

발간등록번호

11-1543000-000635-01

**가축 소모성 질환 근절방안 및  
농가 적용 프로그램 개발**

(Application of novel eradication programs  
for livestock wasting disease on a farm level)

(주)메덱스

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “가축 소모성 질환 근절방안 및 농가 적용 프로그램 개발에 관한 연구”  
의 보고서로 제출합니다.

2104년 9월 17일

주관연구기관명 : (주)메덱스  
주관연구책임자 : 김경동  
세부연구책임자 : 김경동  
협동연구기관명 : 농림축산검역본부  
협동연구책임자 : 양동균  
협동연구기관명 : 서울대학교  
협동연구책임자 : 윤희정  
위탁연구기관명 : 한우개량사업소 (농협)  
위탁연구책임자 : 임연수  
위탁연구기관명 : 임프로 AH  
위탁연구책임자 : 전용수

## <과제 구성도>

- 연구개발과제명 : 가축 소모성 질환 근절방안 및 농가 적용 프로그램 개발
- 주관연구기관 : ㈜메텍스
- 연구책임자 : 김경동

세부협동	과 제 내 용		
제1세부	과 제 명	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발 및 BVDV항원현장검사키트개발	
	연구기관	㈜메텍스	
	연구책임자	김경동	
제1협동	과 제 명	소 유사·산질병 및 돼지소모성질환 원인분석 및 제어기술개발	
		제1과제	국내 소 유·사산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발
		제2과제	돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장적용
	연구기관	농림축산검역본부	
	연구책임자	양동군	
제2협동	과 제 명	동물질병제어를 통한 축산식품 유래 위해물질 제어기술 개발 (안전축산물 확보를 위한 유해미생물 제어기술 개발)	
	연구기관	서울대학교	
	연구책임자	윤희정	

# 요 약 문

I. 제 목 : 가축 소모성 질환 근절방안 및 농가 적용 프로그램 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 소 유사산, 바이러스성 설사증 및 돼지 소모성질환 해결을 통하여 청정 축산물 생산 기반구축 및 축산업의 세계시장 경쟁력을 확보하여 축산농가의 안정적 수입원 창출에 기여
- 소 바이러스성 설사증 현장 검사용 진단 키트를 개발하여 효과적인 농가 단위 근절 프로그램을 적용하고 수입 대체 효과 및 수출 증대 기여
- 돼지소모성질환의 제어를 위한 면역복합체제 개발 및 보급으로 양돈 농가의 생산성 향상에 기여
- 연구개발품의 상품화를 통해 연구개발내용이 농가 질병 제어에 기여

III. 연구개발 내용 및 범위

- 한우 목장을 대상으로 한 소 바이러스성 설사증 감염실태 파악, 근절 프로그램 적용 및 효과 분석
  - 한우개량사업소와 연계된 목장별 시료채취 및 분석(위탁과제 공동수행)
  - 설사병근절 프로그램 적용 지도
- BVDV 지속감염우(PI) 항원검사 위한 현장 검사용 키트 개발
  - 바이러스(BVDV) 특이적인 항체를 이용한 최적화 키트 개발 및 생산 조건 수립
  - 현장 적용 가능한 키트와 ELISA 검사법에 대한 비교 평가 및 현장 적용
- 국내 소 유·사산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발
  - 최근 국내 소에서 발생하고 있는 유산의 원인체 발생현황 파악
  - 소 유사산의 원인체를 규명하고, 중요 유전자의 분석
  - BVDV 지속감염우의 검출을 위한 신속 검출키트 산업화
  - BVDV의 Mab 작성 및 항체 정제, immunochromatography법에 의한 키트 작성
  - 소 유산에 관련된 바이러스 질병의 진단법 개선
  - 소 Akabane, Aino, Chuzan, BVDV에 대한 유전자 진단법 개선
  - 소 유산에서 가장 중요한 Akabane 예방을 위한 개량된 백신 생산 기법 확립
  - Akabane virus의 중요 단백질의 발현 및 발현 단백질과 최근 유행하고 있는 Akabane 바이러스를 혼합한 불활화 백신 생산 체계 확립
  - 기존의 상용화된 백신과 재조합 단백질이 함유된 백신과의 효능 비교 평가
- 돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장적용
  - 돼지소모성질환 농장단위 질병발생 모니터링
  - 질병발생 위험지도(Farm disease risk assessment mapping) 작성을 통한 기본 방제 대책 수립
  - 돼지소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 초유대용제 개발(위탁과제 공동수행)
  - 자돈의 돼지 소모성질환 병원체 제어용 경구첨가제 및 스트레스완화제 개발 및 시제품 생

산(위탁과제 공동추진)

- 모돈 및 자돈 성장단계별 질병발생 제어에 적합한 맞춤형 면역증강 프로그램 개발
- 양돈장의 질병발생 유형별 맞춤형 국내 양돈장 적용 프로그램 개발 및 보급
- 동물질병제어를 통한 축산식품 유래 위해물질 제어기술 개발
  - 국내 축산 현장의 병원성 세균 및 지표세균의 오염 실태 분석
  - 축산물 유래 주요 세균의 항생제 내성실태 조사 및 내성 유전자·병원성 유전자 분석
  - 축산 현장에서 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석 및 예방 대책을 위한 가이드라인 확립
  - NK34의 항균력 측정
  - 알칼리미네랄/ 천연미네랄/ 혼합제제 비특이 면역물질의 면역 증강 효과 확인
  - 산업화에 적용 가능한 후보물질 선택
  - 항생제 대체물질이 함유된 시제품 생산

#### IV. 연구개발결과

- 소 바이러스성 설사증(BVD)근절 프로그램 개발
- BVDV 지속감염우(PI) 현장 검출 진단용 키트 개발
- 년도별 소의 소모성 질병 진단 추이
- BVDV 불활화 백신에서 항원진단법 확립
- 국내 야외 BVDV의 분리
- BVDV E2 재조합 배큘로 바이러스의 작성
- BVDV의 특이 항체 생산
- 국내 사용 중인 아까바네 생백신주의 분자생물학적 평가
- 국내 남부지역에서 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 항체가 조사
- 국내 소에서 신종 소 파라인플루엔자 5형 감염증 확인
- 개량된 아까바네 및 유행열 혼합 불활화 백신의 개발
- 소모성 질환을 일으키는 소 바이러스에 대한 ribavirin의 바이러스 억제능 조사
- 돼지소모성질환 유발 핵심 병원체 수집 및 특성 조사
- PCV2, PEDV 유효 항원 생산 및 선발
- 주요 돼지소모성질환 병원체(항원)를 이용한 난황항체 및 젖소 초유항체 생산
- 돼지소모성질환 제어용 난황항체 및 초유항체 제제(면역복합제제) 시제품 생산
- 국내 양돈현장의 세균 오염 실태 조사
- 항생제 대체물질 후보군의 면역증강능력 평가
- 항생제 대체물질의 사료첨가제 시제품 생산

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 한우개량사업소와 연계하여 국내 한우농가에 BVDV 근절 프로그램 적용을 통한 농가 생산성 향상
- BVDV 현장 진단 키트 산업화를 통한 수출 및 수입진단키트 대체
- BVDV 근절프로그램 등을 국가정책 제안 건의
- 소 유산 관련 원인체에 대한 분석자료를 농가, 동물병원등 관련업체에 배포하여 농가내 질

병컨트롤에 이바지

- 개선된 소 Akabane 불활화 백신 산업화
- 돼지소모성질환 제어를 위한 젓소 초유항체제 제조방법 특허 등록
- 돼지소모성질환 제어를 위한 면역복합제(백신기능) 산업화
- 돼지소모성질환 저감을 위한 면역증강 사양프로그램 보급
- 국내 양돈 현장 내 유해미생물 제어를 위한 항생제 대체물질의 사료첨가제로의 적용 및 산업화

## SUMMARY

I. Title : Application of novel eradication programs for livestock wasting disease on a farm level

II. Objectives and necessities of the research and development

- Improvement of farm performance through the control of livestock wasting disease
- Contribution to BVDV control through the BVDV eradication program
- Improvement of immunity–boosting management for controlling porcine wasting diseases
- Contribution to disease control through commercialization of development products

III. Contents and extents of the research and development

- Survey of BVDV prevalence and analysis of the effect after the application of BVDV eradication program
- Development of BVDV PI Antigen detection kit
- Analysis of reproductive disorders in cattle
  - construction of monoclonal antibody against BVDV and purification
  - improvement of diagnostic methods about Akabane and BVDV
  - Expression of recombinant Akabane viral protein in Baculovirus system
  - Construction of system related with inactivated Akabane vaccine
  - Compare the newly developed vaccine with commercial vaccine
- Development and application of immunity–boosting management for controlling porcine wasting diseases
  - Monitoring of wasting diseases for pig farms
  - Establishment of basic control measure by farm diseases risk assessment mapping
  - Development of hyperimmune–IgY and cattle colostrums that control major pathogens of porcine wasting diseases
  - Development of oral additives and stress reliever that control wasting diseases of piglet
  - Development and application of immunity–boosting programs customized for growth stages for controlling porcine wasting diseases
- Investigation on development of control technique to hazardous materials originated from livestock products through animal disease control
  - Analysis of pathogenic and indicative bacteria of domestic animal husbandry
  - Analysis of antimicrobial resistance pattern of bacteria isolated from animal husbandry and their gene and virulence gene
  - Guideline establishment for analysis of critical contamination point for control of

bacterial diseases and prevention method

- Identification of antibacterial activity of NK34
- Validation of enhancement of protective effect of alkali/ natural/ mixed mineral nonspecific immunostimulator
- Possible candidate group selection for commercialization
- Production of supplementary feed contained alternative materials of antimicrobials

#### IV. Results of the research and development

- After the application of the BVDV eradication program, PI farms and PI cattle decreased 54 % and 68%, respectively.
- The developed BVDV Ag detection kit showed 100% sensitivity and specificity when applied 30 field samples
- The survey of bovine wasting disease diagnosis cases in Korea annually
- Diagnostic method of BVDV antibody from inactivated BVDV vaccine
- Isolation of BVDV in field
- Production of recombinant Akabane viral protein in Baculovirus expression system
- Production of specific monoclonal antibody against BVDV
- Molecular biological assessment of attenuated Akabane vaccines in Korea
- Survey of antibody of Akabane and bovine ephemeral fever in southern Korea
- Confirmation of infection of parainfluenza 5 type at Korean cattle.
- Improvement of inactivated vaccine for Akabane virus and BEF virus
- Investigation of inhibitory ability of ribavirin to virus causing wasting disease in cattle
- Collection of major pathogens causing porcine wasting diseases and investigation of their characteristics
- Production and selection of effective antigens for PEDV and PCV2
- Production of hyperimmune-IgY and cattle colostrums that control major pathogens of porcine wasting diseases
- Production of experimental immunity-boosting material for controlling porcine wasting diseases
- Analysis of pathogenic and indicative bacteria isolated from animal husbandry
- Validation of enhancement of protective effect of candidate group
- Production of supplementary feed contained alternative materials of antimicrobials

#### V. Results and plan for application of the research

- Development of effective BVDV eradication program
- Development of BVDV Antigen detection kits
- Offer the information of the bovine abortion-related disease to farms

- Transfer technique of improved inactivated Akabane vaccine
- Registration of patent for antibody composition of bovine colostrum for treating or preventing porcine wasting diseases
- Industrialization of immunity–boosting material for controlling porcine wasting diseases
- Supply of immunity–boosting programs customized for growth stages for controlling porcine wasting diseases
- Commercialization and application of supplementary feed contained alternatives of antimicrobials for harmful organism control in farm.
- Suggestion of preventive measures policy on swine wasting diseases

CONTENTS  
(영 문 목 차)

<b>Study 1. Development of BVD eradication program and BVDV Antigen detection kit</b>	10
-----	
1. Introduction	
2. The present technology	
3. Contents and results of development	
<b>Study 2-1. Development of preventive measures and analysis for bovine reproductive diseases</b>	49
-----	
1. Introduction	
2. The present technology	
3. Contents and results of development	
<b>Study 2-2. Development and application of immunity-boosting management for controlling porcine wasting diseases</b>	90
-----	
1. Introduction	
2. The present technology	
3. Contents and results of development	
<b>Study 3. Investigation on development of control technique to hazardous materials originated from livestock products through animal disease control</b>	127
-----	
1. Introduction	
2. The content and extent of research and development	
3. Contents and results of development	
4. Achievement ratio	172
-----	
5. Further application plan	176
-----	
6. Scientific and technical information	186
-----	
7. Reference	189
-----	

<제1세부>

## 국내 소 바이러스성 설사병 근절 프로그램 개발 및 BVDV 항원현장검사 키트 개발

### 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “가축 소모성 질환 근절방안 및 농가 적용 프로그램 개발에 관한 연구” 과 구”)의 보고서로 제출합니다.

2104년 9월 17일

주관연구기관명 : (주)메덱스

주관연구책임자 : 김경동

세부연구책임자 : 김경동

연 구 원 : 박홍제

연 구 원 : 조종숙

연 구 원 : 홍성희

연 구 원 : 서창원

연 구 원 : 류희정

연 구 원 : 신령자

# 요 약 문

I. 제 목 : 국내 소 바이러스성 설사병 근절 프로그램 개발 및 BVDV 항원현정검사 키트 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 바이러스성 설사증 근절프로그램을 개발 및 소 바이러스성 설사증 현장 검사용 진단 키트를 개발하여 농가 생산성 향상에 기여

III. 연구개발 내용 및 범위

<제1세부>

- 농협소속 한우 목장을 대상으로 한 소 바이러스성 설사증 감염실태 파악, 근절 프로그램 적용 및 효과 분석
  - 한우개량사업소와 연계된 목장별 시료채취 및 분석(위탁과제 공동수행)
  - 설사병근절 프로그램 적용 지도
- BVDV 지속감염우(PI) 항원검사 위한 현장 검사용 키트 개발
  - 바이러스(BVDV) 특이적인 항체를 이용한 최적화 키트 개발 및 생산 조건 수립
  - 현장 적용 가능한 키트와 ELISA 검사법에 대한 비교 평가 및 현장 적용

IV. 연구개발결과

- 27개농장에 대하여 3년동안 지속적으로 소바이러스 설사증 (BVD)에 대한 항원 및 항체를 통해, 소 바이러스 설사증의 감염실태를 조사하였다. 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램이 진행됨에 따라 1차년도 참여농가의 43%에서 BVDV 지속감염우가 검출된 것에 비해, 3차년도에는 참여농가의 19%에서만 BVDV 지속감염우가 검출되었으며, BVDV 지속감염우의 검출율도 0.63%에서 0.21%로 떨어졌다. 또한 2차 및 3차년도에 검출되는 BVDV 지속감염우에 대한 원인분석 및 백신접종에 대한 조사를 실시하여 효과적인 소 바이러스 설사증 근절 프로그램을 만들었다.
- BVDV PI 검출 개발키트는 BVDV type에 관계없이 100%의 특이도와 민감도를 갖는 키트였으며 필드샘플을 통해 기존 스크리닝 방법인 ELISA 방법과 비교하였을 때 동일한 결과를 얻었으며 신생우 등에 대한 빠른 검사를 위하여 목장 현장에서 바로 검사가능한 키트임을 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 한우개량사업소와 연계하여 국내 한우농가에 BVDV 근절 프로그램 적용을 통한 농가 생산성 향상
- BVDV 현장 진단 키트 산업화를 통한 수출 및 수입진단키트 대체
- 국가단위의 BVDV PI 근절 프로그램 적용 등(정책제안)

## SUMMARY

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is very important disease in domestic and wild ruminants and has a worldwide distribution. Cattle persistently infected with BVDV (BVDV-PI) are the primary reservoir for BVDV infection in Korean native cattle herds. BVDV eradication program of the detection and elimination of BVDV PI cattle from the farm applies and analyzes the results before and after. Before the program, 13 farms out of 30 farms were BVDV PI farms(43%) and 17 cattle out of 4,446 cattle were BVDV PI cattle(0.65%). After the program, 5 farms out of 27 farms were BVDV PI farms(19%) and 9 cattle out of 4,248 cattle were BVDV PI cattle(0.21%). The prevalence of cattle persistently infected with decreasing BVDV (BVD-PI). The most causes of BVDV PI cattle after the application of the program were the delayed removal of BVDV PI cattle and BVDV PI fetus in the pregnant cattle. This data demonstrates BVD eradication program is effective to control BVDV.

Also, we developed rapid kit for detection of BVDV antigen using the BVDV specific monoclonal antibodies. The developed kit showed 100% sensitivity and specificity when applied 30 field samples. The rapid kit was compared with IDEXX ELISA antigen kit with field samples and is considered to be applicable as a field diagnostic method to eradicate BVD virus.

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
제1절	개요	14
제2절	연구개발의 목표	15
제3절	연구개발의 필요성	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제1절	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발	18
1.	소 바이러스성 설사증 감염 현황 모니터링	
2.	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발 연구 요약	
3.	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램	
4.	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 제안안	
제2절	BVDV 항원현장검사키트 개발 조건 확립	33
1.	항체준비	
2.	키트조건 확립	
제3절	BVDV 항원 검사키트 시제품 제작 및 현장적용시험	40
1.	시제품키트 제작	
2.	시제품 키트 평가	
3.	결론	

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 개요

소 바이러스성 설사(Bovine viral Diarrhea, BVD)는 가축 및 야생 반추류에서 전 세계적으로 발생하여 설사, 번식 장애 등을 일으켜 많은 피해를 주는 전염병이다 [2, 3, 6, 11]. 우리나라 양축가들은 질병이름 “소 바이러스성 설사(BVD)”으로 인하여 소에게 설사를 일으키는 질병중 하나로 치부되어 그 실제적인 경제적 피해를 인식하지 못하고 있으며, 그로 인하여 적절한 BVD방역체계를 구축하지 못하고 있다. 이러한 질병의 피해를 막기 위하여, BVDV 근절 프로그램 및 BVD의 주 감염원인으로 지목되는 “BVD 지속감염우”을 현장에서 식별하는 진단방법이 필요하다.

BVDV는 체내에 침입 후 혈액을 통해 신경계, 림프조직, 소화기, 호흡기계, 피부 등 전신으로 침입하며, BVDV에 감염된 소는 외관상 증상을 나타내지 않거나 생식기계 또는 그 이상의 체내 기관에 침입하여 높은 폐사율을 나타내는 등 다양한 증상을 나타낸다 [1, 4]. 특히 암소는 비세포변성형 바이러스가 생식기에 감염될 경우 태아감염으로 진행되며 감염된 임신 시기에 따라 배아사망으로 인한 재발정, 유산, 사산, 선천성 기형 송아지의 출산과 지속적인 농장의 감염을 일으키는 지속감염 송아지(persistently infected calves, PI)를 출산하게 되는데, 주로 임신 42일에서 125일 사이에 임신우가 비세포변성형 BVDV에 노출될 경우에 태반감염되며, 생존한 PI는 BVD바이러스에 면역관용 상태이며 살아있는 동안 지속해서 바이러스를 배출하게 된다 [7]. BVD PI는 동일개체에서 3~4주 간격으로 검사하여 바이러스가 분리되는 소를 말하며 BVD의 주요 전파요인으로 농장내 BVD근절을 위해 가장 먼저 색출하여야 한다 [5, 6, 12, 16]. 지속감염우의 감염률은 우군내 0.1~1.8%의 비율로 존재하며, 이러한 PI 차이는 우군의 구성, 우사의 구조, 백신여부 등에 기인한 것으로 하였다 [8]. 지속감염우의 낮은 감염률에도 불구하고 세계의 많은 국가들이 BVDV 근절 또는 컨트롤을 위하여 농장에서 지속감염우를 감별하여 우군에서 제거하고 있다. 이러한 이유는 BVD바이러스가 우군내에서 미치는 경제적 피해가 막대하기 때문이다. BVDV에 의한 경제적 피해는 북미에서 연간 백만두의 송아지 생산을 기준으로 우군상태 및 BVDV의 병원성과 감염률에 따라 1~4천만 불의 경제적 손실이 있는 것으로 보고되고 있으며, BVD바이러스에 의한 농장의 경제적 피해 분석에 대한 다수의 연구가 발표되었다 [9, 10, 14]. 이러한 연구를 기반으로 하여, 많은 국가에서 BVD바이러스 근절 또는 컨트롤 프로그램을 적용하고 있다. 1990년대 스칸디나비아국가들(노르웨이 등)은 BVDV에 sentinel 역할을 할 수 있는 연령대(8~12개월령 등) 또는 Bulk milk에 항체검사를 실시 후 항원검사를 실시하는 BVD근절프로그램을 실시하여 현재 BVDV free 또는 BVDV free에 근접하고 있으며, 오스트리아의 경우 1997년도에 일부 지역이 실시하였으며 2004년도에 전 지역으로 확대 적용하고 있다 [13]. 스위스의 경우 2008년도에 항체검사 없이 BVD 항원검사를 실시하여 지속감염우를 검출하는 3단계 BVDV 근절캠페인을 실시하고 있으며, 1단계에서 1.5백만의 소가 검사되어 12,000마리의 지속감염우를 식별하여 농장에서 제거하였으며, 캠페인을 실시한 지 3년도 지나지 않아 신생우에서 지속감염우의 검출율이 95%감소되었다 [15]. 독일의 경우 일부지역의 성공적인 BVDV 프로그램에 따라 2011년 1월에 전지역으로 확대되었으며, 모든 신생우에 대하여 항원검사를 실시하여 지속감염우로 확정된 소를 7일내에 제거 및 이동이 제한했다. 또한 일부국가에서는 BVDV 사독백신 및 생독백신을 BVDV 컨트롤에 적용하고 있다 [13].

본 연구는 여러나라에서 실시되고 있는 BVDV 근절프로그램을 토대로, 국내 농협중앙회 육종농가 및 자발적 참가농가를 대상으로 BVDV 근절프로그램을 적용한 참여농장의 BVD현황을 분석하여 BVDV 근절프로그램안을 만들었다. 또한, BVDV 감염우 검출에 필요한 진단키트는 외국에서 개발된 ELISA 항원 키트가 국내뿐만아니라 전세계적으로 사용되고 있으며, 국내에서는 아직 활발한 연구개발이 이루어지지 않고 있으며, 현장에서 바이러스 항원을 검사할 수 있는 진단키트가 없는 상황이다. 본 연구를 통해서 BVDV 특이적 단클론 항체를 개발하여 현장에서 혈액, 조직에서 바이러스 검사를 할 수 있는 rapid kit를 개발완료하고 기존검사법과 비교시험을 통해 개발키트를 평가하였다.

## 제2절 연구개발의 목표

### 1. 연구개발의 최종목표

- 가. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발
- 나. BVDV 지속감염우(PI) 현장 검출 진단용 키트 개발

### 2. 주요개발 내용

- 가. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발
  - (1) BVDV 세미나 등을 통해 농가의 자발적 BVDV 프로그램 참여 유도
  - (2) BVDV 감염현황모니터링 : BVDV프로그램 참가 농장의 소 3,000두에 대해 BVDV 항체 검사 및 BVDV 항원검사
  - (3) 검사결과에 대한 분석 및 BVDV 프로그램 참가농가에 대한 BVDV 컨설팅
  - (4) BVDV 항원미검사 신생우 및 입식우를 계속적으로 검사
  - (5) BVDV 항체검사를 통한 농장현황 파악
  - (6) 최종농가평가
- 나. BVDV 지속감염우(PI) 현장 검출 진단용 키트 개발
  - (1) 항체개발
  - (2) 키트조건 확립
  - (3) BVDV 항원 검사키트 시제품 키트 제작 및 현장적용시험

## 제3절 연구개발의 필요성

### 1. 경제적 측면의 필요성

- 가. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발
  - (1) 축산업 경제적 피해
    - ① 국내 대부분의 축산농가에 바이러스 및 세균성 질병이 만연되어 있음
    - ② 국내 40% 이상의 축산 농가에서 바이러스질병으로 인한 집단 폐사 및 가축 생산성 저하에 의해 경제적 피해가 매우 심각함
    - ③ 특히 소 바이러스성 설사증을 야기하는 바이러스(BVDV)의 경우 지속감염우(PI)를 생산하여 축산농가의 피해는 물론 국가적으로 연간 천억원이상의 손실을 야기하고 있으며, 세계의 많은

나라들이 BVDV에 대한 경제적 손실을 평가하여 각 나라에 적합한 BVDV 근절 또는 컨트롤 프로그램을 적용하고 있음. (젖소 두당손실액 20~88.75\$, 육우 두당손실액 15.33~41.17\$)

- ④ BVDV 지속감염우(PI) 제거 없는 백신정책은 성공할 수 없으며, 그 실효를 거두기 어려우므로 지속감염우(PI)를 식별 후 제거하는 등 지속적인 차단방역이 필수적임
- ⑤ 위의 경제적피해를 최소화하기 위한 BVDV 근절 프로그램 필요함

나. BVDV 지속감염우(PI) 현장 검출 진단용 키트 개발

- ① 실험실이 아닌 농장 현장에서 BVD 항원을 감별할 수 있는 진단법 필요
- ② 국내에서 사용중인 PCR 및 수입진단키트 대체 및 수출 가능성

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

소 바이러스성 설사증을 제어하기 위해서는 소 바이러스 설사증의 주 감염원인 BVD 지속감염우를 우군에서 검출 후 제거하는 것이 필수적이며, 이를 위해서는 BVD 지속감염우를 검출하는 진단 방법 및 효과적으로 우군을 관리하는 것이 필요하다. BVD 지속감염우를 검출하기 위해 BVDV를 진단하는 것이 중요하며, 현재 국내외로 PCR 및 ELISA Ag Test kit 등이 다수 개발되어 있으며, 주로 실험실 장비가 구비된 실험실에서 검사가 이루어지고 있다. 또한 우군에 대하여 BVD를 관리 프로그램은 각 나라별로 백신접종을 하지 않고 장기간 및 단기간에 걸쳐 BVDV free를 만드는 프로그램. BVD 지속감염우를 검출·제거후 백신접종을 권장하면서 BVDV free에 접근하는 프로그램 등 다양한 방법이 시도되고 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발

#### 1. BVD 감염 현황 모니터링

##### 가. 참여농장

자발적 BVDV 근절 프로그램에 참가하는 목장은 프로그램의 진행에 따른 농장평가를 위하여 동일 농장이 3년간 참여하도록 권장하였다. 사업에 참여한 30개 농장 중 3개 농장은 1차 년 사업이후 참여하지 않았으며, 총 27개 농장이 3년 동안 계속적으로 참여하였다. 참가농장은 3년 동안 BVD 항원 및 항체를 검사를 년 1회 검사하였으며, 신생우에 대하여 BVD 항원 검사를 원하는 농가에 대해서는 신생우 항원검사를 수시로 실시하였다. 참여농장지역을 살펴보면 강원 4개, 경기 4개, 경남 3개, 경북 4개, 전남 4개, 전북 4개, 충남 2개, 충북 2개 농장으로 총 8개 지역에서 참여했으며, 1차년도 30개 소농장 4,446두에 대하여 항원 및 항체검사를 실시하였으며, 2차년도 27개소농장 4,594두 항원검사, 3,521두 항체검사 그리고 3차년도 27개소농장에서 항원검사 4,248두 및 항체검사 3,500두를 실시하였다.

