *Arch Virol Suppl* 1991; 3:1-5.
31. Horzinek MC. Pestivirus diversity. *Arch Virol* 1994; 134:216-217.
32. Huck RA. Transmission of Border disease in goats. *Vet Rec* 1973; 92:151.
33. Hughes LE, Kershaw GF, Shaw IG. "B" or Border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet Rec* 1959; 71:313-317.
34. Hurtado A, Aduriz G, Gomez N, et al. Molecular identification of a new pestivirus associated with increased mortality in the Pyrenean Chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*) in Spain. *J Wildl Dis* 2004; 40:796-800.
35. Kim IJ, Hyun BH, Lee KK, et al. Four-color multiplex real-time one-step

- RT-PCR for differential diagnosis of pestivirus. Proceedings of the 86th Annual Meeting of Conference of Research Workers in Animal Diseases. St. Louis, Missouri, USA, Dec. 4 to 6 2005. p 141.
36. Korean statistical information system 2004. No. of livestock & poultry & their feeders. http://kosis.nso.go.kr/cgi-bin/sws_999.cgi?ID=DT_1E21&IDTYPE=3&A_LANG=1&FPUB=3&SELITEM=0.1 Accessed January 03, 2006.
37. Lang-Ree JR, Vatn T, Kommisrud E, et al. Transmission of bovine viral diarrhoea virus by rectal examination. *Vet Rec* 1994; 135:412-413.
38. Laude H, Gelfi J. Properties of Border disease virus as studied in a sheep cell line. *Arch Virol* 1979; 62:341-346.
39. Liang D, Sainz IF, Ansari IH, et al. The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses. *J Gen Virol* 2003; 84:1269-1274.
40. Liess B. Recent developments in swine fever (hog cholera). In: Proceedings of the 11th Int Symp World Assoc Vet Microbiol, Immunol Specialists Infect Diseases. 1989; 221-227.
41. Løken T. Experimentally-induced border disease in goats. *J Comp Pathol* 1987; 97:85-89.
42. Løken T. Experimental transmission of pestivirus from goats to sheep, calves and pigs. In: Proceedings of the XVII Nordic Vet Congr. 1994; 120.
43. Løken T, Bjerkas I. Experimental pestivirus infections in pregnant goats. *J Comp Pathol* 1991; 105:123-140.
44. Løken T, Bjerck I, Hyllseth B. Border disease in goats in Norway. *Res*

- Vet Sci 1982; 33:130-131.
45. Løken T, Bjerkas I, Larsen HJ. Experimental pestivirus infections in newborn goat kids. J Comp Pathol 1990; 103:277-288.
 46. Løken T, Krogsrud J, Bjerkas I. Outbreaks of border disease in goats induced by a pestivirus-contaminated for vaccine, with virus transmission to sheep and cattle. J Comp Pathol 1991; 104:195-209.
 47. Manktelow BW, Porter WL, Lewis KHC. Hairy shaker disease of lambs. N Z Vet J 1969; 17:245-248.
 48. McClurkin AW, Bolin SR, Coria MF. Isolation of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus from the spleen of cattle acutely and chronically affected with bovine viral diarrhea. J Am Vet Med Assoc 1985; 186:568-569.
 49. Meyling A. Border disease / BVD hos geder (BD/BVD in goats). In: State Veterinary Serum Laboratory and State Veterinary Institute for Virus Research. København, 1990; 3-4.
 50. Nettleton PF. Pestivirus infections in ruminants other than cattle. Rev Sci Tech OIE 1990; 9:131-150.
 51. Nettleton PF, Entrican G. The diagnosis of ruminant pestivirus infections. In: Proceedings of the 2nd Symposium on Pestiviruses 1992; 185-191.
 52. Nettleton PF, Herring JA, Corrigan W. Isolation of bovine virus diarrhoea virus from a Scottish red deer. Vet Rec 1980; 107:425-426.
 53. Olafson P, MacCallum AD, Fox FH. An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell Vet 1946; 36:205-213.
 54. Orr MB, Barlow RM. Experiments in Border disease. X . The postnatal

- skin lesion in sheep and goats. *J Comp Pathol* 1978; 88:295-302.
55. Orr MB, Montgomery H, Gill J, et al. Abortion in goats: A field study. *Surveillance* 1987; 14:5-6.
56. Osburn BI, Clarke GL, Steward WC, et al. Border disease-like syndrome in lambs. Antibodies to hog cholera and bovine viral diarrhoea viruses. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163:1165-1167.
57. Park JS, Moon HJ, Lee BC, et al. Comparative analysis on the 5'-untranslated region of bovine viral diarrhoea virus isolated in Korea. *Res Vet Sci* 2004; 76:157-63.
58. Patel JR, Didlick S, Quinton J. Variation in immunogenicity of ruminant pestiviruses as determined by the neutralisation assay. *Vet J* 2005; 169:468-472.
59. Paton DJ, Simpson V, Done SH. Infection of pigs and cattle with bovine viral diarrhoea virus on a farm in England. *Vet Rec* 1992; 131:185-188.
60. Pearson A. White liver disease and pestivirus infection in goat kids. *Surveillance* 1987; 14:21.
61. Plant JW, Gard GP, Acland HM. Transmission of a mucosal disease virus infection between sheep. *Aust Vet J* 1977; 60:574-577.
62. Plant JW, Littlejohns IR, Gardiner AC, et al. Immunological relationship between Border disease, mucosal disease and swine fever. *Vet Rec* 1973; 92:455.
63. Pratelli A, Bollo E, Martella V, et al. Pestivirus infection in small ruminants: virological and histopathological findings. *New Microbiol* 1999; 22:351-356.

64. Pratelli A, Martella V, Cirone F, et al. Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *J Virol Methods* 2001; 94:81-85.
65. Ridpath JF, Bolin SR. The genomic sequence of a virulent bovine viral diarrhea virus (BVDV) from the type 2 genotype: detection of a large genomic insertion in a noncytopathic BVDV. *Virology* 1995; 212:39-46.
66. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing himizu M, Kumagai T. Experimental infection of pregnant goats with swine fever virus. *Vet Microbiol* 1989; 20:207-214. phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4:406-425.
67. Sawyer MM, Schore CE, Osburn BI. Border disease - Aspects for diagnostic and epidemiologic consideration. In: Symposium on Ruminant Pestivirus Infections. 1991; 97-100.
68. Terpstra C. Border disease. Virus persistence, antibody response and transmission studies. *Res Vet Sci* 1981; 30:185-191.
69. Terpstra C. A congenital infection of small ruminants. In: Pandey R (ed.). *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology. I. Infection and Immunity in Farm Animal*. Basel Karger 1985; 175-198.
70. Vantsis JT, Barlow RM, Fraser J, et al. Experiments in Border disease. VIII. Propagation and properties of a cytopathic virus. *J Comp Pathol* 1976; 86:111-120.
71. Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, et al. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease

- analysis. Arch Virol 1994; 136:309-323.
72. Vilcek S, Nettleton PF, Paton DJ, et al. Molecular characterization of ovine pestiviruses. J Gen Virol 1997; 78:725-735.
73. Wensvoort G, Terpstra C, De Kluyver EP. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. Vet Microbiol 1989; 20:291-306.
74. 이정길, 이채용, 곽형수. 우리 나라 재래염소의 질병에 관한 연구 - 문헌조사. 한국임상수의학회지 2000; 17:32-44.