표1. 참여목장 현황

년도	구분	계	강원	경기	경남	경북	전남	전북	충남	충북
1차 년도	목장수 (호)	30	4	5	3	4	4	4	4	2
	항원검사 (두수)	4,446	630	502	459	679	531	879	362	404
	항체검사 (두수)	4260	617	424	438	672	528	861	350	370
2차 년도	목장수 (호)	27	4	4	3	4	4	4	2	2
	항원검사 (두수)	4,594	594	525	433	730	613	999	280	420
	항체검사 (두수)	3,521	492	417	350	549	481	738	207	287
3차 년도	목장수 (호)	27	4	4	3	4	4	4	2	2
	항원검사 (두수)	4,248	471	363	456	767	621	875	279	416
	항체검사 (두수)	3,500	444	313	381	611	507	711	243	290

##### 나. BVDV 참여목장의 시료 채취 내역

BVDV 항원검사는 농장내 시료채취가 가능한 개체에 대해 혈액 및/또는 귀조직을 연령별로 채취하여 실시하였으며, 항체검사의 1차 년도에는 전두수에 대하여, 2차 및 3차 년도에는 6개월상에서 혈청으로 BVDV 항체검사를 실시하였다. 1차 검사에서 BVDV 항원양성인 개체에 대해서 1차 시료채취 3~4주 후 채혈 및 귀조직을 재채취하여 BVDV지속감염우(PI cattle)를 확인하였다. (표2). 시료의 연령별 분포도는 총 13,324두 중 시료내역이 불명확한 개체 457

두(3%), 6개월 이하 2,432두(18%), 12개월 이하 1,617두(12%), 18개월 이하 1,222두(9%), 24개월 이하 1,494두(11%), 36개월이하 2,193두(16%), 36개월초과 3,909두(29%)이다.

표2. 소 연령별 분류

	연령	계	unknown	≤6개월	≤12개월	≤18개월	≤24개월	≤36개월	>36개월
계	시료(두수)	13,324	457	2432	1617	1222	1494	2193	3909
	(%)	100%	3%	18%	12%	9%	11%	16%	29%
1차년도	시료(두수)	4,446	186	846	572	427	420	688	1,307
	(%)	100%	3%	19%	13%	10%	10%	16%	30%
2차년도	시료(두수)	4,594	199	874	643	362	534	713	1,269
	(%)	100%	4%	19%	14%	8%	12%	16%	28%
3차년도	시료(두수)	4,284	73	711	402	433	540	792	1,333
	(%)	100%	2%	17%	9%	10%	13%	18%	31%

#### 다. 검사방법

혈청 및/또는 귀조직을 BVDV 항원검사(ELISA)를 실시하였고, 혈청시료를 이용하여 BVDV 항체검사(ELISA)을 실시하였다.

표3. 질병검사방법

질병명	항원검사법	항체검사법
소 바이러스 설사병(BVD)	ELISA	ELISA

#### 라. BVDV프로그램 참여 목장에 대한 항원.항체검사 세부 결과

BVDV 항원검사를 통해 BVDV 지속감염우검출목장(PI farm) 및 지속감염우(PI) 현황을 조사하고, 연령별 검출율, 1차년도의 지역별 검출현황 등을 분석하였으며, BVDV 항체검사를 통해 목장 평균 BVDV 항체양성율, BVDV 지속감염우검출목장(PI farm) 평균항체양성율, 미검출목장(Non PI farm) 평균항체양성율 등의 조사를 통해 BVDV 항체현황을 조사했다. 또한 지속감염우가 검출된 목장에 대하여 지속감염우를 우군에서 분리 또는 도태를 권장하여, 지속감염우가 제거된 우군 또는 제거되지 않은 우군에 대하여 비교분석하였다.

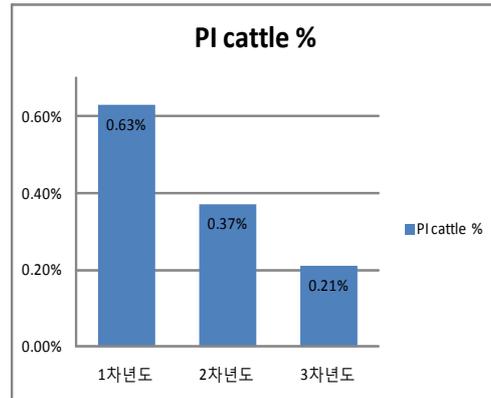
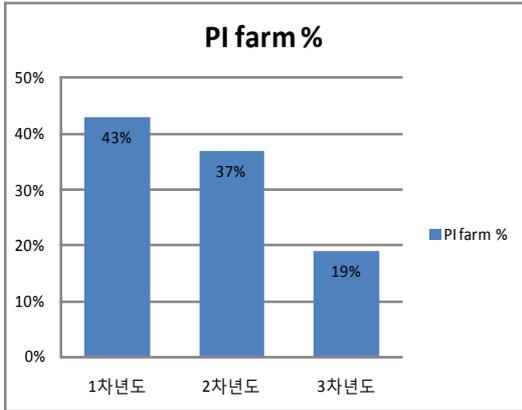
#### (1) BVDV 지속감염우 현황

##### ① 년도별 BVD 지속감염우 현황

BVDV 지속감염우검출목장(PI farm)은 1차년도는 30호 목장 중 13목장(43%), 2차년도 27호중 9호(33%), 3차년도 27호중 5호(19%), BVDV 지속감염우(PI)은 1차년도 4,446두 중 28두(0.63%)이며, 2차년도 4,593두 중 16두(0.35%), 3차년도 3 4,593두 중 9두(0.21%), 조사되었다. 프로그램진행과 함께 BVD의 주감염원인 PI cattle이 우군에서 제거됨에 따라 점차로 PI farm 및 PI cattle 검출율이 감소되었다.

표4. 년도별 BVDV 지속감염우 현황

구분	농장(호)	PI farm	(%)	검사두수	지속감염우 (두수)	(%)
1차년도	30	13	43%	4,446	28	0.63%
2차년도	27	10	37%	4,594	17	0.37%
3차년도	27	5	19%	4,248	9	0.21%



그래프1. 년도별 PI farm % 및 PI cattle %

② BVDV 지역별 감염현황

지역별 감염현황은 살펴보기 위하여 BVD 근절프로그램을 적용적인 1차년도의 지역별 검출 현황을 살펴보았다. 지역별PI farm은 경남 100%, 경기 60%, 경북 및 충북 50%, 나머지 지역은 25%으로 나타났으며 검출율의 차이는 있으나 모든 지역에서 PI cattle이 검출되었다.

표5. 1차년도 지역별 검출현황

지역	목장(호)	PI farm	(%)	검사두수	지속감염우 (두)	(%)
계	30	13	43%	4446	28	0.63%
강원	4	1	25%	630	3	0.48%
경기	5	3	60%	502	3	0.60%
경남	3	3	100%	459	9	1.96%
경북	4	2	50%	679	7	1.03%
전남	4	1	25%	531	2	0.38%
전북	4	1	25%	879	1	0.11%
충남	4	1	25%	362	2	0.55%
충북	2	1	50%	404	1	0.25%

③ 지속감염우 연령별 분포

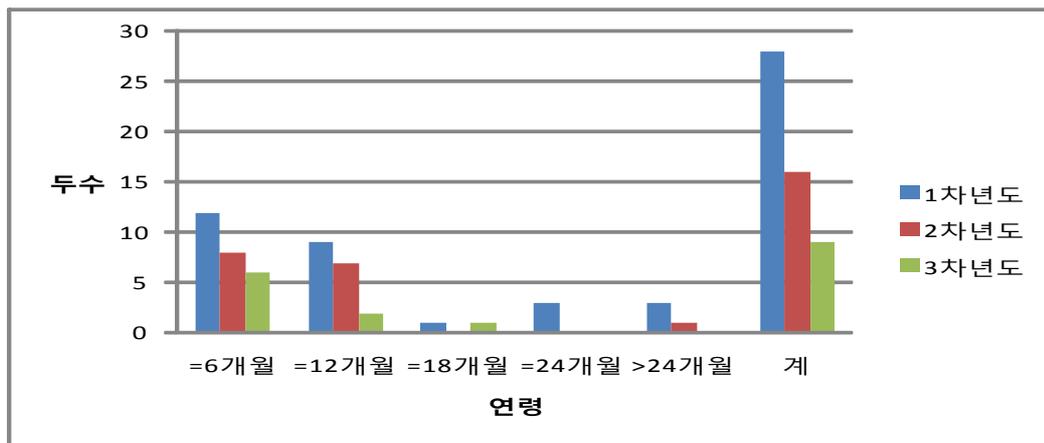
지속감염우의 연령별 분포도는 지속감염우 총 53두 중 6개월 이하 26두(49%), 12개월이하 18두(34%), 18개월 이하 2두(4%), 24개월 이하 3두(6%), 36개월 초과 4두(8%)이다. 프로그램적용전인 1차년도에의 연령별 검출율에서 살펴보면 총 28두중 12개월 이하의 지속감염우는 21두(75%) 나머지 개월에서 7두(25%)로 나타나며, 이는 지속감염우의 경우 연령이 증가됨에 따라 생존율이 떨어지는 것을 볼 수 있다. 또한 2차 및 3차년도에서 지속감염우의 90% 이상이 12개월이하에서 검출되었으며, 12개월초과의 PI cattle은 전차년도에 PI cattle로 확인된 소가 계속적으로 농장에 잔류되었음이 밝혀졌다. 이는 BVD 항원검사 시점이후에 PI 송아지를 임신한 암소에 의해 PI송아지가 출산되었음을 보여주며, BVD PI cattle 검출 후 BVD PI cattle이 우군에서 제거되어도 태어나는 송아지에 대해서 지속적인 BVD 항원검사를 통하여 BVD PI 송아지를 제거하여야 함을 말해준다.

표6. 연령별 BVDV 지속감염우

(단위:두)

연령	계	≤6개월	≤12개월	≤18개월	≤24개월	>24개월
계	53(2*)	26(49%)	18(34%)	2(4%)(1*)	3(6%)	4(8%)(1*)
1차년도	28	12(49%)	9(32%)	1(4%)	3(11%)	3(11%)
2차년도	16(1*)	8(50%)	7(44%)	0	0	1*(6%)
3차년도	9(1*)	6(67%)	2(22%)	1*(1%)		

\*전차년도 지속감염우로 확정 후 농장내 지속 존재



그래프 2. 연령별 BVDV 지속감염우 분포도

④ 백신접종현황

참여농장의 BVDV 백신접종현황을 살펴보기 PI cattle이 3년동안 1회이상검출된 농장들을 PI farm\*으로, 3년동안 PI cattle 이 검출되지 않은 농장을 Non PI farm\*\*으로 분류하였다. non PI farm\*\* 10호 중 5호(50%)는 매년 백신접종, 5호(50%)는 3년동안 백신을 접종하지 않았다. 그리고 PI farm\* 10호의 경우 매년 BVDV 백신접종농가는 6호(35.3%), 3년동안 1회이상 접종한 농장은 4호(23.5%), 백신을 접종하지 않은 농가는 7호(41.2%)이다. 백신접종에 따른 PI farm 과 Non PI farm의 큰 차이점은 찾아내지 못했다

표7. 백신접종현황

구분	계	매년접종 (3년)	1회이상접종 (3년)	미접종 (3년)
계	27호	11호(41%)	4호(15%)	12호(44%)
PI farm*	17호	6호(35%)	4호((24%)	7호(41%)
Non PI farm**	10호	5호 (50%)		5호 (50%)

PI farm\* : 3년동안 1회이상 PI cattle 검출된 농장

Non PI farm\*\* : 3년동안 PI cattle 미검출된 농장

⑤ 지속감염우 증상

BVDV는 체내에 침입 후 혈액을 통해 신경계, 림프조직, 소화기, 호흡기계, 피부 등 전신으로 침입한다. BVDV에 감염된 소는 외관상 증상을 나타내지 않거나 생식기계 또는 그 이상의 체내 기관에 침입하여 높은 폐사율을 나타내는 등 다양한 증상을 나타낸다. 이와 같이 저체중 및 임상증상을 나타내는 지속감염우뿐만아니라 외관상 정상우와 유사한 지속감염우 등이 조사되었으며, 또한 PI모우에서 출산된 PI송아지도 검출되었다. 또한 지속감염우가 존재하는 우군의 경우 BVDV 순환으로 인해 우군내 질병정도 심화된다.

<저체중 및 왜소한 체격의 지속감염우>



<정상체중의 지속감염우>



<PI모우에서 PI송아지 출산사례>

지속감염우 (48개월: - 우측 송아지의 모우)

지속감염우 : 정상신생우 체중의 1/2로 출산



<지속감염우가 존재하는 우군의 송아지 피해사례>

: 목장내 BVDV 순환으로 인해 송아지 질병정도 심화 - 설사, 버짐, 폐렴 등



그림 1. 지속감염우

#### ⑥ BVDV 근절프로그램 진행에 따른 농장의 변화

BVD근절프로그램 진행에 따른 농장의 변화를 분석하기 위하여 3년동안 연속적으로 이 사업에 참가한 27개 농장 중 PI가 1회이상 검출된 17호을 대상으로 하여, BVDV프로그램을 적용한 2차 및 3차년도의 PI cattle 원인을 분석하였다. BVD 근절프로그램에서 가장 중요한 것은 PI cattle 검출 및 우사내에 PI cattle의 제거이다. 매년 BVD 항원검사 후 그 결과를 농장에 송부였으며, 검출된 PI cattle을 우사내에서 제거 및 차후 출산되는 송아지의 BVD 항원검사를 권장하였다.

PI cattle 검출상황에 따라 4개 group으로 나누었으며, <group 1>은 1차년도에만 1회 검출된 농장, <group 2> 1차 & 3차년도 PI cattle 검출여부와 상관없이 2차년도에 검출된 농장, <group 3>은 3년동안 지속적으로 PI cattle 검출된 농장, <group 4>는 3차년도 1회 검출된 농장으로 분류하였다. BVDV 감염원인을 찾아보기 위하여 2차 및 3차년도에 검출된 지속감염우의 연령 및 전차년도에 검출된 PI cattle의 우사내 제거시점 등을 조사하였다. 1차년도만 PI cattle이 검출된 <group 1> 농장들의 경우 지속감염우 판명 후 빠른 시일내에 폐사, 분리, 도태 등에 의해 우사에서 PI cattle 제거되었으며, 이 6호 중 3호는 지속적인 신생송아지의 BVD 항원검사를 통하여 출산된 PI 신생우를 즉시 분리 또는 도태시켜 BVD 항원이 우사내에서 순환되는 것을 최소화하였다. <group 2>의 경우 1차 및 2차년도에 PI송아지가 임신된 상태이거나 우사내에서 이미 확인인 PI cattle제거가 늦은 농장이었다, 3차년도동안 지속적으로 PI cattle 검출된 <group 3>의 경우, 지속감염우로 판명되어도 번식우사내에 지속감염우를 잔류시켜 계속적으로 BVDV가 번식우에서 순환되어 PI cattle이 계속적으로 생산되었다. <group 4>의 3차년도에 1회 검출된 농장의 경우 원인이 명확하지 않으며 외부요인에 의해 감염되었을 것으로 추측하고 있다. 이는 PI cattle의 확인 후 빠른 시일내에 우사에서 제거됨과 동시에 임신된 PI 송아지의 검출을 위하여 우군에 대한 1차 BVD 항원검사 후 지속적으로 태어나는 신생우에 대하여 BVD 항원검사를 실시하여야 됨을 말해준다. 아울러, 외부의 감염위험을 방지하기 위하여 새로 입식되는 소, 정액 등에 대하여 BVDV free임이 증명되어야 한다.

표8. 2차 및 3차년 년도 PI cattle 발생원인

	구분		PI cattle 검출			
	년도	계	1차년도	2차년도	3차년도	
	group	호(%)	17호	13호	9호	5호
PI farm	group 1	6호(35%)	6호	○	×	×
			5호	○	○	×
	group 2	8호(47%)	2호	×	○	○
			1호	×	○	×
	group 3	2호(11%)	2호	○	○	○
	group 4	1호(6%)	1호	×	×	○

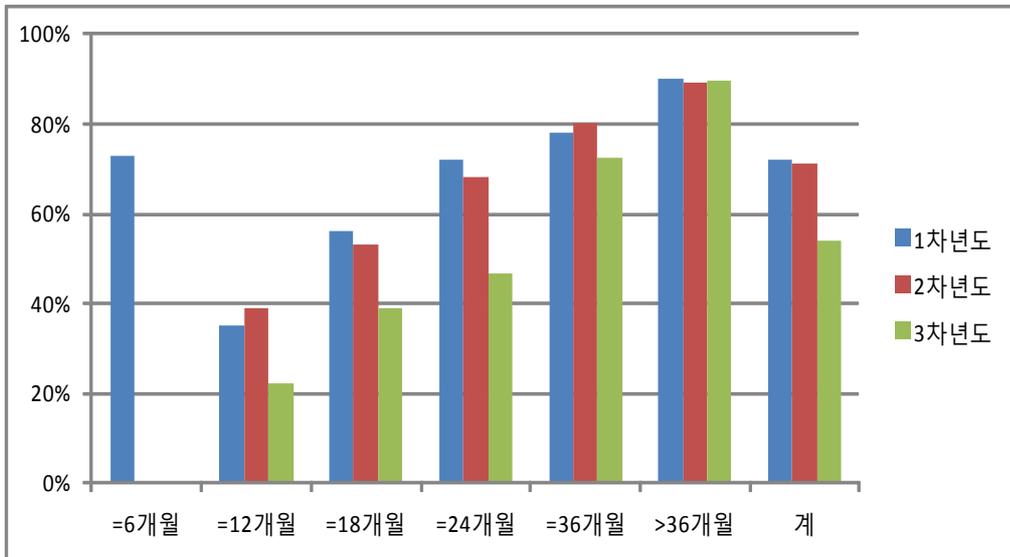
(2) BVDV 항체분석

① BVDV 항체검사

BVDV 항체는 1차년도는 0개월부터, 2차 및 3차년도는 6개월 이상에서 시료내역이 확인된 개체에 대하여 1차년도 4,260두, 2차년도 3,510두 및 3차년도 3,500두에 대해 분석하였다. 1차년도 항체양성률은 72%, 2차년도 71%, 3차년도 65%으로, BVD 근절프로그램이 진행됨에 따라 항체양성율이 감소됨을 알 수 있으며, 연령별로는 6-18이하에서 1차년도 항체양성율이 35%가 3차년도 22%로 13%감소되었으며, 12-18개월이하에서 1차년도 56%에서 3차년도 39%로 17% 항체양성율이 감소되었으며, 18-24개월이하에서 1차년도 72%에서 3차년도 47%로 25% 항체양성율이 감소되었음을 볼 수 있다, 이는 BVD 근절프로그램으로 인해 BVDV감염의 주원인인 PI cattle 의 우사내 제거에 의해 농장에서 BVDV 순환이 감소됨에 따라 BVDV sentinel 연령대인 6~18개월령의 소에서 항체양성율이 감소되었음을 알수 있다.

표9. BVDV항체검사결과

구분	연령 항체	계	≤6	≤12	≤18	≤24	≤36	>36개월
1차년도	검사두수	4,260	846	572	427	420	688	1,307
	양성두수	3,076	614	201	237	303	540	1,181
	(%)	72%	73%	35%	56%	72%	78%	90%
2차년도	검사두수	3,521		643	362	534	713	1,269
	양성두수	2,511		252	191	364	571	1,133
	(%)	71%		39%	53%	68%	80%	89%
3차년도	검사두수	3,500	-	402	433	540	792	1,333
	양성두수	2,281	-	89	169	253	573	1,197
	(%)	65%	-	22%	39%	47%	72%	90%



그래프3. BVDV 항체검사결과

② 지역별 항체양성률현황

지역별 항체양성률 현황을 보기 위해 BVD 근절프로그램 적용전인 1차년도 지역별 항체양성률을 살펴보았다. 강원 65%, 경기 71%, 경남 83%, 경북 64%, 전남 75%, 전북 73%, 충남 75, 충북 72%의 BVDV 항체양성률을 나타냈다.

표10. 지역별 BVDV 항체검사결과(1차년도)

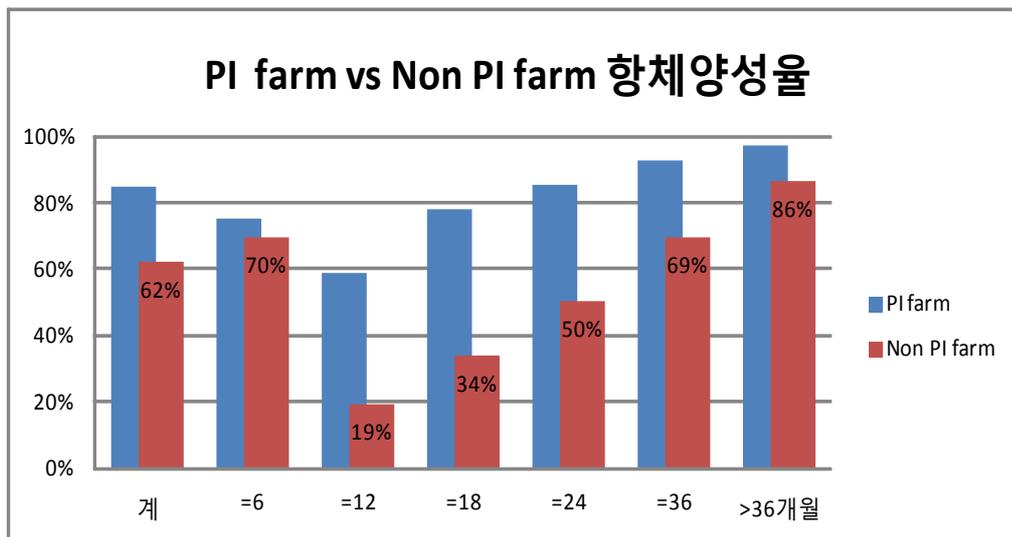
지역	계	강원	경기	경남	경북	전남	전북	충남	충북
검사두수	4260	617	424	438	672	528	861	350	370
항체양성두수	3,076	413	337	315	380	368	673	281	309
%	72%	67%	79%	72%	56%	70%	78%	80%	84%

③ 지속감염우 검출목장 vs 지속감염우 미검출목장의 항체비교

지속감염우검출목장(PI farm) 과 지속감염우미검출목장(Non PI farm) 항체검사결과를 살펴보면, PI farm의 검사두수 3,796두 중 3,211두(85%), Non PI farm 검사두수 7,474두중 4,654두 (62%)가 항체양성률을 보였다. 6-18개월 사이에서 PI farm 과 Non PI farm은 약 40%의 항체양성률 차이가 나타났다. 이는 지속감염우검출 목장의 경우, 지속감염우의 지속적인 바이러스배출로 인해 송아지의 모체이행항체가 소실되는 시점(6개월)에서 BVD 바이러스 감염으로 인해 항체양전(seroconversion)이 발생한 것으로 사료된다.(표9 및 그래프3) 또한 1차, 2차, 3차년도의 PI farm의 연령별 항체양성률은 변동이 없으나, Non PI farm에서의 연령별 항체양성률은 BVDV근절프로그램이 진행됨에 따라 6~12개월은 거의 항체양성률의 변동이 없으며, 12~18개월의 항체양성률은 40%에서 29%로, 18~24 개월은 57%에서 8%도 감소되어짐을 볼 수 있다.

표11. PI farms vs Non PI farms 항체검사결과

구분	분류	연령	계	≤6	≤12	≤18	≤24	≤36	>36개월
계		검사두수	3,796	424	580	411	484	694	1203
	PI farm	항체양성	3,211	320	342	321	413	643	1172
		%	85%	75%	59%	78%	85%	93%	97%
Non PI farm		검사두수	7,474	422	1026	811	1010	1499	2706
	항체양성	항체양성	4,654	294	196	276	508	1041	2339
		%	62%	70%	19%	34%	50%	69%	86%
1차년도		검사두수	1,865	424	241	172	202	301	525
	PI farm	항체양성	1,552	320	127	135	178	286	506
		%	83%	75%	53%	78%	88%	95%	96%
Non PI farm		검사두수	2,395	422	331	255	218	387	782
	항체양성	항체양성	1,524	294	74	102	125	254	675
		%	64%	70%	22%	40%	57%	66%	86%
2차년도		검사두수	1349		288	155	179	259	468
	PI farm	항체양성	1116		180	105	140	231	460
		%	83%		63%	68%	78%	89%	98%
Non PI farm		검사두수	2172		355	207	355	454	801
	항체양성	항체양성	1395		72	86	224	340	673
		%	64%		20%	42%	63%	75%	84%
3차년도		검사두수	632		61	79	96	149	247
	PI farm	항체양성	550		32	66	84	127	241
		%	87%		52%	84%	88%	85%	98%
Non PI farm		검사두수	2,868		341	354	444	643	1086
	항체양성	항체양성	1,732		57	103	170	446	956
		%	60%		17%	29%	38%	69%	88%



그래프 4. PI farm vs Non PI farm 항체양성율

④ BVDV 감염 후 프로그램 적용 농장 항체 (백신미접종)

BVDV 감염 후 프로그램 적용 농장의 항체를 살펴보기 위하여, 백신을 접종하지 않고 BVDV 감염을 차단한 농장 1호를 선택하였다. 1차년도에 검출된 지속감염우를 즉시 우군에서 제거했으며, 이 후 생산되는 신생송아지에 대해 BVD 항원검사를 실시하여 지속감염우로 확인 즉시 도태시켰다. 또한 외부로부터 소 입식을 중단하여 외부 감염을 최소화시켰으며, BVD 백신은 접종하지 않았다. 1차년도 검사 후 1.5 ~ 2년의 시간이 지난후의 농장의 항체양성율을 살펴보았다. 평균 항체양성율은 41%이며, 6~12월 5%, 12~18개월 0%, 18~24개월 10%, 24~36개월 59%, 36개월 이상은 96%이다. 마지막 BVD cattle이 우군에서 제거된 후 우군 내에서 BVDV free 확인을 위한 농가 모니터링으로 12~18개월 구간의 BVDV 항체검사가 유용함을 보여준다.

표12. BVDV 감염 후 프로그램 적용 농장 항체 (백신미접종)

연령	계	6<≤12	≤18	≤24	≤36	>36개월
검사두수	101	21	21	10	22	27
항체양성두수	41	1	0	1	13	26
%	41%	5%	0%	10%	59%	96%
항체음성두수	60	20	21	9	9	1
%	59%	95%	100%	90%	41%	4%

(3) 한우개량사업소 (백신항체)

한우개량사업소 1차년도 1,480두, 2차년도 1,896두, 3차년도 1,822두 총 5,198두에 대해 BVDV 항원검사를 실시하였으며 지속감염우는 검출되지 않았다.

표13. 한우개량사업소 시료내역 및 항원검사

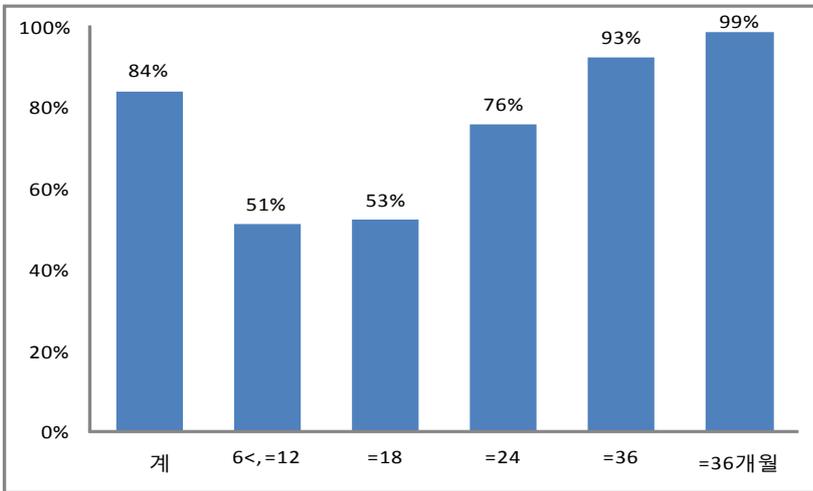
구분	검사두수	지속감염우	≤6	≤12	≤18	≤24	≤3	>36개월	unknown
계	5,198	0	1,466	552	240	389	449	2,043	59
1차년도	1,480	0	370	50	118	97	145	700	-
2차년도	1,896	0	399	441	50	151	151	645	59
3차년도	1,822	0	697	61	72	141	153	698	

항체검사는 6개월이상의 시료내역을 알수있는 3,144두를 검사하였다.(표13)

한우개량사업소의 백신접종은 A사(사독)백신을 6개월미만에서 1개월간격으로 2회접종, 1차 접종 후 6개월뒤에 1회 추가접종을 실시한 후, 년 2회 보강접종을 실시하였다. 한우개량사업소의 BVDV 항체검사는 3,732두 중 3,144두(84%)가 항체양성을 보였으며, 6-12개월 51%, 12-18개월 53%, 18-24개월 76%, 24-36개월 94%, 36개월초과에서는 99%의 항체양성율을 보였다. 6-18개월사이의 백신접종의 경우 25~100% 항체양성을 보였다.

표14. 한우개량사업소 연령별 항체양성율

	계	6<, ≤12	≤18	≤24	≤36	≤36개월	
계	검사두수	3,732	552	240	389	449	2,043
	항체양성두수	3,144	284	126	296	416	2,022
	(양성율)	84%	51%	53%	76%	93%	99%
1차년도	검사두수	1,110	50	118	97	145	700
	항체양성두수	968	20	60	59	133	696
	(양성율)	87%	40%	51%	61%	92%	99%
2차년도	검사두수	1,497	441	50	151	151	645
	항체양성두수	1,226	249	50	140	146	641
	(양성율)	82%	56%	100%	93%	97%	99%
3차년도	검사두수	1,125	61	72	141	153	698
	항체양성두수	950	15	16	97	137	685
	(양성율)	84%	25%	22%	69%	90%	98%



그래프5. 한우개량사업소 연령별 항체양성율 분포도

(4) 지속적인 신생우 검사

27개의 참가농장 중 3농장에서 지속적으로 신생우 154두에 대하여 BVDV 항원검사를 의뢰하였다. 3농가에서 3두에 대하여 BVD항원양성이 나왔으며, 2차검사를 하지 않고 우군에서 도태시켰다

표15. 자발적 신생우 검사

목장수	검사두수	BVDV항원양성
3	154	3

## 2. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발 연구 요약

### 가. BVDV 근절 프로그램 적용 방법

STEP 1	목장내 감염여부 확인 (BVDV 항체 또는/및 항원검사)
STEP 2	지속감염우 검출 후 분리 또는 도태 (권장)
STEP 3	백신 (농장주 & 수의사의 선택에 의해 결정)
STEP 4	추가감염차단 & 지속적인 방역
STEP 5	입식우 & 미검사된 송아지 검사 (BVDV 항원검사)
STEP 6	농가평가 (항체검사)

#### 나 . BVDV 근절 프로그램 적용 결과 요약

##### ▶ 자발적 BVDV 프로그램 참여 농가

- 전국 27개 농장이 3년동안 참가하였다
- 농장주의 BVD질병 인식정도에 따라 BVD 근절 시기 및 성공여부가 결정되었으며, 교육의 중요성이 확인되었다.

##### ▶ 지속감염우 현황

- 전국 모든 지역에서 BVD 지속감염우 및 BVD 항체가 검출되었다. 전국적으로 BVDV에 대한 감염이 이루어지고 있음을 말해준다
- 지속감염우의 약 70%이상이 12개월이하에서 검출되며, 이는 다양한 이유로 인해 12개월이상에서는 생존력이 급격히 저하됨을 말해준다.
- 지속감염우 검출율은 BVDV 백신접종농가 및 백신 미접종농가간의 차이가 크지 않았다.

##### ▶ 프로그램 적용 결과 요약

- 프로그램이 진행됨에 따라 1차년도 참여농가의 43%에서 BVD지속감염우가 검출된 것에 비해 3차년도에는 참여농가의 19%에서만 지속감염우가 검출되었다. 지속감염우의 검출율도 0.63%에서 0.21%로 떨어졌다.
- BVD 지속감염우의 검출 후 우군내 지속감염우 제거시기가 농장에서의 또 다른 지속감염우의 생산에 영향을 주었다.
- BVD 지속감염태아를 임신한 모우의 경우 1차 BVD 항원검사이후에 지속감염우를 생산한다. 신생우에 대한 BVD 항원검사가 필요하다.
- 외부영향 (입식, 정액 등) 에 의해 BVD 항원이 농장내에 도입되면 농장내 지속감염우 발생 원인이 된다.
- BVDV free 농장의 경우 12~18개월 연령의 소의 항체검사는 BVDV 감염 sentinel 으로 작용한다.

##### ▶ 기타(백신)

- BVDV 백신접종횟수 및 백신접종시기에 따라 6개월~18개월에서의 BVDV 항체양성율은 22~100%로 나타났다.

### 3. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램

위의 연구결과를 기초로하여 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램을 만들었다. 1단계에서 BVD지속감염우를 감별하여 BVDV 주감염원인인 BVD지속감염우를 제거하고 2단계에서 1단계에서 검출불가능한 임신우의 BVD 지속감염태아를 분만 후 신생우에 대한 BVD항원검사를 통해 검출·제거와 동시에 BVD free 소만을 입식한다. 3단계에서 BVD 감염 sentinel 연령대인 12~18개월의 소의 혈청에 대해 BVD 항체검사를 통하여 BVD free임을 증명한다. 백신의 경우 1단계 후 농장상황에 따라 농장주가 수의사와 상의하여 선택적으로 접종한다.

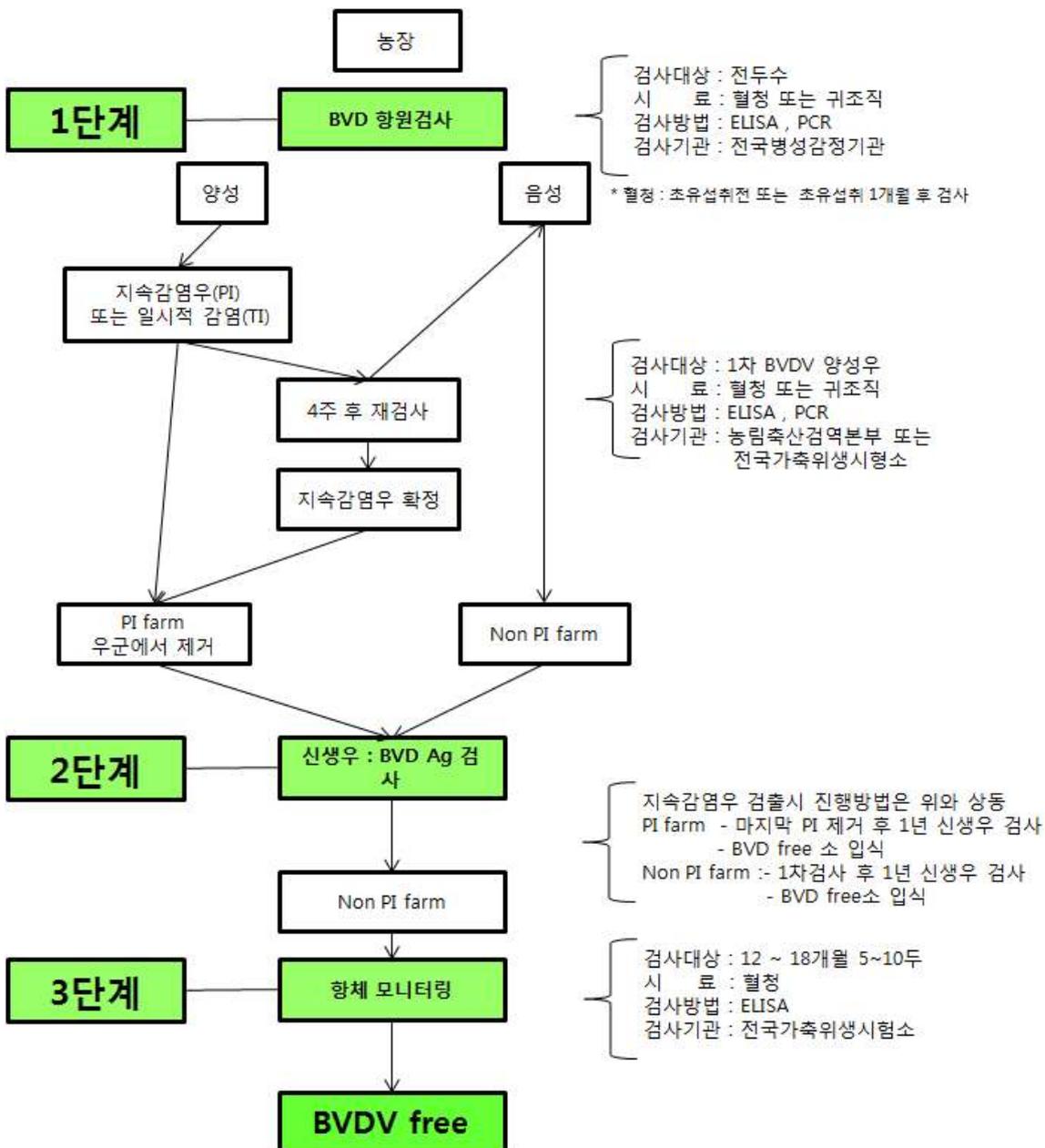


그림 2. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 안

4. 국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 등 국가 제안안

양식 3-1		연구결과활용계획서			QIA-NRP		
농림축산식품부 정책건의 <b>Policy Application (PA)</b>		과제 분류		연 도	2014		
		과제 코드	311001-03				
		기술 코드					
		회사명	(주)메덱스				
1. 과 제 명	가축 소모성 질환 근절방안 및 농가 적용 프로그램 개발						
2. 제 목	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램 개발						
3. 연 구 원	성 명	직 급	소 속			참여율(%)	
a. 주담당자	김경동	대표이사	메덱스			20%	
b. 담 당 자	박흥제	연구소장	(주)메덱스 생물공학연구소			15%	
	조종숙	연구사	“			20%	
	홍성희	연구소	“			10%	
	서창원	연구소	“			11%	
	류희정	연구소	“			11%	
	신령자	연구소	“			11%	
4. 정책건의사항							
○ 국가차원에서 “국내 소 바이러스 설사증(BVD) 근절 프로그램”을 농장에 적용							
5. 정책건의 내용요약							
○ 국내 소 바이러스 설사증을 근절(BVD)을 위하여 농장에 1~3 단계별 프로그램 적용							
- 1단계 : 농장 소들에 대해 BVD 항원검사를 통해 BVD지속감염우를 검출·제거하여 소 바이러스 설사증의 주 감염원인을 제거							
- 2단계 : 1단계에서 검출 불가능한 임신우의 BVD 지속감염태아를 분만 후 신생우에 대한 BVD항원검사를 통해 검출·제거와 동시에 BVD free 소만을 입식							
- 3단계에서 BVD 감염 sentinel 연령대인 12~18개월의 소의 혈청에 대해 BVD 항체검사를 통하여 BVD free임을 증명							
- 백신의 경우 1단계 후 농장 상황에 농장주가 결정하여 선택적으로 접종							
6. 색인용어	소 바이러스 설사증, 지속감염우, 단계별 프로그램						
과제책임자	김경동		(서명)				
년 월 일 본 연구과제 성과를 국가 정책반영 사항으로 건의합니다. 농림축산식품부장 귀하							

양식 3-1		연구결과활용계획서		QIA-NRP	
농림축산식품부 <b>정 책 건 의</b> <b>Policy Application (PA)</b>		과제 분류		연 도	2014
		과제 코드	311001-03		
		기술 코드			
		회사명	(주)메덱스		
1. 과 제 명	가축 소모성 질환 근절방안 및 농가 적용 프로그램 개발				
2. 제 목	소 바이러스 설사증 항원을 현장에서 편리하고 신속하게 사용할 수 있는 BVDV 항원현장검사키트의 활용				
3. 연 구 원	성 명	직 급	소 속	참여율(%)	
a. 주담당자	김경동	대표이사	메덱스	20%	
b. 담 당 자	박홍제	연구소장	(주)메덱스 생물공학연구소	15%	
	조종숙	연구사	“	20%	
	홍성희	연구소	“	10%	
	서창원	연구소	“	11%	
	류희정	연구소	“	11%	
	신령자	연구소	“	11%	
4. 정책건의사항					
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소의 주요 경제성 질병인 소 바이러스성 설사증 원인체 검출을 위한 BVDV 항원현장검사키트 농장현장에서 적용</li> </ul>					
5. 정책건의 내용요약					
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소 바이러스 설사증 원인체를 검출하고자 할 때 다음의 술식으로 소 바이러스 설사증 바이러스 여부를 신속하게 동정함</li> </ul>					
1. Hybridoma cell 배양 및 복수 생산 - <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Gold Particle 준비 - 간단</li> <li>2. Antibody-gold particle conjugation</li> <li>3. 샘플패드 버퍼 조건 확립</li> <li>4. 멤브레인 코팅 조건 확립</li> <li>5. 골드 칸슈게이트 양 최적화 시험</li> <li>6. 샘플량 결정</li> <li>7. 검사시간 설정</li> </ol>					
6. 색인용어	소 바이러스 설사증, 지속감염우, 단계별 프로그램				
과제책임자	김경동	(서명)			
년 월 일 본 연구과제 성과를 국가 정책반영 사항으로 건의합니다. 농림축산식품부장 귀하					

## 제2절 BVDV 항원현장검사키트 키트 개발 조건 확립

### 1. 항체 준비

#### 가. Hybridoma cell 배양 및 복수 생산

- (1) BVDV 특이적 항체를 생산하는 clone의 Hybridoma cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 배양
- (2) 1,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 cell pellet에 20mM PBS를 넣고 세척함.
- (3) cell을 PBS를 이용하여 2번 더 세척한 후, PBS에  $3 \times 10^6$ 이 되게 만든다.
- (4) BALB/c에 면역증강제 pristane을 복강에 투약한 BALB/c의 복강에 준비된 hybridoma cell을 주입함.
- (5) 10일 후 복강으로부터 만들어진 복수를 회수함.
- (6) 12,00rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 회수하여 항체정제에 이용함.

#### 나. 항체 정제

마우스복수를 0.45uL 시린지필터를 이용하여 여과한 후 20mM PBS로 5배 희석한 후 20mM PBS로 평형화된 ProteinG bead를 충전한 column에 적용하였다. 20mM PBS로 충분히 Protein G bead를 세척한 후 IgG elution buffer를 이용하여 IgG만을 분리정제하였다. 20mM PBS를 이용하여 정제된 BVDV 특이적인 IgG를 투석하여 정량한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 추후 실험에 사용하였다.

### 2. 키트조건 확립

#### 가. Gold Particle 준비

##### - 40nm colloidal gold 제조

- (1) 3차 증류수 100ml을 깨끗하게 세척된 삼각플라스크에 넣고 교반하면서 끓임.
- (2)  $\text{HAuCl}_4$ 를 3차 증류수에 1% 농도가 되게 잘 녹인 후, 0.22um 필터로 여과하였음.
- (3) 플라스크의 물이 끓으면 최종 농도가 0.01%가 되게  $\text{HAuCl}_4$  용액을 첨가하였음.
- (4) 10분 동안 수증기가 증발하지 않게 끓임.
- (5) 1% sodium citrate 2ml을 첨가하여 무색→보라색→붉은색으로 색변화를 관찰 후 5분 더 가열.
- (6) colloidal gold particle 사이즈와 균질성을 전자현미경 사진으로 확인하였음.

#### 나. Antibody-gold particle conjugation

##### - 항체와 40nm colloidal gold particle를 Roth의 방법에 따라 conjugation을 실시하였다.

- (1) Colloidal gold의 용액을 0.1M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 를 이용하여 pH 9.0으로 맞춘 후 각 tube에 1ml씩 분주함.
- (2) 정제한 BVDV 특이적 IgG를 0.1mg/ml의 농도가 되도록 2mM borate buffer에 희석함.
- (3) 항체용액을 colloidal gold에 0, 10, 20-150  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 2mM borate buffer로 모든 tube 1.15ml로 맞춘 후 5분간 실온에 반응시킴.

- (4) 반응이 끝난 tube에 10% NaCl 50  $\mu$ l씩을 넣고 vortex하고 1분 후 A540nm에서 흡광도를 측정하여 colloidal gold를 안정화시키는 최적 항체의 양을 측정함.
- (5) 최적 항체의 양이 결정되면 pH 9.0으로 맞춘 100ml colloidal gold 용액을 빠르게 교반시키면서 최적 항체량보다 10% 많은 양을 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 교반시킴.
- (6) 최종 1%가 되게 10% BSA casein 용액 10ml을 첨가한 후 1시간 더 반응시킴.
- (7) 반응이 끝나면 10,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 다시 2mM borate buffer(pH7.2)로 antibody-gold conjugate를 세척하는 과정을 3회 반복 실시함.
- (8) 최종 원심분리 후 2mM borate buffer(contained 1% casein, pH7.2)를 초기 colloidal gold의 1/10 volume을 첨가하고 재 혼탁 시켜 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였음.
- (9) 항체:gold conjugate 평가를 위해 BVDV virus를 음성혈청에 첨가한 샘플을 이용하여 확인하였음(그림. 1)



<그림. 1 Antibody-gold conjugation 확인 시험>

### 3. 샘플패드 버퍼 조건 확립

키트에 적용할 시료인 혈청에는 알부민을 포함한 다양한 성분이 포함되어 있기 때문에 키트에 적용시 항원-항체반응, 전개속도 등에 영향을 주게 된다. 샘플의 원활한 전개, pH 조절을 할 수 있는 buffer 그리고 비특이 반응이 일어나지 않게 하기 위해 BSA등의 첨가에 따른 최적조건을 확인하였음(표 1).

가. buffer: Tris, PBS, Borate 등의 완충용액을 테스트한 결과 20mM PBS(pH7.5)가 antibody-gold conjugate의 색깔, 전개 등에 가장 적합한 buffer로 확인되었음.

- 나. 계면활성제로 Tween20, Triton X-100, NP-40 등의 농도별 테스트 결과 시료의 전개에 가장 적합한 계면활성제는 0.05%의 Tween20로 확인되었음.
- 다. 1% BSA의 첨가에 의한 비특이 반응 해결함
- 라. 5% Sucrose 첨가에 의한 전개속도의 조절과 민감도를 개선함.

표 1. Sample pad 최적화를 위한 버퍼 조성

조 성	농 도
Buffer	20mM PBS, pH7.5
계면활성제(Detergent)	0.05% Tween20
단백질 첨가제	1% BSA
당(Sugar)	5% Sucrose

#### 4. 멤브레인 코팅 조건 확립

##### 가. 검사선(test line) 코팅 조건 확립

단클론 anti-BVDV 항체를 각각 여러가지 농도로 나이트로셀룰로스 멤브레인에 각각 코팅한 후 BVDV 음성표준 검체와 BVDV 양성 표준검체를 검사하여 코팅 항체의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하여 코팅 항체의 농도를 결정하였다. 나이트로셀룰로스 멤브레인에 단클론 항-BVDV 항체를 각각 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL 의 농도로 나이트로셀룰로스 막 검사선(test line) 위치에 흡착시켜 각각을 조립한다. 샘플 20를 디바이스 하단에 있는 검체 점적부위에 떨어뜨린 후 검체 희석액 3~4 방울(80~100 $\mu$ l)를 검체점적부위에 떨어뜨린후, 5~15분 동안 반응시켰다.

단클론 anti-BVDV 항체의 농도 1.5mg/mL로 코팅하였을 경우 검사선의 포화점을 나타내었다. 이는 한 스트립당 0.4cm 이므로 총 단백질이 0.6 $\mu$ g/strip 이상에서 포화 되므로, 0.6 $\mu$ g/strip 을 나이트로셀룰로스 막에 코팅하는 최적량으로 결정하였다(표 2).

표 2. 검사선(Test line) 코팅조건 확립

양성표준검체	BVDV 양성 표준 검체								
	$1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}$			$5 \times 10^4 \text{TCID}_{50}$			$1 \times 10^5 \text{TCID}_{50}$		
코팅농도(mg/ml)	1.0	1.5	2.0	1.0	1.5	2.0	1.0	1.5	2.0
결과									
판정	+/-	+	+	+	++	++	++	+++	+++
음성표준검체	BVDV 음성 표준 검체								
	음성 1			음성 2			음성 3		
코팅농도(mg/ml)	1.0	1.5	2.0	1.0	1.5	2.0	1.0	1.5	2.0
결과									
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-

나. 대조선(control line) 코팅 조건 확립

goat anti-mouse IgG를 여러가지 농도로 나이트로셀룰로스 막에 코팅한 후 BVDV 음성 표준 검체, BVDV 양성 표준검체를 이용 검사하여 코팅 항체의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적의 조건을 선택하여 코팅 항체의 농도를 결정하였다. 나이트로셀룰로스 멤브레인에 goat anti-mouse IgG를 각각 1.5, 2.5, 3.0, mg/mL 의 농도로 멤브레인에 흡착시켜 각각을 조립하여 검체 20 $\mu$ l를 디바이스 하단에 있는 검체 점적부위에 떨어뜨린 후 즉시 검체 희석액 3~4 방울(80~100 $\mu$ l)를 검체점적부위에 떨어뜨려 5-10분 동안 반응 시켜 대조선의 2.5mg/mL 농도가 포화점인 것으로 확인되었다.

### 5. 골드 칸슈게이트 양 최적화 시험

검사선과 대조선에서 정한 항체 Coating 농도와 anti-BVDV virus monoclonal antibody-gold conjugate 의 O.D<sub>520</sub>=10을 아래의 시험방법으로 BVDV 음성 표준 검체와 BVDV 양성 표준 검체로 검사하여 칸슈게이트 양의 포화점을 찾아 민감도와 특이도 모두에 가장 최적인 조건을 선택하여 결정하였다. Anti-BVDV monoclonal antibody-gold conjugate (O.D<sub>520</sub>=10)의 양이 50 $\mu$ l 이상에서 검사선과 대조선이 포화점을 나타내었다. 따라서 50 $\mu$ l 양을 최적 흡착량으로 결정하였다(표 3).

- 가. anti-BVDV virus monoclonal antibody-gold conjugate (O.D<sub>520</sub>=10)의 양을 각각 25, 50, 100 $\mu$ l 의 양이 되도록 칸슈게이트 패드에 흡착시켜 건조시킨 후 각각을 조립한다.
  - 나. 검체 20 $\mu$ l를 디바이스 하단에 있는 검체 점적부위에 떨어뜨린 후 즉시 희석액 3~4 방울(80~100 $\mu$ l)를 검체점적부위에 떨어뜨린다.
  - 다. 5~15분 반응시킨 후 결과를 판정하였다.
- 표 3. 골드 칸슈게이트 양 최적화

BVDV 양성표준검체	1 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub>			5 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub>			1 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub>		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
칸슈게이트 농도( $\mu$ l)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
결과									
판정	+/-	+	+	+	++	++	++	+++	+++
음성표준검체	음성 1			음성 2			음성 3		
칸슈게이트 농도( $\mu$ l)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
결과									
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## 6. 샘플량 결정

인산염 생리식용액 Casein 1% (w/v), 보존제 아지화 나트륨 0.01%(w/v)의 조성대로 조제하고 검사선과 대조선 및 골드 칸슈게이트는 위에서 정한 농도대로 코팅 및 접합하여 용액을 적정하여 개 BVDV 음성 표준 검체와 BVDV 양성 표준 검체의 점적양에 따른 포화점을 찾아 민감도와 특이도에 적합한 양을 아래의 방법으로 결정하였다. 소량의 검체를 분주할 경우 피펫팅하는 과정에서 약간의 부피변화가 전체 부피에 차지하는 비중이 다량을 분주할 경우에 비하여 크게 차이가 나타날 수 있다. 또한 소량을 분주할 경우 검체에 따라 모세관 현상에 의하여 검체가 이동할 때 한쪽으로 몰려 이동을 할 수도 있는 등 이상이 발생할 수도 있다고 판단되었다. 또한 실험결과 20 $\mu$ l 검체량 이상에서는 양성에 대한 신호가 저역가 검체부터 신호 검출이 가능하므로 종합적으로 결과를 판단한 결과 검체의 양을 20 $\mu$ l로 결정하여 실험에 이용하고자 하였다(표 4).

가. 각 검체 10, 15, 20, 25 $\mu$ l를 디바이스 하단에 있는 검체 점적부위에 분주한다,

나. 검체 희석액 3~4 방울 (80~100 $\mu$ l)를 디바이스 하단에 있는 검체 점적부위(S)에 분주한다. 5~15분 이내에 판정한다.

표 4. 샘플량 결정 시험

음성표준검체	음성			
전개용액(uL)	60	90	120	180
결과				
판정	Invalld	-	-	-
양성 검체	1 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub>			
전개용액(uL)	60	90	120	180
결과				
판정	Invalld	+	+	+

### 7. 검사시간 설정

최적화 조건으로 제조한 키트의 반응시간을 설정하기 위해서 시간에 따른 음성 및 양성 샘플의 결과를 조사하였다. 3, 5, 10, 15 그리고 20분의 검사시간에 따른 변화를 검사하여 정확한 판정을 위한 검사시간을 결정하였다.

시험결과 음성 샘플은 시간에 관계없이 검사선(test line)에서 발색을 나타내지 않았고 BVDV 양성 샘플의 경우는 시간이 경과함에 따라 고역가부터 발색이 나타나기 시작하여, 저역가까지 발색이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 시험 개시 후, 5~15분 사이에서 골드 칸쥬게이트 전개가 거의 다 이루어지게 되고 음/양성을 판단하기가 용이하였다. 정확한 판정을 위한 시간은 5~15분 사이로 결정하고, 시간이 더 경과하면 골드 칸쥬게이트가 역류하는 현상 등으로 음성샘플이 양성으로 판독되는 등 오판할 가능성이 있으므로 15분 이후의 결과는 판정에 포함시키지 않는 것으로 결정하였다(표 5).

표 5. 검사시간 설정 시험

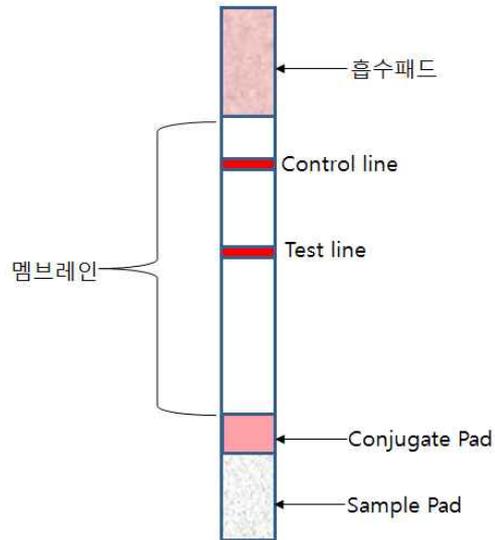
표준검체	음 성 1					BVDV 양성 표준 검체				
						1 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub>				
시간(분)	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20
결 과										
판 정	-	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+
표준검체	BVDV 양성 표준 검체					BVDV 양성 표준 검체				
	5 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub>					1 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub>				
시간(분)	3	5	10	15	20	3	5	10	15	20
결 과										
판 정	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

## 제 3 절 BVDV 항원 검사키트 시제품 키트 제작 및 현장적용시험

### 1. 시제품 키트 제작

#### 가. 시제품 키트 스트립 구성

시제품 키트는 그림.2 와 같이 샘플패드, 칸주게이트패드, 검사선(Test line)과 대조선(Control line)이 있는 멤브레인 그리고 흡수패드로 구성된 스트립을 플라스틱 디바이스에 넣어 조립하여 제조하였다.



<그림. 2 시제품 키트 스트립 구성>

#### 나. 시제품 키트 조립

샘플패드, 칸주게이트 패드, 멤브레인 및 흡수 패드를 오른쪽부터 왼쪽으로 차례대로 서로 중첩하였으며 표 6과 같은 사이즈별로 준비하여 총 길이는 61mm가 되게 하여 플라스틱 카드 (adhesive card)에 조립하였다. 이렇게 조립된 것을 cutter기로 4mm 되게 정확하게 cutting 하여 strip을 제조하였다.

표 6. 시제품 구성 요소 사이즈

		Materials	Size
Plastic device		ABS(acrylonitrile, butadiene, styrene copolymer )	33mm X 77mm
	Absorbing pad	Cellulose	4mm X 21mm
Test strip	Membrane	Nitrocellulose membrane	4mm X 20mm
	Gold conjugate pad	Polyester	4mm X 7mm
	Sample pad	Cellulose	4mm X 13mm

### 2. 시제품 키트 평가

가. 검출한계 시험

제작한 시제품 키트를 이용하여 BVDV 바이러스의 검출한계를 측정하기 위해서 중화시험을 통해서 확인된 BVDV 바이러스를 음성샘플에  $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,  $5 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,  $1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,  $5 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,  $1 \times 10^5 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,  $5 \times 10^5 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ,  $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 까지 단계별로 희석하여 키트에 20 $\mu\text{L}$ 씩 각각 점적하고 즉시 희석용액 3~4 방울 (80~100 $\mu\text{L}$ )을 넣고 10분 동안 반응시킨 후 결과를 확인하였다. 시제품 키트로 시험하였을 때의 BVDV 바이러스 항원 검출한계는  $1 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 이상에서 양성을 보였다(표 7).

표 7. 시제품 키트 검출한계 시험

TCID <sub>50</sub> /ml	$1 \times 10^3$	$5 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$
BVDV							
판 정	-	-	+	+	+	+	+

나. 시제품 키트 재현성 시험

(1) 동일인의 반복시험을 통한 재현성

한 사람이 시제품 키트의 재현성을 조사하기 위하여 반복시험을 실시하여 본 제품의 재현성을 확인하였다. 음성(BVDV 음성 표준 검체 3개) 및 양성(BVDV 양성 표준 검체 3개) 샘플을 시제품 키트를 사용하여 3회 반복 실시하였다. 동일인이 3회 반복시험 결과 음성샘플에서는 음성이 양성샘플에서는 양성으로 판정되었다. 즉 본 시제품의 검사 재현성이 100%로 확인되었다(표 8).

표 8. 동일인의 반복시험을 통한 시제품 키트 재현성

시 험 횟 수 1 회						
검체	음성1	음성2	음성3	양성1	양성2	양성3
1회 시험						
판정	-	-	-	+	++	+++
2회 시험						
판정	-	-	-	+	++	+++
3회 시험						
판정	-	-	-	+	++	+++

(2) 시험자간의 반복시험을 통한 재현성

3명의 실험자가 시제품 키트의 재현성을 조사하기 위하여 반복시험을 실시하여 본 제품의 재현성을 확인하였다. 음성(BVDV 음성 표준 검체 3개) 및 양성(BVDV 양성 표준 검체 3개) 샘플을 시제품 키트를 사용하여 세명이 1회 실험을 실시하였다. 3명이 실험결과 음성샘플에서는 음성이 양성샘플에서는 양성으로 판정되었다. 즉 본 시제품의 검사 재현성이 100%로 확인되었다(표 9).

표 9. 시험자간의 반복시험을 통한 재현성

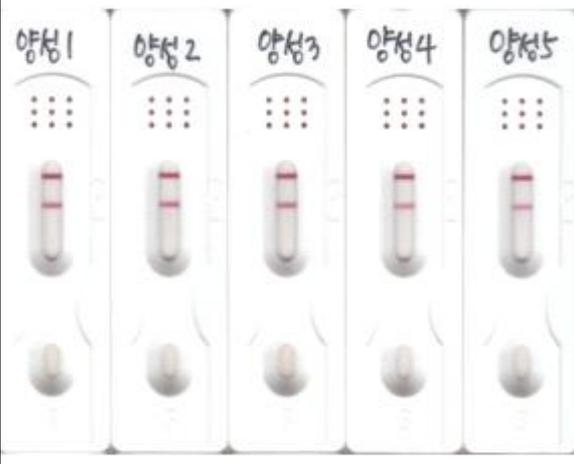
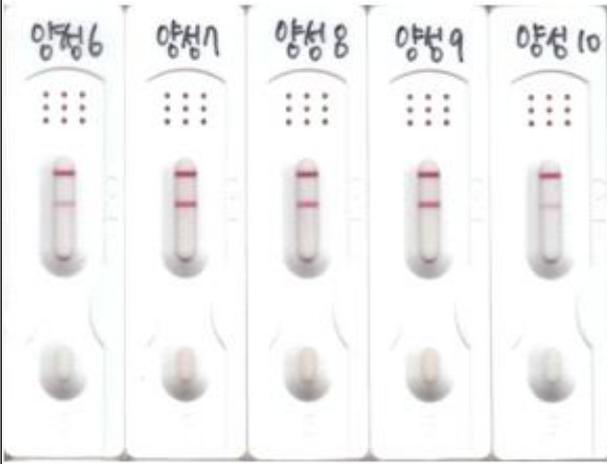
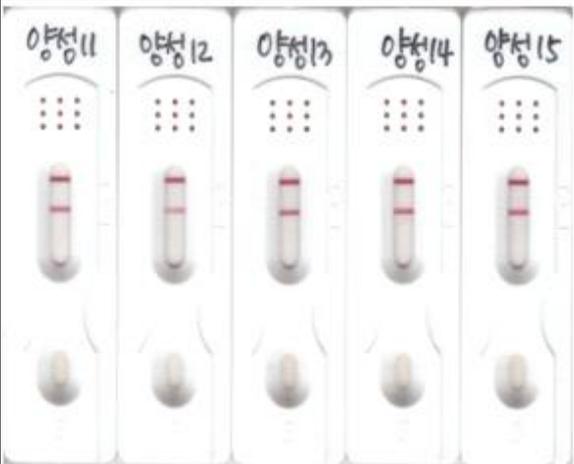
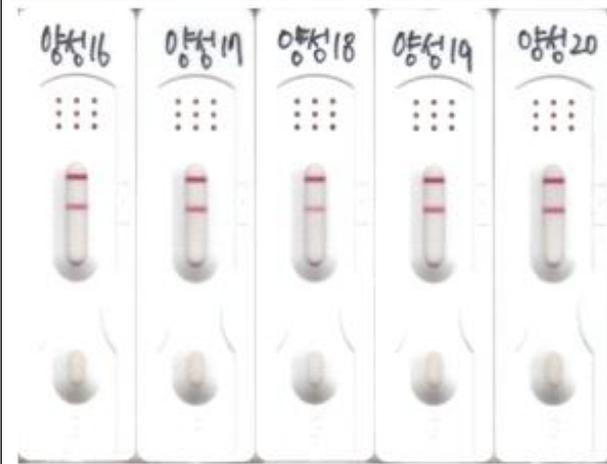
시 험 자 1						
검체	BVDV 음성1	BVDV 음성2	BVDV 음성3	BVDV 양성1	BVDV 양성2	BVDV 양성3
시험자 1	1-시험원 음성1 	1-시험원 음성2 	1-시험원 음성3 	1-시험원 저 	1-시험원 중 	1-시험원 고 
판정	-	-	-	+	++	+++
시험자 2	1-신뢰자 음성1 	1-신뢰자 음성2 	1-신뢰자 음성3 	1-신뢰자 저 	1-신뢰자 중 	1-신뢰자 고 
판정	-	-	-	+	++	+++
시험자 3	1-천원미 음성1 	1-천원미 음성2 	1-천원미 음성3 	1-천원미 저 	1-천원미 중 	1-천원미 고 
판정	-	-	-	+	++	+++

(3) 민감도 시험

본 과제를 통해 확보한 양성샘플 30개를 시제품 키트에 적용하여 키트의 민감도를 확인하였다.

30개의 양성샘플 모두 개발키트에서 양성의 결과가 나와 100% 민감도를 보이는 것으로 확인되었다(표 10).

표 10. 시제품 키트 민감도 결과

BVDV Ag Rapid kit										
검체	양성1	양성2	양성3	양성4	양성5	양성6	양성7	양성8	양성9	양성10
										
판정	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
검체	양성11	양성12	양성13	양성14	양성15	양성16	양성17	양성18	양성19	양성20
										
판정	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
검체	양성21	양성22	양성23	양성24	양성25	양성26	양성27	양성28	양성29	양성30

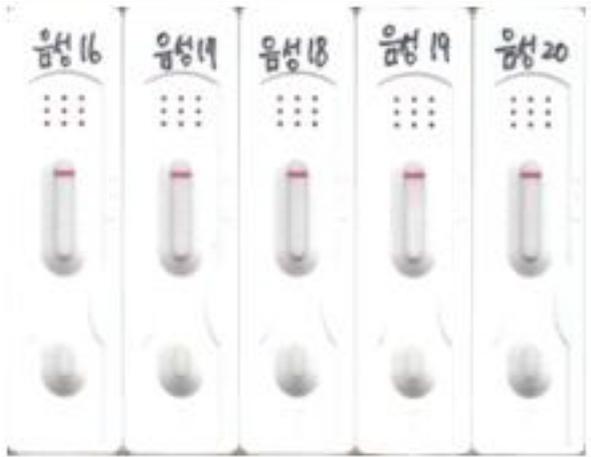
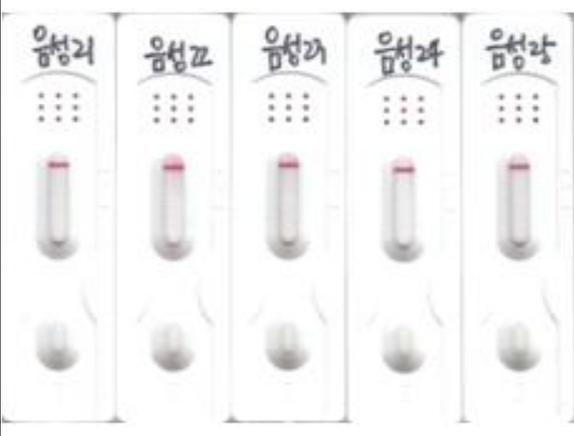
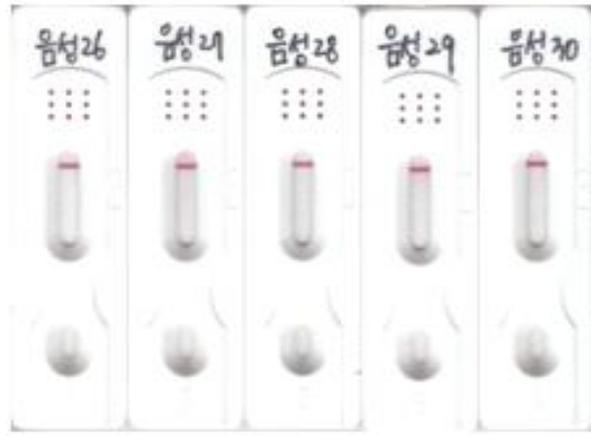
판정	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(4). 특이도 시험

시제품키트의 특이도를 조사하기 위해서 농장조사를 통해 확보한 음성샘플 30개를 개발키트에 적용한 결과 30개 샘플 모두 음성의 결과가 나와 100%의 특이도를 갖는 것으로 확인되었다(표11).

표 11. 시제품 키트 특이도 결과

BVDV Ag Rapid kit										
검체	음성1	음성2	음성3	음성4	음성5	음성6	음성7	음성8	음성9	음성10
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
검체	음성11	음성12	음성13	음성14	음성15	음성16	음성17	음성18	음성19	음성20

										
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
검체	음성21	음성22	음성23	음성24	음성25	음성26	음성27	음성28	음성29	음성30
										
판정	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(5) 기존 키트와 시제품 키트의 비교시험

필드샘플 적용을 통한 국내에 판매되고 있는 BVDV ELISA 키트와 시제품키트의 비교시험을 통해 개발키트의 성능시험을 실시하였다. 본 과제수행 기간동안 농장조사를 통해 확보한 양성 및 음성 각 30개의 필드샘플을 개발키트와 IDEXX ELISA에 적용하여 결과값을 비교하였다. 음성샘플 30개 모두 양 키트에서 음성의 결과를 보였고 양성샘플은 모두 양성의 결과를 얻었다(표 12). BVDV ELISA kit에서 강한 양성 결과의 결과가 나온 샘플은 시제품 키트에서도 대부분 강한 양성을 보이는 결과를 얻었다.(표13)

표12. ELISA 키트와 시제품 키트의 비교

시제품 키트 (BVDV Ag Rapid kit)	IDEXX ELISA kit		계
	BVDV 양성	BVDV 음성	
BVDV 양성	30	0	30
BVDV 음성	0	30	30
계	30	30	60

표 13. ELISA 키트와 시제품 키트의 양성결과 비교

양성샘플 No.	시제품 키트 (BVDV Ag Rapid kit 결과)	IDEXX ELISA kit 결과	진 단 비교결과
1	++++ (양성)	3.412 (양성)	일치
2	++++ (양성)	3.510 (양성)	일치
3	++++ (양성)	3.002 (양성)	일치
4	+++ (양성)	2.106 (양성)	일치
5	+++ (양성)	2.412 (양성)	일치
6	++ (양성)	3.282 (양성)	일치
7	++++ (양성)	3.337 (양성)	일치
8	++++ (양성)	3.179 (양성)	일치
9	++++ (양성)	2.467 (양성)	일치
10	+ (양성)	1.015 (양성)	일치
11	++++ (양성)	3.516 (양성)	일치
12	+++ (양성)	2.394 (양성)	일치
13	++++ (양성)	3.537 (양성)	일치
14	++++ (양성)	3.511 (양성)	일치
15	++++ (양성)	3.007 (양성)	일치
16	++++ (양성)	3.454 (양성)	일치
17	++++ (양성)	3.099 (양성)	일치
18	+++ (양성)	2.168 (양성)	일치
19	++++ (양성)	3.335 (양성)	일치
20	++++ (양성)	3.046 (양성)	일치
21	++ (양성)	1.635 (양성)	일치
22	++++ (양성)	3.660 (양성)	일치
23	++++ (양성)	2.742 (양성)	일치
24	++++ (양성)	3.631 (양성)	일치
25	+++ (양성)	3.492 (양성)	일치
26	++++ (양성)	3.508 (양성)	일치
27	++++ (양성)	2.770 (양성)	일치
28	++++ (양성)	3.519 (양성)	일치
29	++++ (양성)	3.257 (양성)	일치
30	++++ (양성)	3.360 (양성)	일치

## 다. 결론

개발키트는 BVDV type에 관계없이 100%의 특이도와 민감도를 갖는 키트였으며 필드샘플을 통해 기존 스크리닝 방법인 ELISA 방법과 비교하였을 때 동일한 결과를 얻었고 기존검사법의 현장적용의 어려움이 있지만 개발키트 현장에서 바로 검사할 수 있는 장점을 가지는 키트로 제품화를 통해 BVDV 지속감염우 검사에 유용한 검사방법이 될 것으로 사료된다.

연구과제로부터 획득한 기술로 농장 현장에서 BVDV type 1 & type 2 검출하는 제품1, BVDV type에 따라 항원을 검출하는 제품2 및 제품3, BVDV 항체를 검출하는 제품 4을 산업화시키고자 한다.

제품1 BVDV generic antigen detection kit

제품2 BVDV type 1 antigen detection kit

제품3 BVDV type 2 antigen detection kit

제품4 BVDV Antibody test kit

## <제1협동 제1과제>

# 국내 소 유산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국내 소 유산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2104년 9월 17일

협동연구기관명 : 농림축산검역본부

협동연구책임자 : 양동균

연 구 원 : 송재영

연 구 원 : 김하현

연 구 원 : 조수동

연 구 원 : 나진주

연 구 원 : 최성숙

# 요 약 문

I. 제 목 : 국내 소 유산의 원인분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 국내 소 유산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책 마련 기술 개발을 위하여 국내 소 유산의 원인 분석 및 진단법 개선이 필요 및 개량된 아까바네 등에 대한 백신개발 필요

III. 연구개발 내용 및 범위

- 국내 소 유·사산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발
  - 최근 국내 소에서 발생하고 있는 유산의 원인체 발생현황 파악
  - 소 유사산의 원인체를 규명하고, 중요 유전자의 분석
  - BVDV 지속감염우의 검출을 위한 신속 검출키트 산업화
  - BVDV의 Mab 작성 및 항체 정제, immunochromatography법에 의한 키트 작성
  - 소 유산에 관련된 바이러스 질병의 진단법 개선
  - 소 Akabane, Aino, Chuzan, BVDV에 대한 유전자 진단법 개선
  - 소 유산에서 가장 중요한 Akabane 예방을 위한 개량된 백신 생산 기법 확립
  - Akabane virus의 중요 단백질의 발현 및 발현 단백질과 최근 유행하고 있는 Akabane 바이러스를 혼합한 불활화 백신 생산 체계 확립
  - 기존의 상용화된 백신과 재조합 단백질이 함유된 백신과의 효능 비교 평가

IV. 연구개발 결과

- 년도별 소의 소모성 질병 진단 추이
- BVDV 불활화 백신에서 항원진단법 확립
- 국내 야외 BVDV의 분리
- BVDV E2 재조합 배칼로 바이러스의 작성
- BVDV의 특이 항체 생산
- 국내 사용 중인 아까바네 생백신주의 분자생물학적 평가
- 국내 남부지역에서 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 항체가 조사
- 국내 소에서 신종 소 파라인플루엔자 5형 감염증 확인
- 개량된 아까바네 및 유행열 혼합 불활화 백신의 개발
- 소모성 질환을 일으키는 소 바이러스에 대한 ribavirin의 바이러스 억제능 조사
- 국내 야외 BVDV의 분리

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 소 유산 관련 원인체에 대한 분석자료를 농가, 동물병원등 관련업체에 배포하여 농가내 질병컨트롤에 이바지
- 개선된 소 Akabane 불활화 백신 기술 이전

## SUMMARY

### Development of preventive measures and analysis for bovine reproductive diseases

Since the 1980's, several kinds of inactivated bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines have been used to immunize domestic animals such as cattle and goat in Korea. Immunogenicity of the BVDV vaccines has been checked by the Korean Veterinary Authority using laboratory animals. In this study, we applied a molecular method to investigate the genetic characterization of the BVDV genes in six commercial inactivated BVDV vaccines, and determined the efficiency of two extraction reagents (i.e., sodium citrate or isopropyl myristate) to separate the vaccine antigens from the antigen/adjuvant complexes. Six partial non-coding regions (288 bp) were successfully amplified with specific primer sets, which demonstrated that sodium citrate is more efficient in extracting viral RNA from inactivated gel vaccines than isopropyl myristate.

Serological assay against AKAV and BEFV using virus neutralization assay was conducted using 1,743 bovine sera collected from Namwon, Miryang, Yeongju and Uljin which located in Southern part of Korea from March to May in 2012. The overall seropositive rates for AKAV and BEFV were found to be 49.8% and 1.2%, respectively. The regional distribution of seroprevalence for AKAV ranged from 18.1% to 63.7%. Seroprevalences of AKAV were 63.7% in Miryang, 62.3% in Uljin, 50.7% in Namwon, and 18.1% in Yeongju.

Four viruses showing cytopathic effect (CPE) in MDBK and Vero cells were isolated from brain samples showing downer cattle syndrome in 2012 and designated as QIA-B1201 - QIA-B1204. The isolate, QIA-B1201 strain belonging to a member of the genus Rubulavirus of the subfamily *Paramyxovirinae* was investigated to understand the importance of the virus as an infectious agent. The QIA-B1201 virus had the ability to hemagglutinating red blood cells from several species of animals and was capable of adsorbing guinea pig erythrocytes on the surface of the infected Vero cells. Interestingly, the bPIV5s showed rapid and distinctive CPE in mouse brain originated cells, NG-108, compared with late and mild CPE in Vero or MDBK cells. The nucleotide sequence analysis showed that two isolates (QIA-B1201, QIA-B1204) had high similarity with other human and animal PIV5 isolates ranging from 98.1 to 99.8%. The highest sequence similarity of the two isolates corresponded to the KNU-11 strain (99.8% at the nucleotide and amino acid level) isolated from suckling piglet in Korea in 2012.

In the purpose of quality control of Akabane live vaccine, we conducted identification of vaccine strain and investigated the nucleotide sequence similarity of N gene derived from the commercially available five Akabane vaccines in Korea. The

Vero cells infected with Akabane vaccines showed specific cytopathic effect, which was characterized by the aggregation and detachment of cells. Four commercial Akabane vaccine strains had identical nucleotide and amino acid sequences but one vaccine showed one point mutation in amino acid of the N gene. Alignment with nucleotide and amino acid sequences showed 99.9 to 100% similarity among five commercial vaccine strains. Akabane vaccine strains had also high nucleotide similarity ranging from 99.0 to 99.6% with Korean isolates, KV0505, K9 and 93FMX, respectively. Though, the live attenuated Akabane vaccines have been applied to South Korea since 1980' s, the genetic characters of all commercial vaccine strains have not been changed.

We prepared the inactivated AKAV and BEFV vaccine for cattle and investigated safety and immunogenicity of the vaccine in several animals. There were not any side effects in mice, guinea pigs that were inoculated IP with vaccine for safety test. Guinea pigs with vaccine using IMS1313VG adjuvant did not show any other adverse effects for 14 days. All sows that were inoculated with vaccine containing IMS1313VG adjuvant showed normal condition. In cattle, safety test of vaccine was carried out about local reaction. All cattle were remained in the normal temperature and did not show any other adverse effects. To check the immunogenicity of vaccine, blood was collected from four kinds of animals inoculated with the vaccine 2 and 4 weeks later. Guinea pig induced the highest VN titer against both AKAV and BEFV among 4 kinds of animals. Cattle and sows showed the highest VN titer against AKAV and BEFV at 2 week after second immunization. We checked safety and immunogenicity of newly developed AKAV and BEFV vaccine in mice, guinea pigs, sows and cattle via intramuscular route. The inactivated AKAV and BEFV vaccine was safe and induced high neutralizing antibodies against both AKAV and BEFV in sows and cattle, indicating that the vaccine can be useful for the prevention of important aborviral disease in cattle.

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	54
제 2 장	국내외 기술개발	55
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제1절	국내 소 유산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 마련	88
	1. 년도별 소의 소모성 질병 진단 추이	
	2. 분자 생물학적인 방법으로 BVDV 불활화백신에서 항원진단법 확립	
	3. 국내 야외 BVDV의 분리	
	4. BVDV E2 재조합 벡클로바이러스 작성 및 단백질 발현	
	5. BVDV의 특이 항체 제조	
	6. 국내 사용 중인 아까바네 생백신주의 분자생물학적 평가	
	7. 국내 남부지역의 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 항체가 조사	
	8. 국내 소에서 신종 소 파라인플루엔자 5형 감염증 확인	
	9. 개량된 소 아까바네 및 유행열 혼합불활화백신의 개발	
제2절	세부연구수행결과	86

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

2006년부터 2013년까지 국가동물방역통합시스템(KAHIS)과 예찰협의회 자료를 통해 진단된 소의 소모성 질병 진단건수를 확인한 결과 BVDV의 경우 2007년도 이후 매년 100-300건수를 나타내고 있으며, 소 로타바이러스 감염증도 2006년 이후로 매년 200건 이상 진단되고 있으며, 소 코로나바이러스 감염증과 콕시듐증도 매년 증가하는 경향을 나타내어 지속 감시해야할 질병들이다. 소의 유사산 관련 질병진단 건수를 확인한 결과 아까바네병은 2010년 107건으로 폭발적으로 발생하였으며 2011년 2건, 2012년 2건, 2013년 0건이 발생하였다. 또한 소 유행열의 경우 2010년 92건, 2011년 1건, 2012년 4건, 2013년 8건으로 유행열의 발생은 아까바네병과 유사한 경향을 나타내고 있었으며, 2013년에 8건이 발생하여 낮은 수준이지만 지속 발생하고 있는 것으로 확인되어 지속 감시할 필요가 있다. 따라서 국내에서 발생하는 소의 소모성질병 중에서 BVDV, 아까바네, 및 유행열은 중요한 위치를 차지하고 있으며, 그 질병 대한 진단과 예방대책이 필요하다.

이러한 소모성질병의 제어하기위해 본 연구개발 과제에서는 다양한 방법이 제시되어야 한다. 현재 국내에서 사용 중인 BVDV 불활화백신에서 항원을 진단하는 방법은 백신을 동물에 접종하지 않고도 항원을 확인하는 방법이며, 동물약품을 평가하는 유용한 방법이다. 유전자의 클로닝을 통해서 얻어진 자료는 백신제조회사가 임의로 백신주를 변경하지 못하도록 사용할 수 있다. 또한 국내 지속감염우 또는 야외에서 감염된 소로부터 BVDV를 분리하여 분리주의 유전적인 특성확인도 필요하다.

야외상황에서 BVDV를 진단하기위한 기술을 확립하기위해서는 BVDV에 대한 특이적인 항체가 필수적이다. 이러한 항체를 제작하기위해서는 재조합 항원의 제작도 고려되어야 한다. 항원을 준비하는 방법으로 바이러스를 농축하는 것과 재조합 항원 제작하고 이를 사용하는 것인데 두 방법으로 제작한 항원을 마우스에 접종하여 특이 항체를 준비하는데 사용한다.

국내에서 사용 중인 아까바네 생백신주에 대하여 분자생물학적 평가도 필요하다. 현재 소에 접종하고 있는 백신은 5개회사에서 생산 중이 있으며, 이러한 백신주의 생물학적 평가는 아까바네 질병을 예방하는데 필수적이라 하겠다. 2010년에 아까바네와 유행열이 남원지역을 비롯한 남부지역에서 유행하였는데 3년이 지난 시점에서 다시 평가하고 미래에 다시 발생을 예측하는데도 중요한 자료라고 할 수 있다. 소의 소모성질병을 일으키는 BVDV, 아까바네 및 유행열을 제외한 신종 바이러스가 유입되거나, 유행할 경우에 그 원인체에 대한 분리 동정도 필요하다.

현재의 아까바네 생백신을 개량하기위한 기술도 지속적으로 이루어져야 한다. 소에 예쥬번트로 사용할 GM-CSF유전자의 발현도 좋은 예라 생각할 수 있으며, 아까바네 유전자의 발현을 통해 사용하는 것도 의미가 있다. 이러한 아까바네 백신에 대하여 아까바네와 유행열을 동시에 예방하기위한 백신의 개발도 필요하리라 생각된다. 이러한 예방백신의 개발은 물론 바이러스 증식억제물체의 확인도 필요하다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 소의 유·사산은 국내 낙농업의 주요 경제적 손실 원인의 하나로 생산성 저하에 따른 손실이 큼
2. 최근 새로운 병인체 및 변종 바이러스로 인한 소의 유산이 증가하는 추세임
3. 진보된 기술을 이용한 소 유사산 예방약의 개선 필요
4. 따라서 국내 소 유사산의 원인 분석 및 그 대책 마련을 통해 축산 농가의 생산성을 증가하고 축산의 경제성을 향상시키는 것이 필수적임
5. 관련기술 동향
  - 가. 소 아까바네병은 모기가 매개하는 질병으로 변식우를 사육하는 가축에게 치명적인 손실을 일으킴, 임신한 소에서 유사산, 조산 및 태수과다증을 보이며 때로는 난산 등이 발생. 주로 초임우에서 많이 발생하고 한번 감염된 소는 다시 발생하는 경우가 적음. 예방 집중하는 것이 최선의 방법, 집중대상은 임신이 가능한 암소로 모든 가임암소에 집중하되 2세미만의 초임우에 대해서 우선 집중해야 함
  - 나. 소바이러스설사증은 바이러스가 임신기에 감염이 되면 혈류를 통하여 태아에 감염되고 생존하여 태어난 송아지는 자연적으로 지속감염우가 됨. 이러한 지속감염우는 우군 내 바이러스를 일생동안 분변 등으로 배출하여 건강한 다른 소를 감염시킴. 감염된 소는 사료효율이 떨어지고 심하면 유산, 설사 등을 일으키는 중요한 질병중의 하나임
  - 다. 최근 5년간 검역원에 의뢰된 가검물을 분석한 결과에 BVD에 의한 유산은 점진적으로 증가하였으며 특히, 2008년(23건)에는 2007년(3건)에 비해 7배 정도가 증가하였음. 2009년에도 대부분 BVD바이러스에 의한 유산으로 확인되고 있는 실정임.
  - 라. 또한, 2008년부터 현재까지 소의 뇌조직에서 BVD바이러스를 검출한 결과 16.2%정도가 감염되어 있는 것으로 조사되었으며 이 중 3.5%정도가 지속감염우로 판단되었음. 이는 2006년에 지속감염우를 조사한 결과(1% 미만)에 비해 4배정도 증가했음
  - 마. 검역원은 2009년 수의과학기술개발 사업 보고회에서 최근 2년간 국내 유행하고 있는 BVD 바이러스를 조사하여 6가지 유전형이 야외에서 유행하고 있음을 밝혔으며 야외의 다양한 유전형의 바이러스를 방어하기 위해서 여러 유전자형이 보강된 유전자맞춤형 예방약 개발을 우선적으로 추진하고 하고 있음.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1절. 국내 소 유산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발

##### 1. 년도별 소의 소모성 질병 진단 추이

2006년부터 2013년까지 국가동물방역통합시스템(KAHIS)과 예찰협의회 자료를 통해 진단된 소의 소모성 질병 진단건수를 확인한 결과 그림 1에서 보는 것과 같이 BVDV의 경우 2006년도 20건, 2007년도 116건, 2008년 112건, 2009년 305건, 2010년 307건, 2011년 289건, 2012년, 151건, 2013년도 245건으로 확인되었으며, 2009년, 2010년 300건 이상 발생되었고, 다시 2013년도에 245건으로 확인되어 국내 소에서 BVDV가 지속적으로 감염되어 농가에 피해를 주고 있음을 나타내주고 있다. 이것은 본 과제를 통해 BVDV의 방역과 근절 프로그램의 필요성을 나타내는 자료라고 추정할 수 있다. 그 외에 송아지 및 성우에서 설사증을 주된 증상으로 하는 소 로타바이러스 감염증도 2006년부터 지속 증가하여 2013년도에는 272건을 나타내어 백신접종과 아울러 전파차단에 노력해야 한다. 이 뿐만 아니라 소의 로타바이러스는 다양한 바이러스 변이주가 있기 때문에 로타 바이러스에 의한 피해를 줄이기 위한 새로운 백신의 개발이 필요한 것으로 추정된다. 소 코로나바이러스 감염증과 콕시듐증도 지속적으로 발생하여 증가하고 있으며, 2013년도에는 모두 100건 이상을 나타내어 송아지의 설사병이 심각한 것으로 추정되었다. 송아지 설사(calf diarrhea)도 2012년 68건 발생하여 지속 증가하는 경향을 나타내고 있다. 기생충성 유사산을 나타내는 네오스포라 감염증은 2010년 69건을 정점으로 하고 지속 감소하고 추세를 보이고 있다.

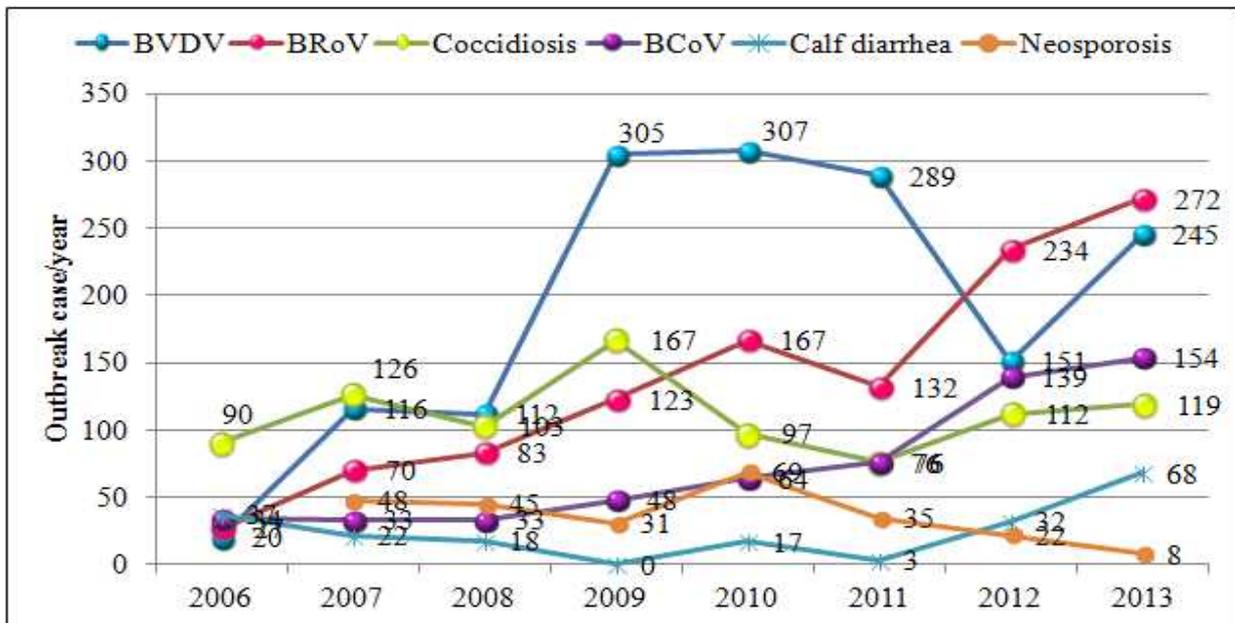


그림 1. 2006년 이후 년도별 소의 주요 소모성 질병의 진단 건수

소의 유사산관련 질병진단 건수를 확인한 결과 그림 2에서 보는 것과 같이 아까바네병은 2006년 2건, 2007년 2건, 2008년 0건, 2009년 1건, 2010년 107건, 2011년 2건, 2012년 2건, 2013년

0건이 발생하였다. 아까바네 바이러스는 2010년에 폭발적으로 발생하였고, 그 이외의 년도에는 발생이 낮은 것으로 확인되었다. 기후 온난화와 관련된 모기매개성 질환이므로 지속적으로 감시해야 할 것으로 예상된다. 또한 소 유행열의 경우 2006년 0건, 2007년 1건, 2008년 0건, 2009년 0건, 2010년 109건, 2011년 1건, 2012년 4건, 2013년 8건으로 유행열의 발생은 아까바네병과 유사한 경향을 나타내고 있었으며, 특히 2010년에 109건으로 폭발적으로 발생하였으나, 2013년에 8건이 발생하여 낮은 수준이지만 지속 발생하고 있는 것으로 확인되어 지속 감시할 필요가 있다. 따라서 국내에서 발생하는 유행열에 대하여 야외 바이러스의 분리 등 특성을 조사가 필요하며, 재유행을 예방하기 위한 방역조치도 필요하다.

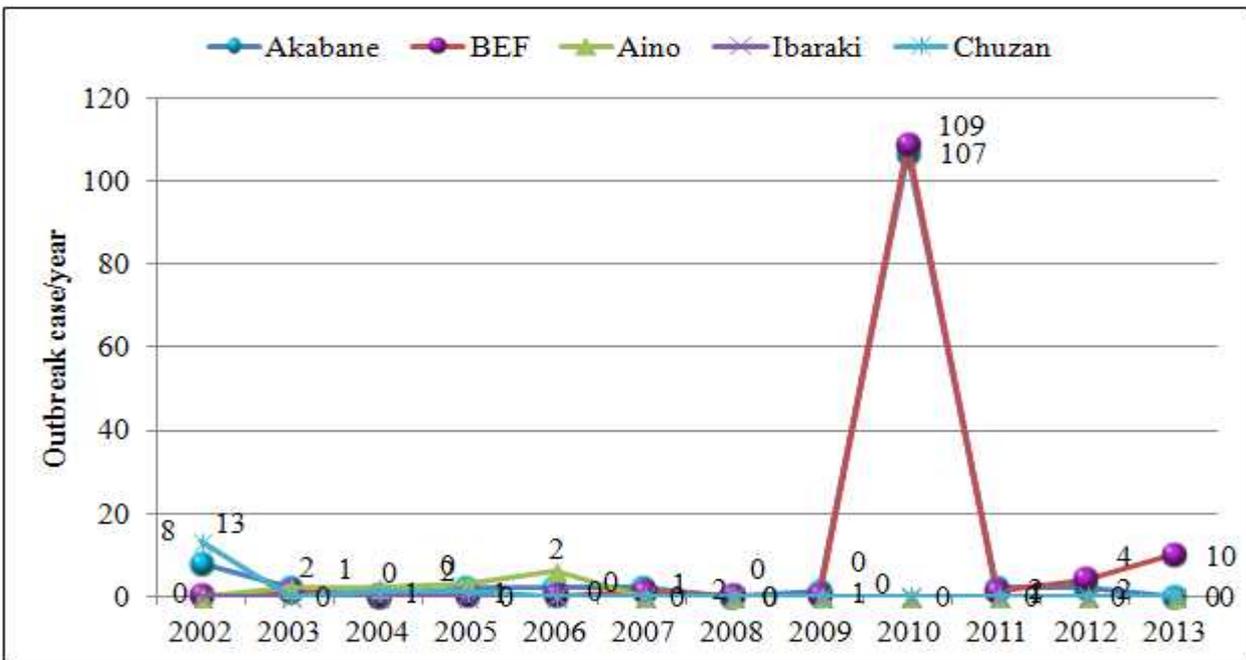


그림 2. 2002년 이후 년도별 소 유사산과 관련된 진단 건수

## 2. 분자 생물학적인 방법으로 BVDV 불활화백신에서 항원 진단법 확립

### 가. BVDV 백신의 수집 및 처리

국내에서 BVDV가 포함되어 상용화된 백신은 6종이 있다. 5종은 국내 제조회사에 의해 생산되고 있으며, 1종이 외국에서 수입하여 사용하고 있다. 백신으로부터 BVDV 항원을 추출하기 위해 2가지 방법을 사용하였다. 첫 번째 방법은 백신 200 ul에 isopropyl myristate (Sigma, USA) 800 ul를 첨가하고 철저히 5분 동안 혼합하였다. 이 혼합물을 3000 g에서 10분 동안 원심하였고 상층부를 수집하여 RNA를 추출하였다. 다른 방법은 백신 1 ml에 0.1 gram의 sodium citrate (Sigma, USA)를 첨가하고 37°C에서 12시간동안 혼합하였다. 그 혼합물을 동결융해를 3회 반복한 후 7000g에서 5분 동안 원심하였고 그 상층액을 수집하여 RNA의 추출에 사용하였다.

### 나. 핵산의 추출 및 RT-PCR

바이러스 핵산은 RNA 추출 키트 (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 추

출하였다. 추출된 RNA는 증류수 50 ul에 용출하였다. RT-PCR은 panpestiF, panpestR의 특이 프라이머를 이용하여 NCR부위를 증폭하였다(표 1). RT-PCR의 반응은 RNA 2 ul, 각 primer 1 ul 5X buffer 10 ul, dNTP 2 ul, enzyme mix 2 ul, 증류수 32 ul를 혼합하고, 42°C에서 30분간 cDNA를 만들고 그 이후 35 cycle( 95°C 45초, 55°C 45초, 72°C 1분)과 마지막 1 cycle 72°C 5분을 수행하였다. RT-PCR 산물은 1.8% agarose에서 전기 영동하여 유전자의 증폭을 확인하였다.

#### 다. 유전자 클로닝 및 염기서열 분석

모든 PCR 산물은 gel extraction을 실시하였고, pGEMT easy vector에 클로닝 하였다. 플라스미드 DNA는 대장균에서 증식하고 재조합 플라스미드는 *EcoR* 1 효소의 처리를 통해 확인하였다. 정제한 플라스미드의 염기서열은 MJ research PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit를 이용하여 분석하였다. 염기서열은 SP6, T7 primer을 이용하여 수행하였고 양방향의 DNA 염기서열을 확인하였다.

표 1. List of the oligonucleotide primers used for RT-PCR of the BVDV vaccine

Primer	Nucleotide sequences (5'-3')	Sense	BVDV gene	Size (bp)
PanpestF	CACTGCACACGCATCAAGAC	+	NCR	288
PanpestR	ACCTGAGCTGGCCTAATTGC	-		

#### 라. Phylogentic 분석

바이러스 유전자의 근연관계를 분석하기 위해 GenBank database로부터 얻은 것과 6개의 상용화된 백신에서 얻어진 288 bp의 염기서열을 이용하여 Clustal W2를 통해 비교하였다. Genetic distance는 Kimura-2 corrddction parameter에 의해 계산되었고, phylogenic tree는 neighbor-joining 방법으로 구성하였다.

#### 마. 백신의 처리에 따른 RT-PCR의 결과

불활화백신으로부터 RNA를 추출하기 전에 두 가지의 시약( sodium citrate, isopropyl myristate)을 사용하여 백신내에 항원과 에쥬번트 혼합물로부터 BVDV 항원을 분리하기 위해 사용하였다. 어떤 시약도 처리하지 않고 백신의 상층액에서 BVDV 항원을 확인하였을 때 단지 한 개의 백신에서 양성반응을 보였다. 그리고 isopropyl myristate를 처리하였을 때 6개의 백신에서 약한 양성반응을 나타내었다. 반면, sodium citrate를 사용하였을 때 5개의 백신에서 강한 양성을 확인할 수 있었다.

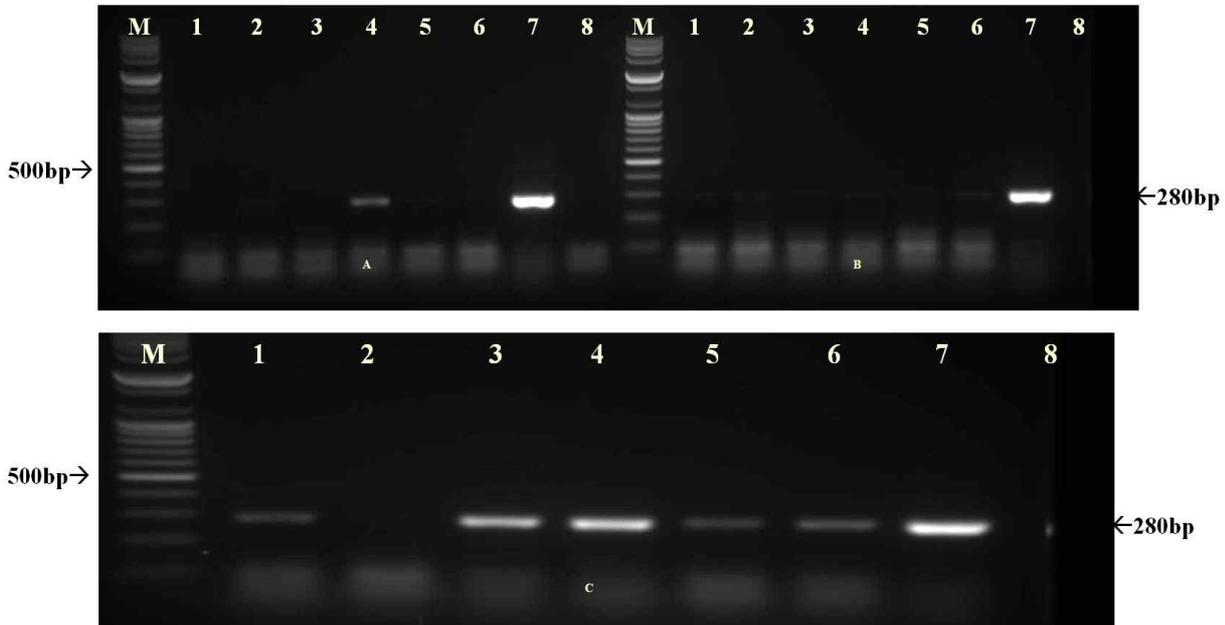


그림 3. Amplification of the NCR from the BVDV using RNA extracted from non-treated antigen (A) isopropyl myristate-treated antigen (B), and sodium citrate-treated antigen (C) with specific primer sets for the NCR of BVDV. The expected size was 288 bp. M: 100-bp DNA ladder; lane 1-6: company A, B, C, D, E, F, lane 7: positive, lane 8: negative, respectively.

Stain		
KD26	1	ATGCCCTTAGTAGGACTAGCATAAAGAGGGGGGTAGCAGCAGTGGTGAGT
Company A	1	.....
Company B	1	.....T.....A.....
Company C	1	.....
Company D	1	.....A.....T.....A.....
Company E	1	.....
Company F	1	.....T.....A.....
KD26	51	TCGTTGGATGGCTTAAGCCCTGAGTACAGGTTAGTCGTCAGTGGTTCGAC
Company A	51	.....
Company B	51	.....
Company C	51	.....
Company D	51	.....
Company E	51	.....
Company F	51	.....
KD26	101	GCCTTGAATAAAGGTCTCGAGATGCCACGTGGACGAGGGGCATGCCCAA
Company A	101	.....
Company B	101	.....
Company C	101	.....G.....
Company D	101	.....C.....
Company E	101	.....
Company F	101	.....
KD26	151	GCACATCTTAACCTGAGCGGGGGTGCGCCAGGTAAAAGCAGTTCTAACC
Company A	151	.....
Company B	151	.....T.....
Company C	151	.....
Company D	151	.....G.....G.....T..TA
Company E	151	.....
Company F	151	.....T.....
KD26	201	ACTGTTACGAATACAGCCCTGATAGGGTGCIGCAGAGGCCCACTGTTCTGC
Company A	201	.....
Company B	201	.....AT.....
Company C	201	.....
Company D	201	.....C.....CAT.....
Company E	201	.....
Company F	201	.....AT.....
KD26	251	TACTAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGGAGTTGA
Company A	251	.....
Company B	251	.....
Company C	251	.....
Company D	251	.....
Company E	251	.....
Company F	251	.....

그림 4. Comparison of the nucleotide sequences of non-coding region of the vaccine

strains and representative Korean BVDV isolates. Dots indicate nucleotides agreeing with the first line sequence.

6개의 백신으로부터 얻어진 245 bp의 염기서열을 바탕으로 해서 그림 4와 같이 분석하였다. 6개의 불활화백신주는 모두 BVDV type I으로 확인되었으며, 백신주 사이의 상동성은 95.1%에서 100%의 상동성을 나타내었다. 한국의 BVDV 분리주와 불활화백신주사이의 상동성은 80.5%에서 99.6%의 상동성을 나타내었다. 그림 5에서 보는 바와 같이 GenBank에서 얻어진 31개의 BVDV의 유전자와 비교하였을 때 다양한 유전자형을 확인할 수 있었다. 제조회사 D의 BVDV 백신이 다른 백신과 가장 큰 상동성의 차이를 나타내었다.

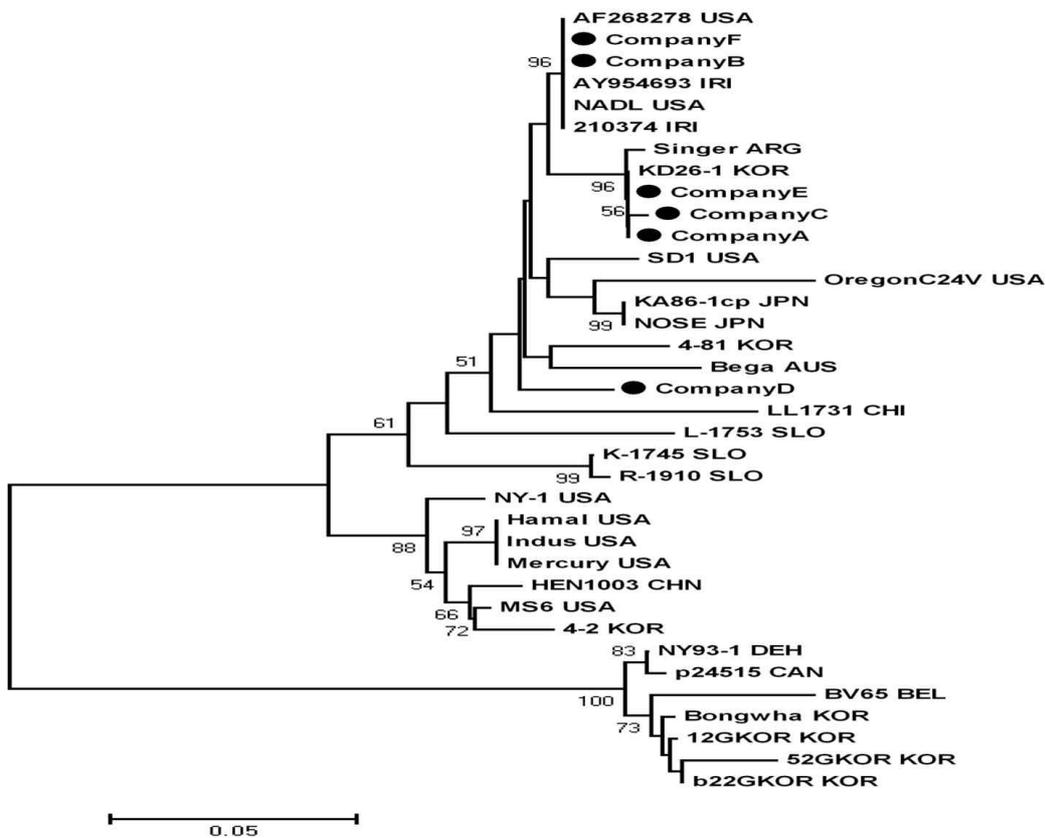


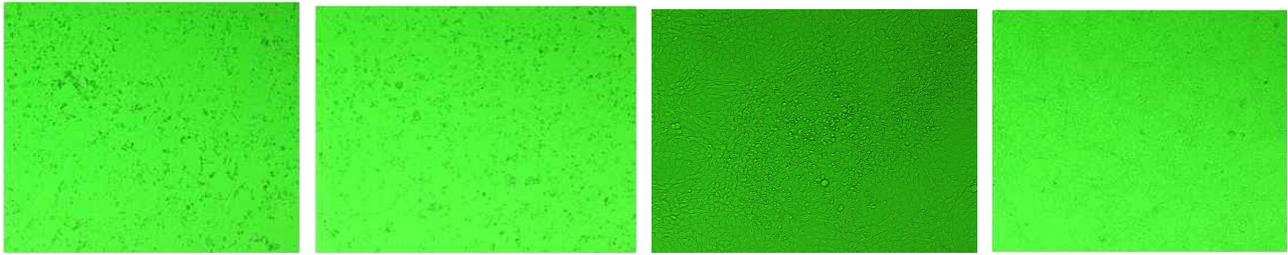
그림 5. Phylogenetic analysis based on the partial NCR nucleotide sequences of the vaccine strains and other sequences obtained from the GenBank database. Numbers at each key node indicate the degree of bootstrap support and only those with >70% support are shown.

본 연구를 통해 분자 생물학적인 방법으로 BVDV 불활화백신에서 항원 진단법 확립하였다. BVDV 백신에는 BVDV genotype 2가 함유되어 있지 않는 것으로 확인되었다. BVDV 백신 개발시 genotype 2가 들어간 백신이 개발되어야 할 필요가 있으며, 백신내에 함유된 유전자를 통해서 회사가 임의로 백신주를 변경할 수 없는 기술적인 방법을 개발한 것으로 평가될 수 있다.

### 3. 국내 야외 BVDV의 분리

#### 가. BVDV 분리 방법 및 세포변성효과

혈액내에 잔존하는 지속감염우로부터 BVDV를 분리하기위해 밀양, 영주, 울산 및 포천에서 얻어진 혈청과 뇌조직 800개를 이용하여 MDBK 세포에 접종하였다. 감염 후 5일이 지나서 7개의 시료에서 세포변성효과를 나타내었다. 그림 6 에서 보는 것과 같이 세포의 뭉침과 결국은 탈락을 나타내었고, 이 세포를 고정하고 BVDV 특이 항체를 이용하여 형광항체검사를 확인한 결과 특이적인 형광을 나타내었다.



Milyang strain

Youngju strain

Youngwol strain

Control MDBK

그림 6. MDBK 세포에서 세포변성효과(CPE)를 보이는 3주의 BVDV 분리주

#### 나. 국내 분리 BVDV 특성조사

7개의 BVDV 분리주 대하여 RNA 추출 키트(Qiagen)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 핵산을 추출하였다. 추출된 RNA는 증류수 50 ul에 용출하였다. RT-PCR은 panpestiF, panpestR의 특이 프라이머를 이용하여 NCR부위를 증폭하였다(표 1). RT-PCR의 반응은 RNA 2 ul, 각 primer 1 ul 5X buffer 10ul, dNTP 2 ul, exzyme mix 2 ul, 증류수 32 ul를 혼합하고, 42°C에서 30분간 cDNA를 만들고 그 이후 35 cycle( 95°C 45초, 55°C 45초, 72°C 1분)과 마지막 1 cycle 72°C 5분을 수행하였다. PCR 산물은 1.8% agarose에서 전기영동하여 확인하였다. 2개의 PCR 산물은 gel extraction을 실시하였고, pGEMT easy vector에 클로닝 하였다. 플라스미드 DNA는 대장균에서 증식하고 재조합 플라스미드는 EcoRI 효소의 처리를 통해 확인하였다. 정제한 플라스미드의 염기서열은 MJ research PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit를 이용하여 분석하였다. 염기서열은 SP6, T7 primer을 이용하여 수행하였고 양방향의 DNA 염기서열을 확인하였다. 그림 7에서 보는 것과 같이 국내에서 분리한 BVDV의 유전형은 BVDV type I으로 확인되었다. 지속감염우에서 분리되는 바이러스는 세포변성효과를 나타내지 않은 것으로 보고되고 있는데 국내에서 분리한 7개의 BVDV 분리주는 유전형이 BVDV tyoe 1이면서 세포변성효과를 나타내는 것으로 향후 백신주 등 여러 가지 용도로 사용이 가능할 것으로 기대된다. 총 7주의 BVDV를 분리하였으며, 그 중 5주는 KVCC에 기탁하였다.

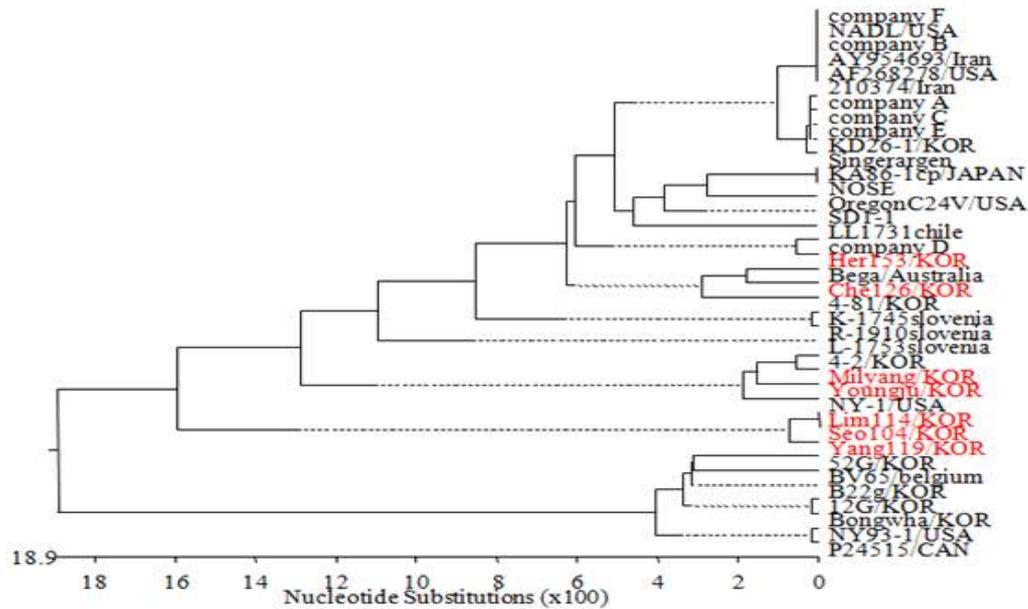


그림 7. 국내 BVDV 분리주 및 백신주를 이용한 phylogenetic tree

#### 4. BVDV E2 재조합 베칼로바이러스 작성 및 단백질 발현

##### 가. BVDV E2 유전자를 함유하는 클론 작성

BVDV E2 단백질을 발현하는 유전자 재조합 베칼로바이러스를 제작하기 위하여 BVDV E2 gene의 transmembrane 부분과 endodomain을 제거한 유전자인 1029 bp를 pGEM T vector에 클로닝하였고, 그 이후 베칼로바이러스 전달벡터인 pAcGP67B 벡터에 삽입하였다. 그림 8에서 보는 것과 같이 BVDV E2 유전자는 BamHI 효소로 처리하여 pAcGP67B 내에 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

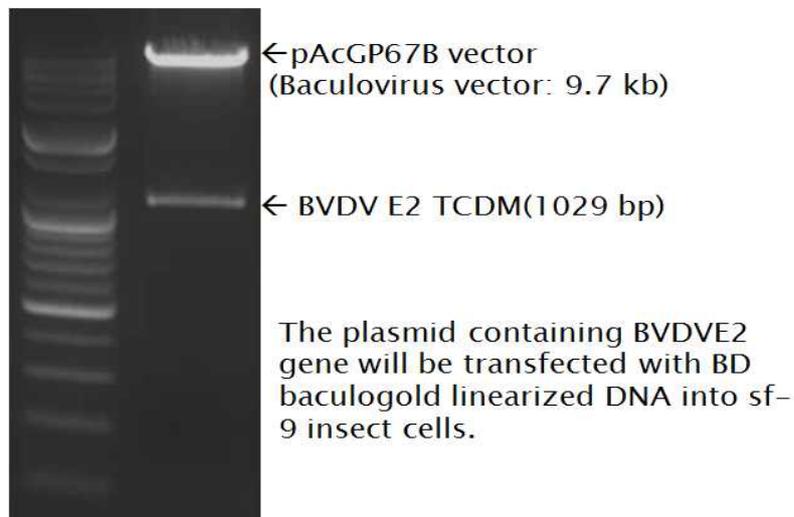


그림 8. BVDV E2 TCDM 유전자를 BamHI으로 처리한 결과 1029 bp의 BVDV 유전자를 확인하였다.

### 나. BVDV E2 벡로바이러스의 작성

BVDV E2 유전자가 함유된 전달벡터를 대장균에 transformation하여 대량의 plasmid를 확보하였고 그 plasmid를 곤충세포에 transfection하였다. 곤충세포를  $2 \times 10^6$  개를 60mm의 dish에 planting 하고 난후 Baculovirus linearized DNA와 BVDV E2 gene이 함유된 pAcGP67B plasmid를 혼합하고 실온에서 5분간 정치한 후 신선한 배지로 곤충세포를 세척하고 transfection A solution을 첨가하고 난 후 baculovirus + pAcGP67B 혼합액을 떨어뜨렸다. 4시간 이후에 신선한 곤충세포 배양배지를 첨가하고 5일 동안 27°C에서 배양하였다. 배양 후 5일째에 그림 9와 같이 세포변성효과를 나타내었고, agarose overlay를 이용하여 클로닝하였다. 클로닝한 재조합 벡로바이러스를 seed로 정하고 BVDV 항체를 이용하여 형광항체 염색을 실시하였다. 그림 9에서는 보는 바와 같이 형광을 확인 할 수 있었다.

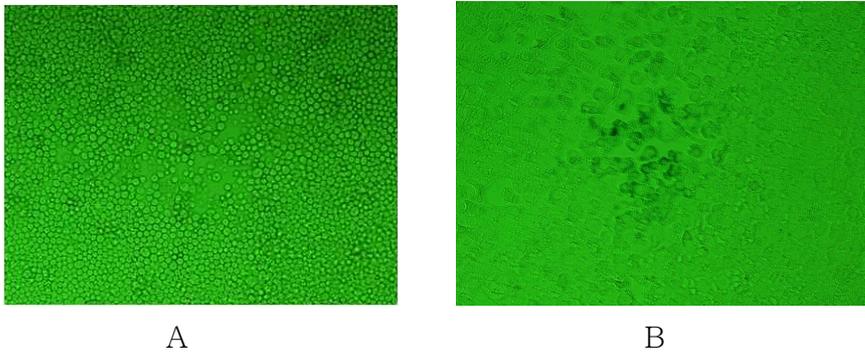


그림 9. BVDV E2 재조합벡로바이러스의 세포변성효과(A)와 betagalactosidase (B)

BVDV E2 재조합 벡로바이러스를 곤충세포에 접종하여 세포변성효과를 확인한 후 고정하여 BVDV type I과 II에 특이적인 BVDV 항체를 이용하여 BVDV E2 단백질의 발현여부를 확인하였다. 그림 10에서 보는 것과 같이 BVDV type I 과 II의 항체에 특이적인 형광을 확인 할 수 있었다.

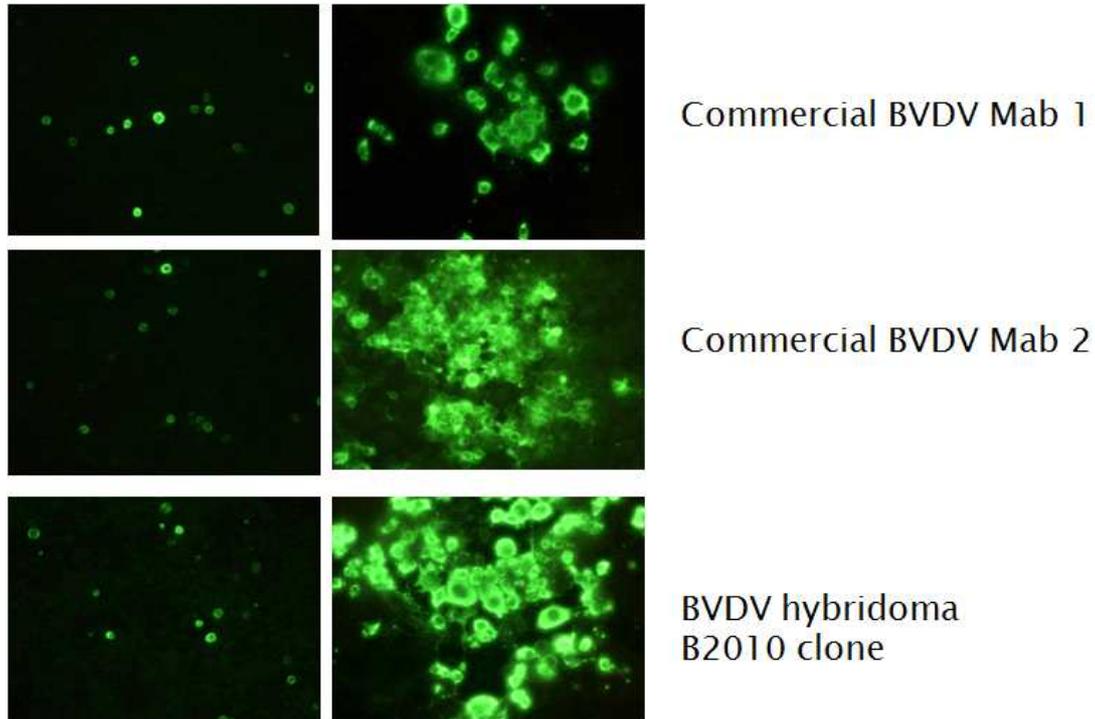


그림 10. 시간의 경과에 따른 BVDV type I과 II의 특이 항체로 염색한 BVDV E2 재조합 벡로바이러스

## 5. BVDV의 특이 항체 생산

### 가. BVDV의 생산 및 농축

BVDV genotype 1 strain, KD26-1을 roller bottle에 증식시킨 MDBK 세포에 접종하여 3일간 배양하였다. 수확한 BVDV를 3회 동결 용해과정을 걸쳐 세포내·외의 바이러스를 3,000 rpm에서 원심하여 세포 찌거기를 버리고, PEG 8,000을 이용하여 농축하였다. 원심한 바이러스 상층액에 NaCl과 PEG 첨가하고 녹인 후 4°C에서 하룻밤 정치하였다. 다시 3,000 rpm에서 10분간 원심하여, 상층액은 버리고 PBS로 바이러스 원액의 1/10로 희석하여 투석막에 넣고 하룻밤 PBS로 투석하였다. 투석한 항원을 다시 3,000 rpm에서 원심하여 -20°C에 보관하면서 마우스를 면역하기 위하여 사용하였으며, 농축한 항원의 바이러스 함량은  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 확인되었다.

### 나. 발현된 BVDV E2 재조합 단백질 농축

175 cm<sup>5</sup> flask 내에 곤충세포 성장시키고 BVDV E2 재조합 벡로바이러스를 접종하여 5일 동안 배양한 후에 수확하였다. 세포내에 있는 재조합 단백질을 얻기위하여 3번에 걸쳐 얼리고, 녹이는 과정을 반복한 후 상층액을 3000g에서 15분 동안 원심하여 세포 찌거기를 제거하였다. Sodium chloride를 0.5M이 되도록 첨가하고, PEG(Sigma MW 8,000)의 농도가 8%가 되도록 첨가한 혼합액을 재조합 단백질을 침전을 위해 4°C에서 10시간 동안 정치하고 난후 10,000g에서 30분 동안 원심하였다. 그 상층액은 버리고 침전물은 최초의 양의 10%에 해당하는 PBS로 현탁하고 투석막에 담아 PBS로 4°C에서 투석하였다. 이 항원을 Balb/C 마우스를 면역하는데 항원으로 사용하였다.

#### 다. BVDV 및 재조합단백질로 마우스의 면역

4주령 female BABL/c mouse를 구입하여 BVDV 및 BVDV E2 재조합베쿨로바이러스 농축액에 에쥬번트를 혼합하여 2주 간격으로 3회 복강으로 접종하였다. 마우스의 비장을 적출하기 3일전에 농축된 항원을 복강으로 접종하였다. 비장을 적출하기 전에 마우스가 면역되어 있는지를 확인하기 위하여 BVDV가 감염되어 있는 MDBK 세포에 면역된 마우스의 혈청을 검사하였다. 그림 11에 나타난 것과 같이 500배까지 양성을 나타내었다.

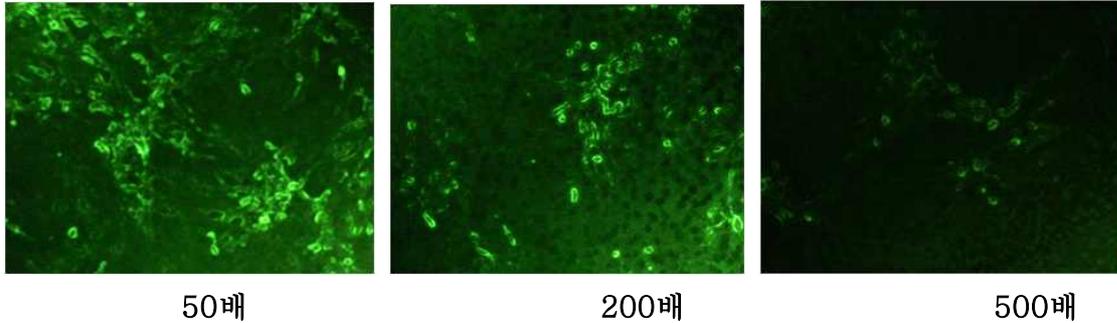


그림 11. BVDV 및 BVDV E2 재조합 항원을 이용하여 면역한 마우스의 혈청에서 항체가

#### 다. BVDV 특이 항체를 분비하는 hybridoma의 작성

농축한 BVDV항원과 BVDV E2 재조합단백질을 항원으로하여 mouse에 면역하고 그 마우스의 비장을 이용하여 myeloma cell (sp2/0)와 융합하여 특이 BVDV 항체를 생산하였다. 표 2에 나타난 것과 같이 생산한 BVDV 특이 항체의 클론은 3F1, 3F3, 33H11, 35D1, 35D11, 4C11, 5B9, 5D1, 5D1, 5D5, 53E6, 55C2, 63B4, 64E1, 64H12, BD5, BC6, BE8, BD12이며, 총 18종으로 BVDV type 1에는 특이적으로 잘 반응하였다. 그러나 BVDV type 2와 Erns에는 반응하지 않았지만 13종의 hybridoma는 E2에 반응하였다.

표 2. BVDV에 특이적인 항체를 나타내는 hybridoma 및 특성

	Clone	BVDV-1	BVDV-2	E2(FA)	Erns	상층액 titer	복수 titer
1	3 F1	++	-	+	-	128	1200
2	3 F3	++	-	-	-	>128	3200
3	3 3H11	++	-	+	-	64	6400
4	3 5D1	++	-	+	-	64	1200
5	3 5D11	++	-	-	-	64	200
6	4 C11	++	-	+	-	>256	6400
7	5 B9	++	-	+	-	16	12800
8	5 D1	++	-	+	-	>256	12800
9	5 D5	++	-	-	-	4	6400
10	5 3E6	++	-	+	-	128	6400
11	5 5C2	++	-	++	-	>256	12800

12	6 3B4	++	-	-	-	>128	800
13	6 4E1	++	-	+	-	>256	6400
14	6 4H12	+	-	-	-	32	1200
15	BD5	++	-	+	-	64	200
16	BC6	++	-	+	-	64	6400
17	BE8	++	-	+	-	64	800
18	BD12	++	-	+	-	128	3200

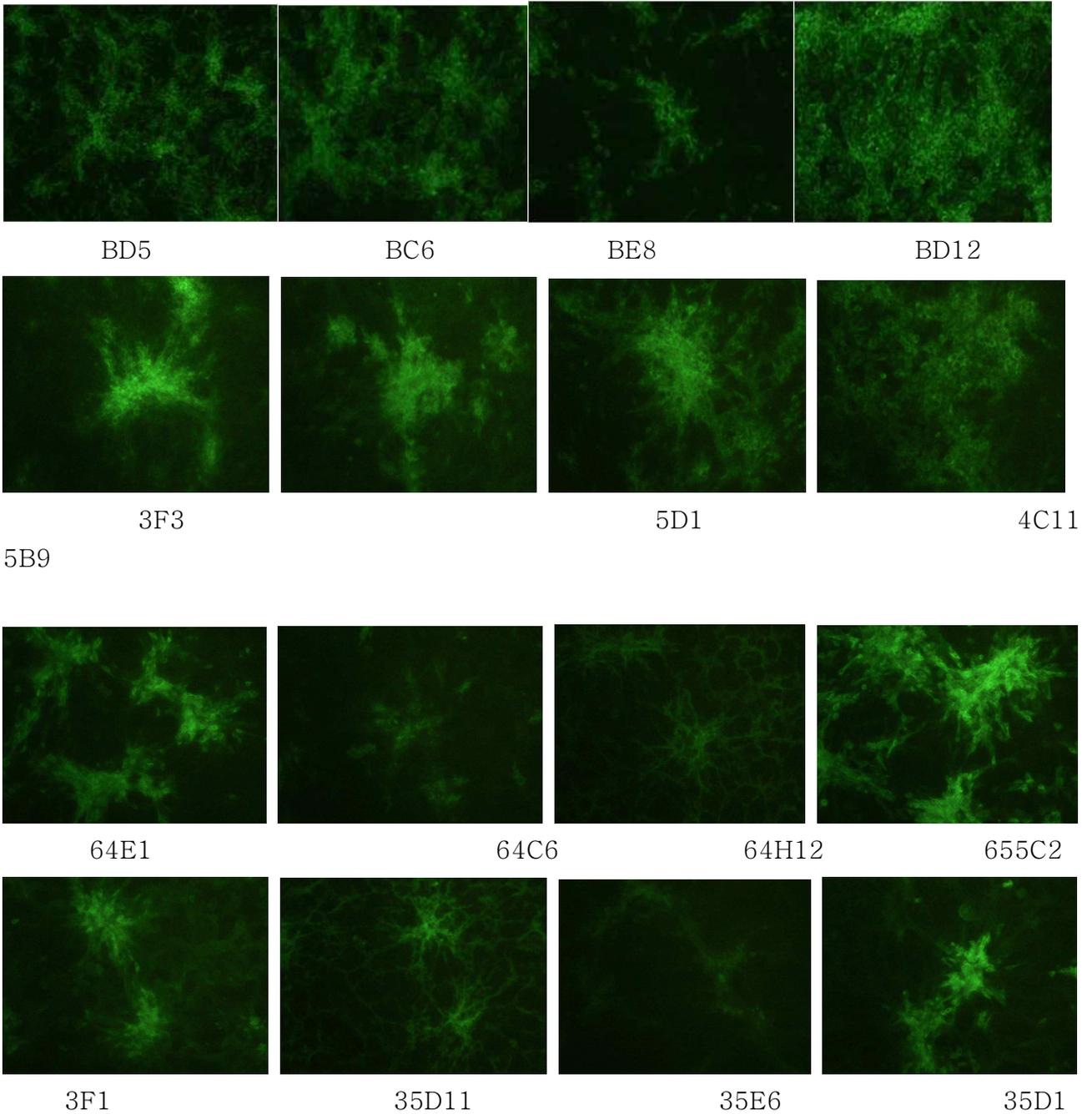


그림 12. BVDV 특이항체를 이용한 FA test 결과

**라. BVDV 특이 단클론 항체의 특성조사**

총 18종의 BVDV 항체를 이용하여 BVDV 농축 항원을 이용하여 Western blotting한 결과 그림 13에서 보는 것과 같이 특이적인 단백질을 확인할 수 있었다. 단백질의 크기는 55 kDa 의 E2 단백질로 나타났다.

E2에 대한 항체확인용 BVDV E2 재조합 배칼로바이러스를 Sf-9 세포에 감염시킨 후 형광 항체를 통해 염색하였을 때 특이적인 형광을 나타내었을 때 확인 하였는데 13종의 hybridoma가 E2에 반응하였다.

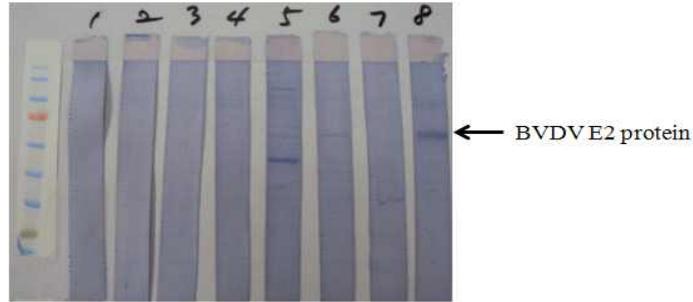
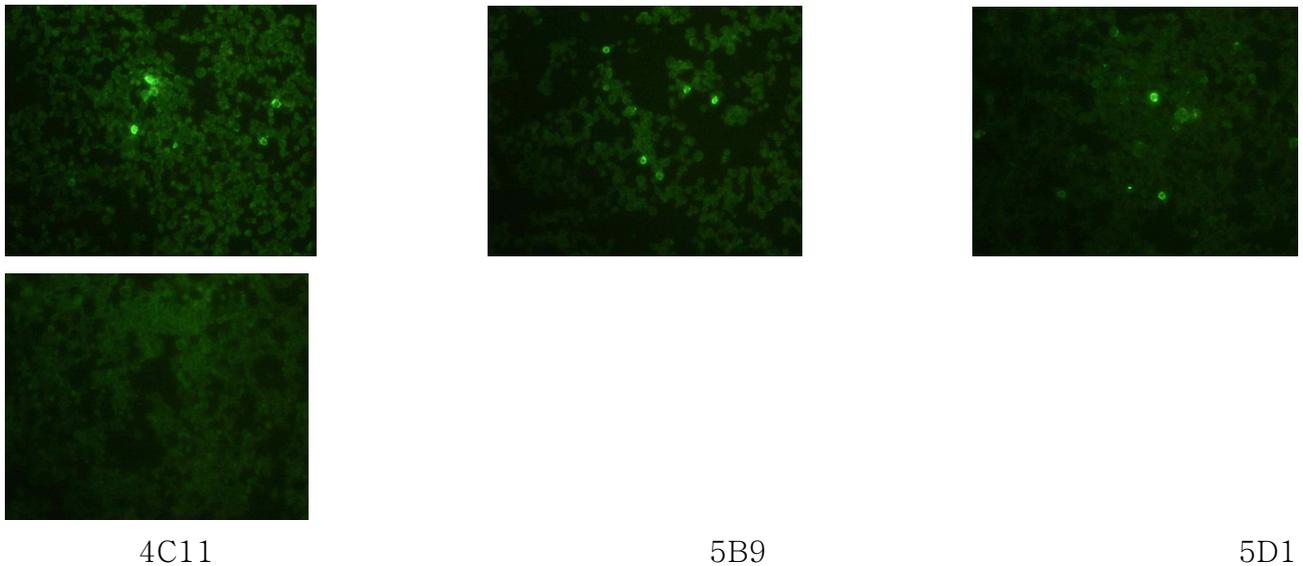


그림 13. 농축한 BVDV와 BVDV E2 재조합단백질에 대한 특이항체 의한 Western blotting.



3F3

그림 14. BVDV E2 재조합 배칼로바이러스에 BVDV 특이 단클론항체에 반응한 클론으로 3F3은 반응을 나타내지 않았다.

**마) BVDV hybridoma에서 VH 및 VL 유전자의 클로닝**

BVDV hybridoma의 보관은 주로 액체질소에서 보관한다. 이 항체생산 세포는 적절하게 유지하지 않으면 항체생산세포는 사멸하고 만다. 이러한 문제점을 해결하기위해 항체를 생산하는 유전자 염기서열을 확인하고 클로닝하여 단백질을 발현하면 보관 및 유지의 문제를 쉽게 해결 할 수 있으며, 진단액 및 치료용으로 사용이 가능하다. 따라서 BVDV 특이 항체로부터 그림

15 및 16과 같이 항체생산 유전자를 클로닝하고 염기서열을 확인하였다.



그림 15. BVDV 특이항체를 나타내는 hybridoma로부터 VH 및 VL 유전자를 증폭한 사진



그림 16. BVDV 특이 항체를 생산하는 hybridoma에서 확인된 항체생산 유전자 염기서열 및 linker를 통해 VH와 VL의 유전자를 연결

## 6. 국내 사용 중인 아까바네 생백신주의 분자생물학적 평가

### 가. 아까바네 생백신주의 특성분석

국내 5개 생물학적제제 제조회사에서는 아까바네병을 생산 판매하고 있다. 아까바네 생백신을 개발할 당시에는 물리적인 특성을 바탕으로 동정하였는데 분자생물학적 특성을 바탕으로 현재 사용 중인 아까바네 생백신주를 평가할 필요가 있다. 따라서 5개의 아까바네 백신을 이

용하여 Vero세포에 백신을 접종하여 CPE, 형광항체, RT-PCR 기법, 및 N 유전자의 염기서열을 확인하였다.

백신주의 확인은 5개의 상용화된 백신을 Vero 세포에 접종하고 7일 동안 CO2 배양기에 배양하고 CPE를 확인하였고, CPE가 관찰된 well은 80%의 냉 아세톤으로 고정하고 아까바네 특이 monoclonal antibody를 이용하여 형광염색을 실시하였다. 그림 17에서 보는 것과 같이 5개 제조회사에서 생산한 아까바네 생백신은 Vero 세포에서 CPE를 나타냈었으며, FA test에서도 형광을 확인 할 수 있었다.

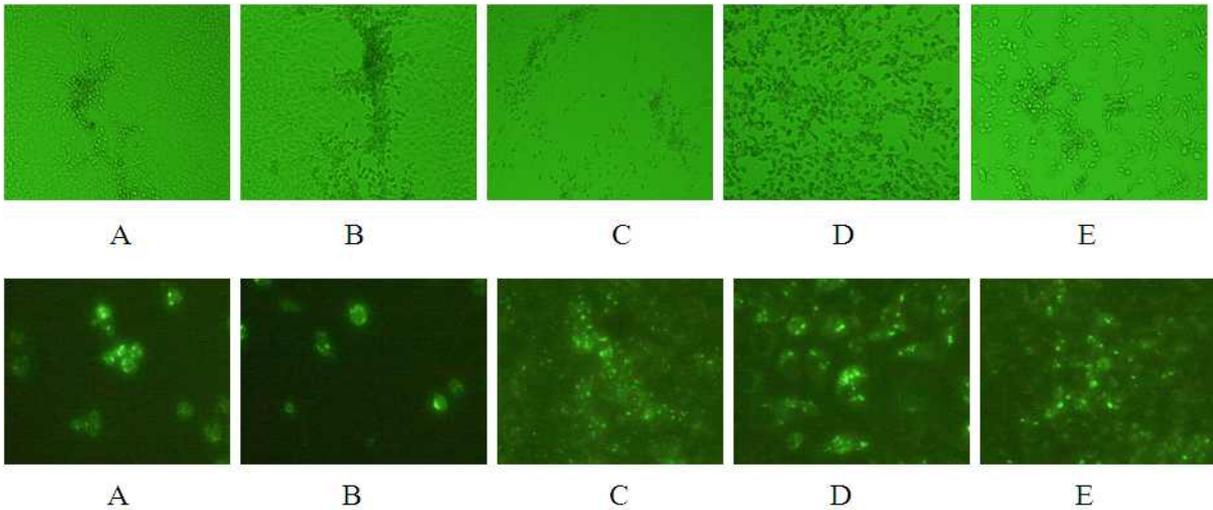


그림 17. Akabane live vaccine has been produced by 5 Korean biological companies. Monoclonal antibody against Akabane virus was made by QIA.

#### 나. 아까바네 생백신주의 클로닝

아까바네 생백신내의 바이러스 핵산은 RNA 추출 키트 (Qiagen)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 추출하였다. 추출된 RNA는 증류수 50 ul에 용출하였다. RT-PCR은 표 3에 나타난 것과 같이 AKAD1F, AKAD1R, AKAD2F, AKAD2R의 특이 프라이머를 이용하여 N gene을 증폭하였다(표 2). RT-PCR의 반응은 RNA 2ul, 각 primer 1 ul 5X buffer 10 ul, dNTP 2 ul, exzyme mix 2 ul, 증류수 32 ul를 혼합하고, 42℃에서 30분간 cDNA를 만들고 그 이후 35 cycle( 95℃ 45초, 55℃ 45초, 72℃ 1분)과 마지막 1 cycle 72℃ 5분을 수행하였다. PCR 산물은 1.8% agarose에서 전기 영동하여 확인하였다. 모든 PCR 산물은 gel extraction을 실시하였고, pGEMT easy vector에 클로닝 하였다. 플라스미드 DNA는 대장균에서 증식하고 재조합 플라스미드는 *EcoR* 1 효소의 처리를 통해 확인하였다. 정제한 플라스미드의 염기서열은 MJ research PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit를 이용하여 분석하였다. 염기서열은 SP6, T7 primer을 이용하여 수행하였고 양방향의 DNA 염기서열을 확인하였다.

**표 3.** List of the oligonucleotide primers used for RT-PCR of the Akabane vaccine

Primer designate	Oligonucleotide sequence(5'-3')	Nucleotide position	RNA segment	Size of amplicon
AKAD1F	CACAACCAAGTGTGTCGATCTTA	209-226*	S	354 bp
AKAD1R	TGAAGTTGACATCCATTCCATC	526-539		
AKAD2F	ATGGCAAATCAATTCATTTTC	34-54	S	702 bp
AKAD2R	TTAGATCTGGATACCAAA	735-718		

#### 다. 아까바네 생백신주의 유전자 분석

아까바네 바이러스의 N 유전자의 근연관계를 분석하기 위해 GenBank database로부터 얻은 것과 5개의 상용화된 백신에서 얻어진 702 bp의 염기서열을 이용하여 Clustal W2를 통해 비교하였다. Genetic distance는 Kimura-2 correction parameter에 의해 계산되었고, phylogenetic tree는 neighbor-joining 방법으로 구성하였다. 그림 18에서 보는 것과 같이 5종의 아까바네 생백신은 2개의 진단용 primer에서 특이적으로 증폭되었고, 클로닝 하였다.

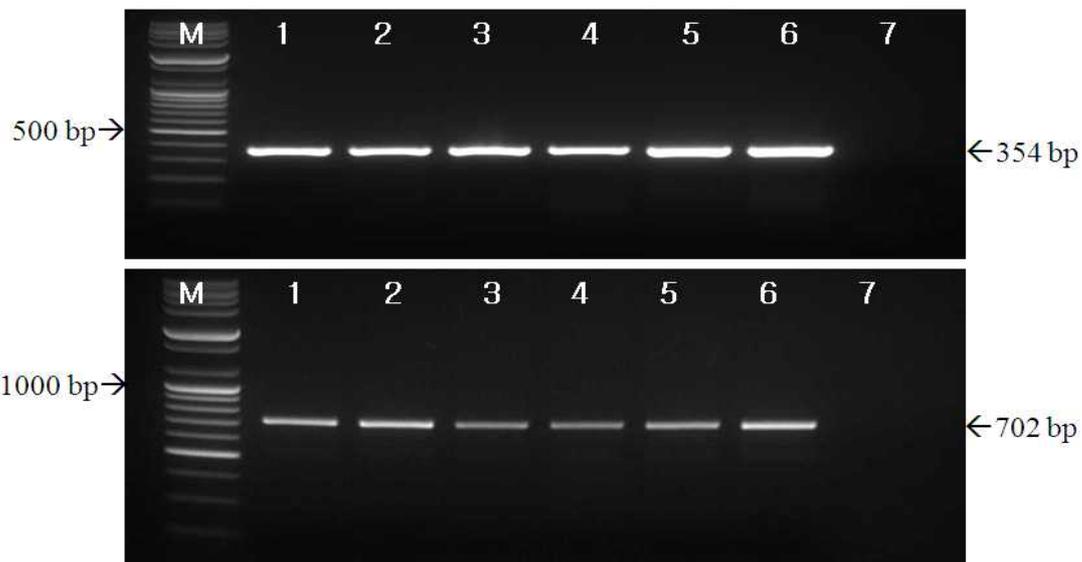


그림 18. Amplification of Akabane virus N gene by the RT-PCR method using the Akabane virus-specific primers. M: 1Kb DNA ladder, lane 1-5: Akabane live vaccine A to E, lane 6: KV0505 strain, lane 7: Negative.

클로닝 된 아까바네 N 유전자 702 bp를 아미노산으로 번역하여 얻어진 아미노산 서열을 확인한 결과 그림 19에 나타난 것과 같이 company E사에 단 1개의 아미노산이 다르게 나타났으나 다른 4개회사는 동일한 유전자를 갖는 것으로 확인되었다. 따라서 국내에서 사용하고 있는 아까바네 생백신주는 동일한 균주를 사용하고 있는 것으로 확인되었다.

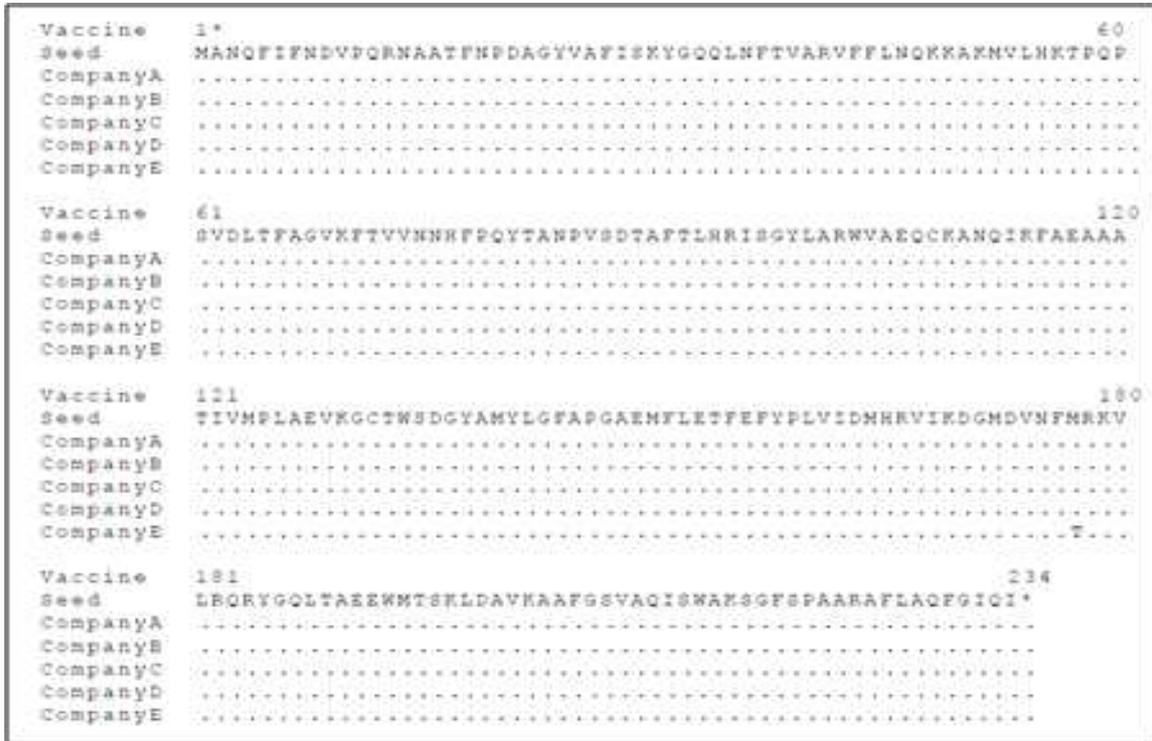


그림 19. Multiple sequence alignment of the deduced amino acids of nucleoprotein among five commercial Akabane vaccine strains. The amino acids that are identical to company A are indicated by dots, while different one is indicated by abbreviated letter. \*: Numbers indicate the amino acid sequence of nucleoprotein gene of Akabane virus strain.

**다. 아까바네 생백신주의 S 유전자를 바탕으로 한 phylogenetic tree**

Genbank로부터 얻어진 41개의 아까바네 유전자와 5개의 백신에서 얻어진 염기서열을 바탕으로 비교분석 한 결과 그림 20에서 보는 것과 같이 5개의 백신회사사이의 상동성은 99.9%에서 100%까지 나타났으며, 1993년도에 분리한 93FMX 분리주와의 상동성도 99%를 나타내고 있다. 더군다나 연역된 아미노산의 비교는 nucleotide 염기서열과 마찬가지로 99.9%에서 100%까지 나타났다. 그리고 아까바네 백신주는 일본 및 다른 나라에서 분리 보고된 유전자와의 상관성을 비교했을 때 97.3%부터 99.7%까지의 상동성을 나타냈으며, group Ic로 분류되었다.



그림 20. Phylogenetic tree based on the complete N genes (702 bp) of Akabane virus vaccine strains. Bootstrap values above 50 are shown. The abbreviations of countries are as follows: AUS, Australia; ISR, Israel; JPN, Japan; KEN, Kenya; KOR, Korea; TAI, Thailand.

#### 라. 마우스에서 아까바네 백신의 안전성 시험

4주령 마우스에서 아까바네 생백신주의 병원성을 알아보기 위하여  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스를 10진희석하여 복강과 뇌내에 접종하였다. 그림 21에서 보는 것과 같이 접종된 마우스는 15일 동안 관찰하였는데 복강으로 접종한 마우스는 어떤 임상증상이나 몸무게의 변화를 나타내지 않았다. 뇌내로 접종한 마우스는 접종 후 7일간 점차적으로 체중이 감소하다가 7일 이후에는 다시 증가하였으며, 그 이후 어떤 임상증상도 나타나지 않았다. 이것은 아까바네 백신이 안전하다는 것을 입증하는 것이다. 그리고 KV05050 strain도 비슷한 결과를 나타내었다.

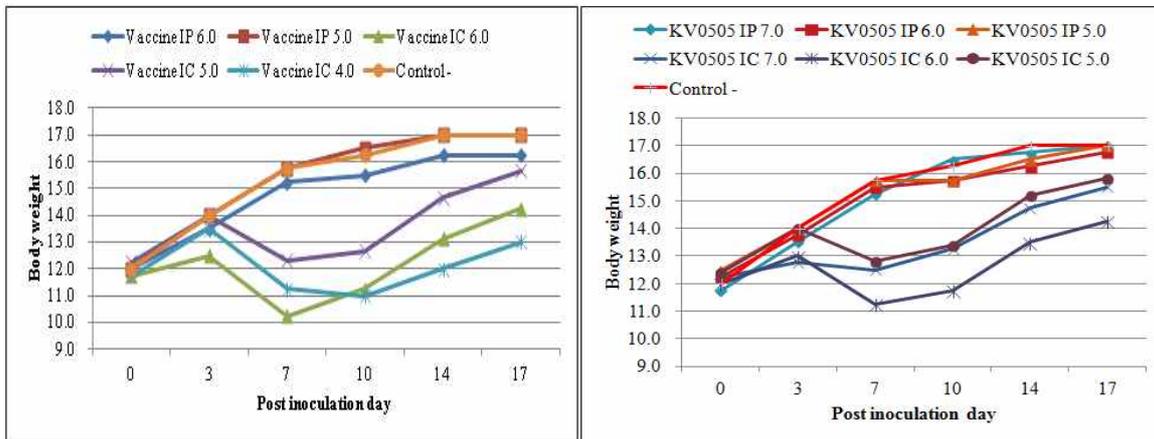


그림 21) Change of body weight in mice. The mice inoculated with AKAV vaccine and KV0505 strain via intraperitoneal route did not show loss of weight, but via intracranial route decrease at 7 days post-inoculation.

## 7. 국내 남부지역의 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 항체가 조사

### 가. 소 혈청의 수집 및 중화시험

2010년에 남원지역에 아까바네병이 폭발적으로 발생하였다. 아까바네병이 발생한지 2년이 경과 후 남원지역과 다른 3지역(울진, 영주, 밀양)에 얻은 1,743두의 혈청을 바탕으로 아까바네병에 대한 혈청학적 조사를 실시하였다. 남원지역에서 1,012두, 영주 237두, 밀양 295두, 울진 199두를 대상으로 아까바네병과 유행열바이러스에 대하여 혈청중화시험을 실시하였다. 혈청의 희석은 2배부터 256배까지 희석하였고, 200 TCID<sub>50</sub>/0.1 ml의 바이러스로 중화시험을 실시하였다.

### 나. 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 혈청검사 결과

그림 22에서 보는 것과 같이 1,743두 중 아까바네 바이러스에 대하여 1,042(59.8%)두가 2배 이상의 항체가를 나타내었다. 지역별 항체가로는 남원이 63.2%, 밀양 71.9%, 영주 23.2%, 울진이 67.8%의 양성률을 나타내었으며, 전체적으로 59.8%를 나타내었다. 그러나 백신을 접종하지 않은 것으로 추정되는 소가 전체의 50.2%이며, 백신접종 추정소 즉 4배에서 32배까지의 항체가를 갖는 소는 27%를 나타내었으며, 야외 감염으로 추정되는 64배 이상의 소가 22.8%를 나타내고 있어 소의 아까바네 백신 접종률이 낮은 것으로 해석된다. 그리고 유행열 바이러스에 대한 항체가는 전체 1.2%만이 양성을 나타내어 야외 유행열 바이러스의 유행이 거의 없는 것을 추정되지만 백신접종이 잘 이루어지고 있지 않음을 확인 할 수 있었다.

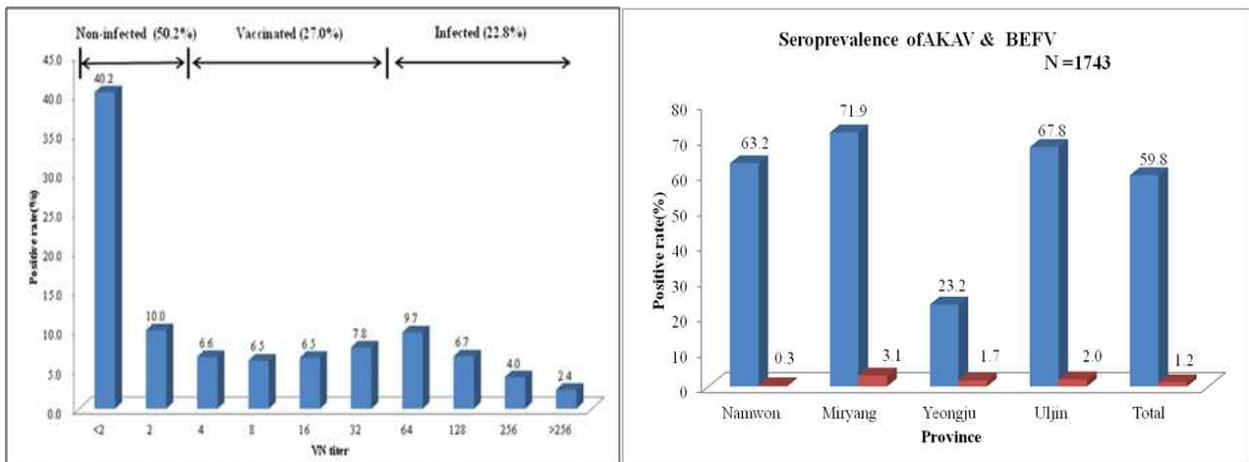


그림 22) 항체가 수준에 따른 양성률 및 지역별 아까바네병 항체 양성률

### 다. 지역별 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 혈청검사

그림 23에서 보는 것과 같이 16배 이하의 백신항체가로 64배 이상은 모기에 의한 감염이라 추정했을 때 3개 지역의 항체가별 양성률은 크게 차이가 나타나지 않았지만 영주지역에서는 23.3%로 낮았는데 이것은 농장 수가 적었기 때문으로 추정된다. 그리고 소 유행열 바이러스에 대한 항체가는 0.3%에서 3.1%로 매우 낮다. 따라서 남원지역의 경우 2010년에 폭발적인 아까바네병이 발생 하였음에도 항체가 70%이상을 보이고 있지 않다. 따라서 아까바네병에 대한 백신접종을 홍보할 필요가 있으며, 면역원성이 우수한 백신의 개량이 필요함을 반증한 것으로 보인다.

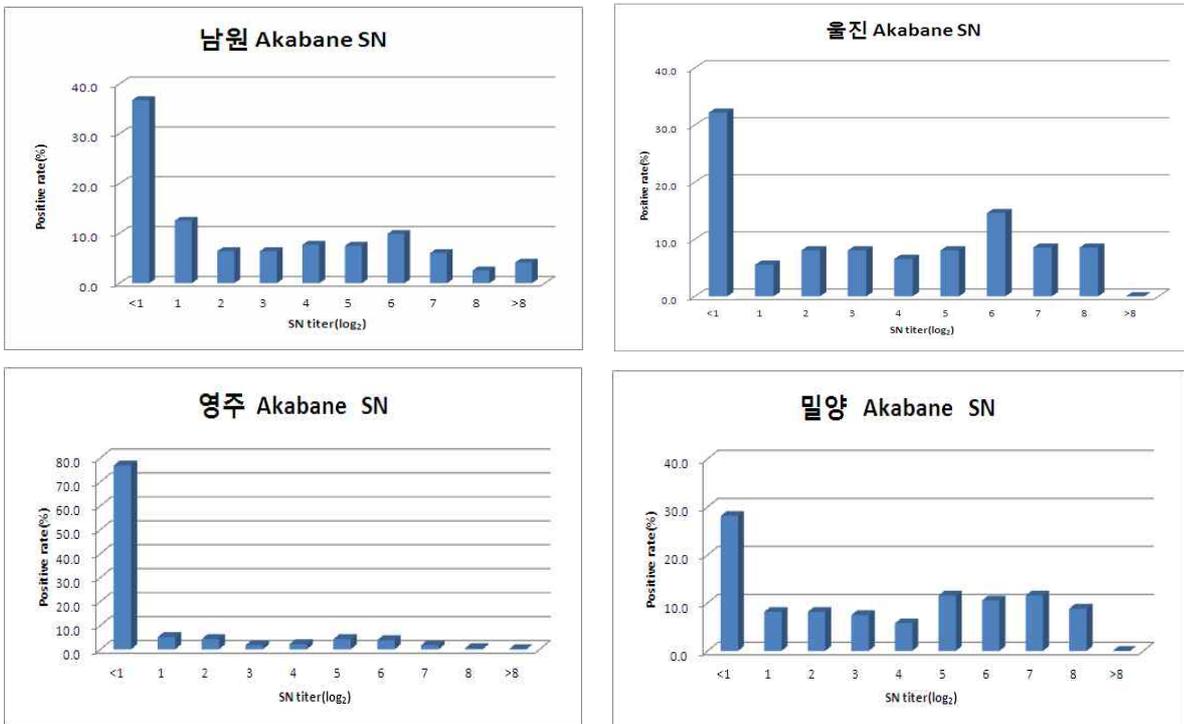


그림 23. 4개 지역의 항체가 수준별 아까바네병 양성률

#### 라. 유행열 바이러스에 대한 항체의 판넬 구축

2010년에 국내 남부지역에서 아까바네와 유행열이 발생한 이후 3년이 지난 후 다시 항체를 조사한 결과 아까바네병은 59.8%의 양성률을 나타낸 반면 유행열에 대해서는 1.2%의 낮은 항체가를 나타내었다. 따라서 유행열 바이러스에 대한 항체를 검사하기 위해서는 양성대조 혈청이 필요하다. 따라서 매년 유행열 백신을 접종하는 농가에서 소 50두를 채혈하여 항체를 조사하고 항체가 판넬을 구축하고자 하였다. 그림 24에서 보는 것과 같이 86%의 소가 소 유행열에 양성을 나타내었고 항체가 수준도 다양하였다. 따라서 백신접종 횟수에 따라서 항체가 높게 올라가는 것을 확인할 수 있었다.

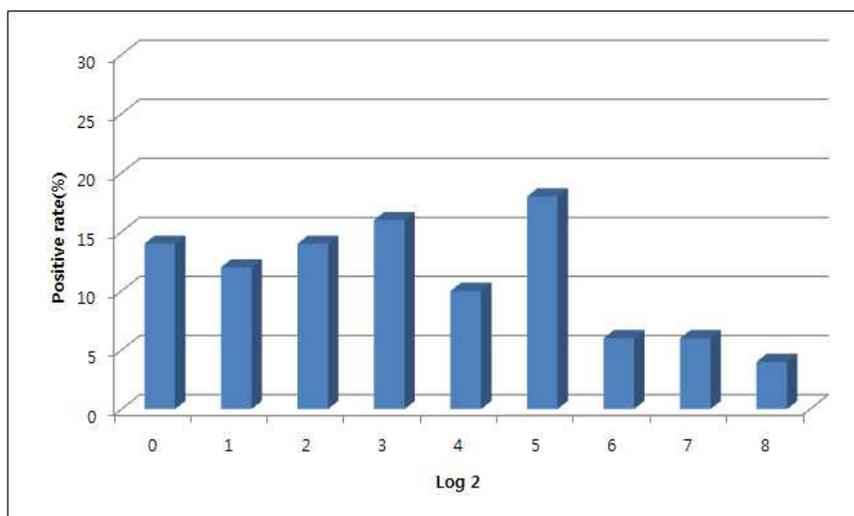


그림 24. 소 유행열 바이러스에 대한 항체 판넬

## 8. 국내 소에서 신종 소 파라인플루엔자 5형 감염증 확인

### 가. 시료의 수집

소 파라인플루엔자 5형은 Siminal virus-5로 알려져 있으며, paramyxovirus 과에 속하며, negative RNA 바이러스로 약 15,000개의 핵산으로 구성되어 있다. 바이러스 유전자는 3' -NP-P-M-F-HN-L-5' 순서로 되어있으며, 1956년 원숭이세포로부터 최초로 분리되었다. PIV-5는 신경계 친화성이면서 호흡기계 세포 친화성으로 알려져 있으며, 호흡기 삼출액, 오염된 표면, 물질의 접촉을 통해 사람 간 전파가 이루어지며, 감염은 감염물질이 있는 눈, 입, 코의 점막부분을 접촉했을 때 기침이나 재채기에 의해 만들어진 점액물질을 흡입하여 감염된다. 시료는 경기도 포천지역에서 갑자기 죽은 소의 뇌조직이다..

### 나. 바이러스의 분리

532개 뇌조직을 10% 유제액으로 만들고 3000 rpm에서 10분간 원심하여 그 상층액을 MDBK 세포가 준비되어 있는 96 well microplate에 100 ul 씩 접종하였다. 7일 동안 CO2 배양기에서 배양하고 2차 계대하였다. 사용된 배지는  $\alpha$ -MEM (Gibco BRL, USA) 과 10% 비동화된 소혈청을 첨가하였다. 532개 조직시료 중에서 그림 25에서 보는 것과 같이 4개의 시료에서 세포변성효과를 일으켰다. 4개의 시료에서 세포변성효과를 나타냈지만 농가수로는 2개의 농가에서 사육한 소에서 확인되었다.

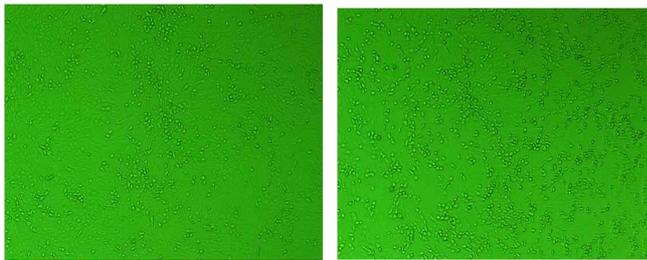


그림 25. MDBK 세포에서 CPE를 나타내는 parainfluenza virus 분리주

### 다. 분리된 바이러스의 혈구흡착능 조사

세포변성효과를 나타낸 바이러스를 다시 MDBK에 접종하고 4일째에 상층액을 버렸다. PBS로 2회 세척하고 그 위에 기니픽 혈구 0.6%를 함유한 PBS를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 배양 후 PBS로 2회 세척하고 현미경으로 관찰한 결과 그림 26에서 보는 것과 같이 기니픽 혈구가 vero 세포 표면에 흡착하는 특성을 확인하였다. 표4에서 보는 것과 같이 소 파라인플루엔자 5형 바이러스는 닭혈구를 가장 잘 응집하는 것으로 나타났으며, 혈구 응집조건은 4C에서 0.6%의 적혈구를 사용하고 pH가 7.0을 사용하는 것이 가장 높은 혈구응집가를 나타내었다.

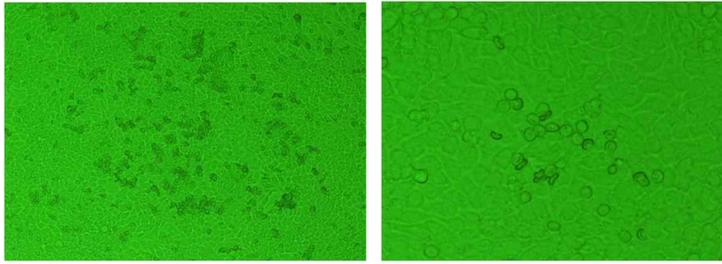


그림 26. 세포에서 출아하고 있는 bPIV5와 기니픽 혈구가 흡착되어 있는 사진

표 4. HA titer of the isolate according to erythrocytes of animal species

Species of animals	HA titer*	Condition
mouse	64	at 4°C or 22°C
Guinea pig	128	0.6% of red blood cells in PBS(pH 7.0)
Chicken	512	
Goose	128	
Pig	64	

\* The HA titer was expressed as the reciprocal of the highest virus dilution showing complete hemagglutination with erythrocytes.

#### 라. 소 파라인플루엔자 5형의 유전자 증폭 및 근연관계 확인

2개의 PIV5 분리주의 핵산은 RNA 추출 키트(Qiagen)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 추출하였다. 추출된 RNA는 증류수 50 ul에 용출하였다. RT-PCR은 Fusion gene에 대한 3종의 특이 프라이머를 이용하여 F gene을 증폭하였다(표 5). RT-PCR의 반응은 RNA 2 ul, 각 primer 1 ul 5X buffer 10 ul, dNTP 2 ul, exzyme mix 2 ul, 증류수 32 ul를 혼합하고, 42°C에서 30분간 cDNA를 만들고 그 이후 34 cycle (95°C 30초, 52°C 30초, 72°C 45초)과 마지막 1 cycle 72°C 5분을 수행하였다. PCR 산물은 1.8% agarose에서 전기 영동하여 확인하였다. 2개의 PCR 산물은 gel extraction을 실시하였고, pGEMT easy vector에 클로닝 하였다. 플라스미드 DNA는 대장균에서 증식하고 재조합 플라스미드는 *EcoR* 1 효소의 처리를 통해 확인하였다. 정제한 플라스미드의 염기서열은 MJ research PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit를 이용하여 분석하였다. 염기서열은 SP6, T7 primer을 이용하여 수행하였고 양방향의 DNA 염기서열을 확인하였다.

표 5. Oligonucleotide primers used for RT-PCR against F gene of parainfluenza virus

5

Primer name	Oligonucleotides sequence(5'-3')	Target gene	Size of amplicon(bp)
PIV5F1(1-24)*	ACC TGG AAT CAC CAG CTT GAT TTA T	Fusion	810
PIV5R1(786-810)	TTT CGA CCA CAG TCG GCA AGG TAC T		
PIV5F2(631-655)	CAG CAA TTA CAG CAG CCA ATT GTA A	Fusion	630

PIV5R2(1231-1260)	TGC ACT TGC ATA ACA TCG ACC TGC A		
PIV5F3(1232-1256)	AAA TTG CAG GTC GAT GTT ATG CAA G		
PIV5R3(1801-1825)	CGA GAC GGT TCT TTC AAT ACT AGT T	Fusion	594

\*Numbers in parenthesis indicate the nucleotide sequence of canine parainfluenza virus, FA strain (Genbank accession number: EF487542)

분리된 4종의 바이러스에 대하여 위에 언급한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 그림 27에서 나타난 것과 같이 F gene의 유전자를 각각 증폭할 수 있었다.

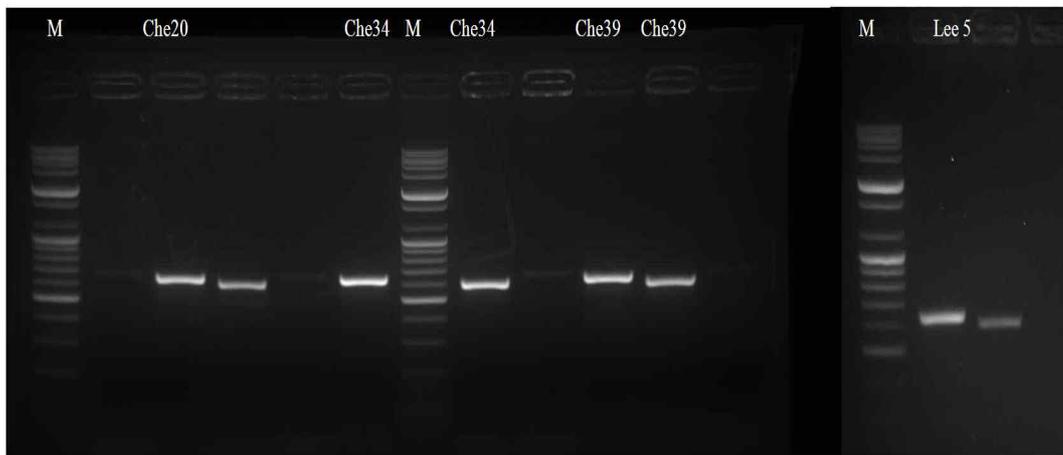


그림 27. 3종의 특이 프라이머를 이용하여 분리주의 F 유전자를 증폭한 사진

분리된 소 파라인플루엔자 5형 바이러스 F 유전자는 1656 bp에 대한 염기서열로 구성되어 있었으며, 그 근연관계를 확인한 결과 그림 28에서 보는 것과 같이 개 파라인플루엔자 바이러스 2형과 가장 유사하였다.

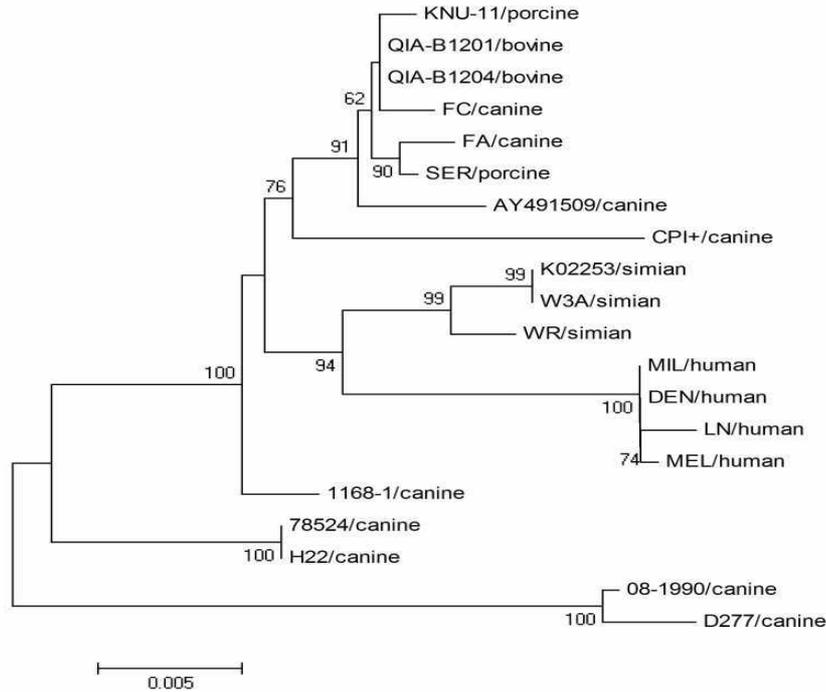


그림 28. Phylogenetic analysis based on the complete F gene nucleotide sequences of the isolates and other sequences of PIV5s obtained from GenBank database.

#### 마. 분리주에 대한 전자 현미경사진

분리주를 MDBK세포에서 증식한 후 24000rpm에서 4시간 동안 초원심하여 얻어진 시료와 감염된 세포를 negative 염색한 후 전자 현미경으로 확인한 결과 그림 29에서 보는 것과 같이 envelope가 있는 바이러스의 형태와 RNA의 긴사슬이 있는 바이러스 형태를 확인 할 수 있었다. 바이러스의 크기는 80 - 150 nm의 다양한 형태를 나타내고 있다. 갑작스럽게 사망한 소에서 소 파라인플루엔자 5형의 바이러스 2개주는 세포변성효과, RT-PCR, 혈구흡착법, 전자현미경을 이용하여 동정하였다.



그림 29. 전자현미경에 의한 소 파라인플루엔자 바이러스 입자 확인 및 다클론 항체에 의한 FA test

#### 바. 소 파라인플루엔자 5형의 마우스에서 병원성

소 파라인플루엔자 5형 분리주의 병원성을 확인하기 위하여 5주령 ICR 마우스를 3군으로 나

누고 바이러스 함량  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml을 0.03 ml를 뇌내로, 0.5 ml를 복강으로 접종하고 15일 동안 임상관찰 및 체중을 측정하였다. 그림 30에서 보는 것과 같이 복강 접종군, 뇌내 접종군 그리고 대조군은 전혀 임상증상을 나타내지 않았으며, 체중의 변화를 나타내지 않았다. 그러나 소 파라인플루엔자 5형 바이러스가 소에서 병원성을 일으키는지는 추후에 접종시험을 통해 이루어져야 할 것으로 사료된다.

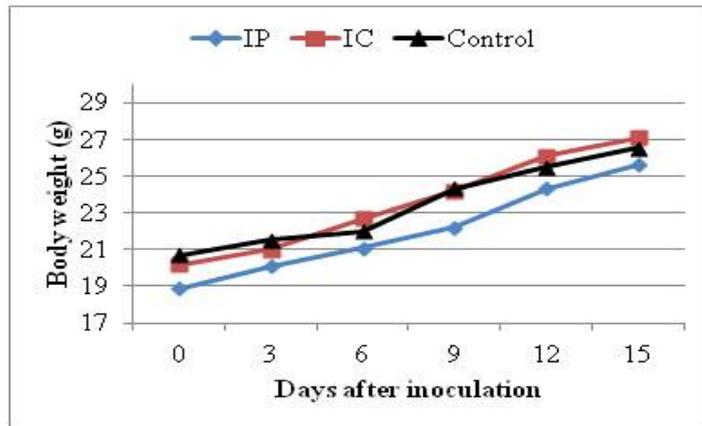


그림 30. Change of body weight in mice inoculated with the bPIV5, QIA-B1201 strain via the intraperitoneal, or intracranial route. They did not show any weight loss for 15 days.

#### 사. 소 파라인플루엔자 5형에 대한 혈청학적 조사

소 파라인플루엔자 5형의 바이러스가 경기도 포천의 농가에서 분리 및 동정되었다. 이 분리를 이용하여 전국 7농장 760두에 대하여 혈구응집억제가를 측정하였다. 그림 31에서 보는 것과 같이 6.3%에서 84.1%까지 다양하였다. 밀양의 농장의 경우 84.1%의 양성을 보였는데, 이 농장은 호흡기성 폐렴이 많으며, 유사산의 피해를 호소하는 농가였다. 따라서 파라인플루엔자 5형에 대한 혈청검사는 유사산을 일으키는 농가에 대해 검사할 필요가 있으며, 필요하다면 백신을 개발하는 것도 바람직할 것으로 예상된다.

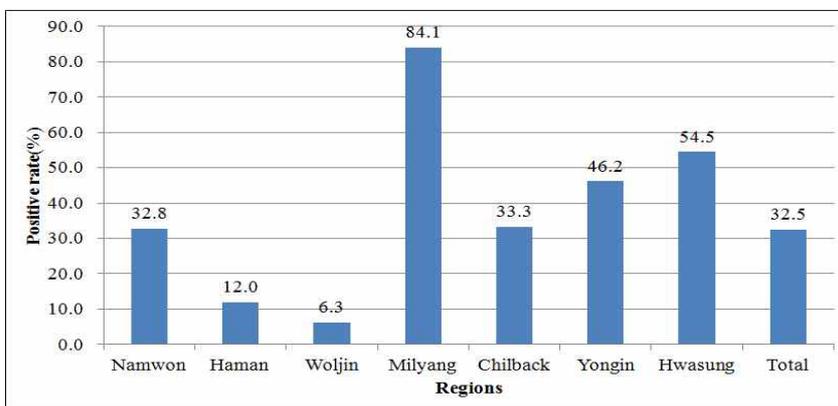


그림 31. 소 7농장에 대한 소 파라인플루엔자 5형에 대한 양성률 및 밀양의 농가 소

#### 아. 소 파라인플루엔자 5형 바이러스 진단용 RT-PCR primer 작성

소 파라인플루엔자 5형 바이러스의 진단을 위하여 F 유전자에 특이적으로 반응하도록 표 6에서 보는 것과 같이 3종의 프라이머 세트를 작성하였다. 그리고 소에서 분리된 소 파라인플루엔자 5형 바이러스에 대하여 민감도, 특이도 및 야외시료에 대하여 프라이머 세트를 적용하였다.

표 6. Oligonucleotide primers used for the detection of parainfluenza virus 5 with RT-PCR

Designation	Oligonucleotide (5'-3')	Target Gene	Size
bPIVF1	GGCAGGAGCAGGCAGCCTTG	F	213 bp(42-61)
bPIVR1	CTCACCGATCGGCTGTAGGAG	F	213 bp(255-235)
bPIVF2	CGG,AGG,AGACGCCGGTTTGC	F	402 bp(291-311)
bPIVR2	GGTACTCCCCAGTAGGATCC	F	402 bp(693-674)
bPIVF3	CCTTCTCTCCAGTGGTTGGG	F	299 bp(106p-1089)
bPIVR3	CACCGCAGCTAGATTCTGGG	F	299bp (1368-1359)

그림 32에서 보는 것과 같이 primerF1R1과 primerF2R2을 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 1000배까지 유전자가 증폭된 것을 확인할 수 있었으며, primerF3R3를 이용한 결과 10000배까지 유전자가 증폭된 것을 확인할 수 있었다. RT-PCR 조건은 변성시킨 RNA를 42℃에서 15분, 95℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 30초로하여 39cycle로 수행하였다.

이것은 민감도에서 primerF3R3가 가장 민감한 프라이머임을 확인하였다. 그림 33에서 보는 것과 같이 파라인플루엔자 5형에 대한 F2R2, F3R3의 프라이머에 대한 특이도를 확인하기 위해 아까바네, 아이노, 유행열, BVDV의 유전자를 추출하고 2종의 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 소 파라인플루엔자 5형에서만 특이적인 유전자의 증폭을 확인할 수 있었다. 이 F3R3 프라이머를 이용하여 소 파라인플루엔자 5을 이용하여 진단하는 것이 바람직하다.

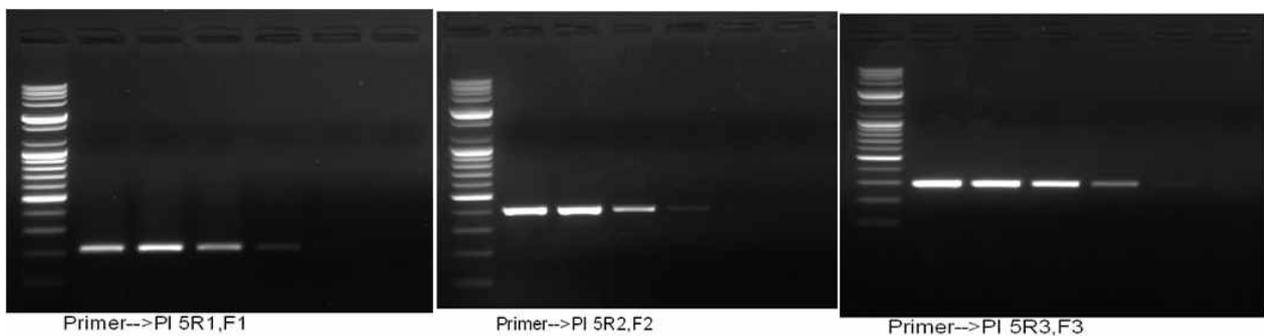


그림 32. 3종의 소 파라인플루엔자 5형 바이러스에 대한 민감도 시험

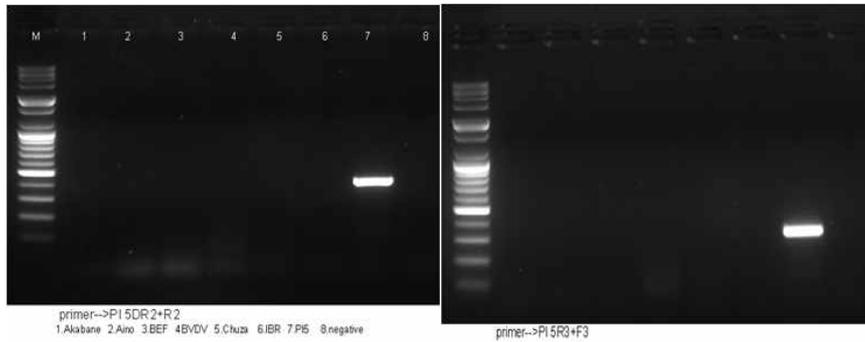


그림 33.2종의 소 파라인플루엔자 5형 바이러스에 대한 특이도 시험

## 9. 개량된 소 아까바네 및 유행열 혼합불활화백신의 개발

### 가. 재조합 소 GM-CSF의 발현

Granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)는 정상적인 혈구 조모세포의 분화와 촉진에 관련된 단백질이다. 이 GMCSF는 과립구, 대식구를 자극하고 조혈모세포로부터 적혈구, 호염기구 등의 세포 농도를 증가시킨다. 즉 이 GMCSF는 임파구를 활성화시켜 여러 종류의 사이토카인의 분비를 촉진시킨다. 따라서 백신 에주번트로 연구가 진행 중이며, 종에 따라 유전자의 차이가 커서 이 단백질은 종 특이적으로 활성을 나타낸다. 따라서 각 축종에 따라 GMCSF의 유전자를 이용하는 것이 바람직하다. 그림 34에 보는 것과 같이 각 축종에서의 GM-CSF 유전자의 상동성을 확인 한 결과 소의 GMCSF 단백질은 돼지, 말, 개와 73,69,71%의 상동성을 나타내었다. 따라서 소 백신의 에주번트로 사용할 GMCSF 유전자를 준비하여 클로닝하고 재조합 배칼로바이러스를 작성하고자 하였다. 그림 35에서 보는 것과 같이 특이적인 유전자를 합성하고 클로닝하여 세포변성효과를 나타내는 재조합바이러스를 작성하였고 이를 X-gal을 첨가한 아카로스 배지에서 클로닝 하여 파랑색을 나타내는 재조합 바이러스를 다시 클로닝 하였다.

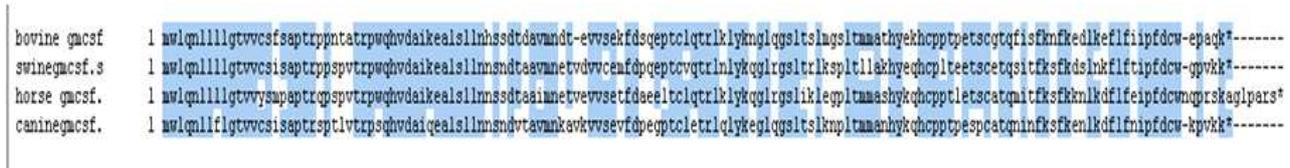


그림 34. 소, 돼지, 말 그리고 개의 GMCSF 유전자의 상동성 확인

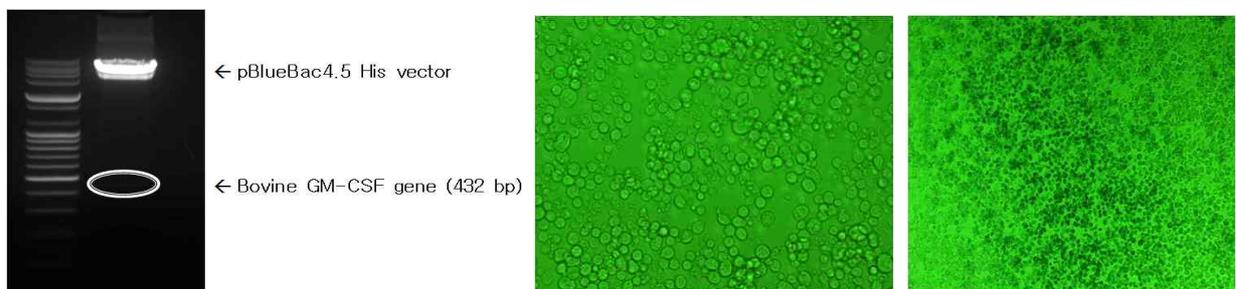


그림 35. 소 GM-CSF 재조합 배칼로바이러스의 세포변성효과 및 클로닝한 재조합 바이러스

이러한 소 GM-CSF 유전자를 발현하는 재조합 배칼로바이러스에 대하여 융합단백질이 6

histidine이 결합되어 있기 때문에 6 histidine에 대한 특이 항체를 이용하여 발현여부를 그림 36와 같이 실시하였고, 특이적인 형광을 확인할 수 있었다.

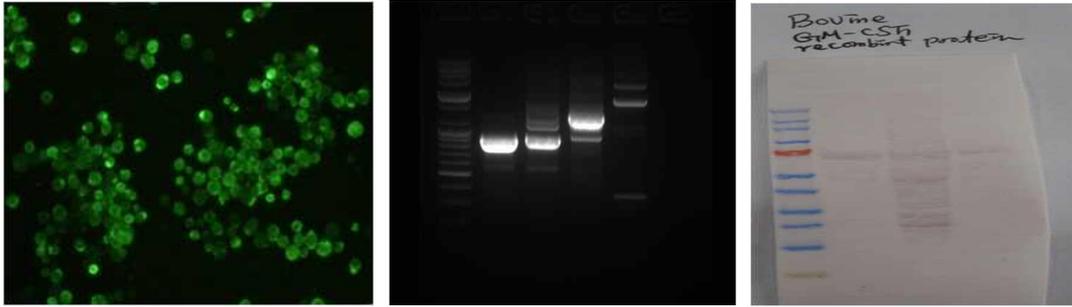


그림 36. 소 GM-CSF 재조합 베컬로바이러스의 확인 및 유전자 증폭에 의한 클로닝 및 western blotting

또한 Western blotting 기법을 이용하여 소 GMCSF 유전자를 발현하는 재조합 베컬로바이러스의 단백질이 27 kDa 임을 확인하였다. 대부분의 단백질은 세포질내 함유되어 있음을 확인하였다. 이를 통하여 확인된 재조합 베컬로바이러스는 아까바네 백신 등 소백신의 에주번트로 사용하기위하여 준비하였다.

#### 나. 아까바네 바이러스의 중요 단백질의 발현

아까바네 바이러스는 3개의 분절의 RNA를 함유하는 바이러스로 M RNA 분절은 두 개의 글리코단백질을 암호화한다. 이 글리코 단백질은 바이러스의 중화와 세포의 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 그림 37에서 보는 것과 같이 이 글리코 단백질의 앞부분을 3개의 크기로 나누어 단백질을 발현하는 전략을 바탕으로 3부분의 유전자를 증폭하고 클로닝하여 베컬로바이러스 벡터에 삽입하였다. 그리고 그림 38에서 보는 것과 같이 AKAM3의 유전자는 pFastBacHT B vector에 삽입하여 클로닝하였다. AKAM2의 유전자는 곤충세포에 transfection하여 재조합바이러스를 작성하였다. 작성된 바이러스는 agarose에서 다시 클로닝하여 증폭하였다. 이 재조합 바이러스의 함량은  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml 이상이였다,

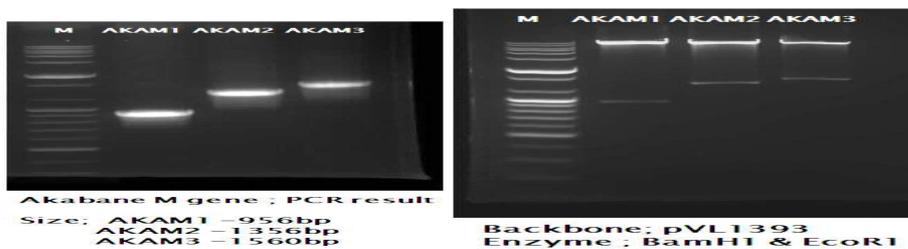


그림 37. 아까바네 바이러스 M gene의 유전자 증폭 및 클로닝

단백질의 확인은 아까바네 바이러스에 대한 특이 항체를 이용하여 확인하였다. 그림 36에서 보는 것과 같이 아까바네 바이러스 M 유전자를 함유하는 베컬로 바이러스를 작성하였고 특이적인 형광을 관찰할 수 있었다.

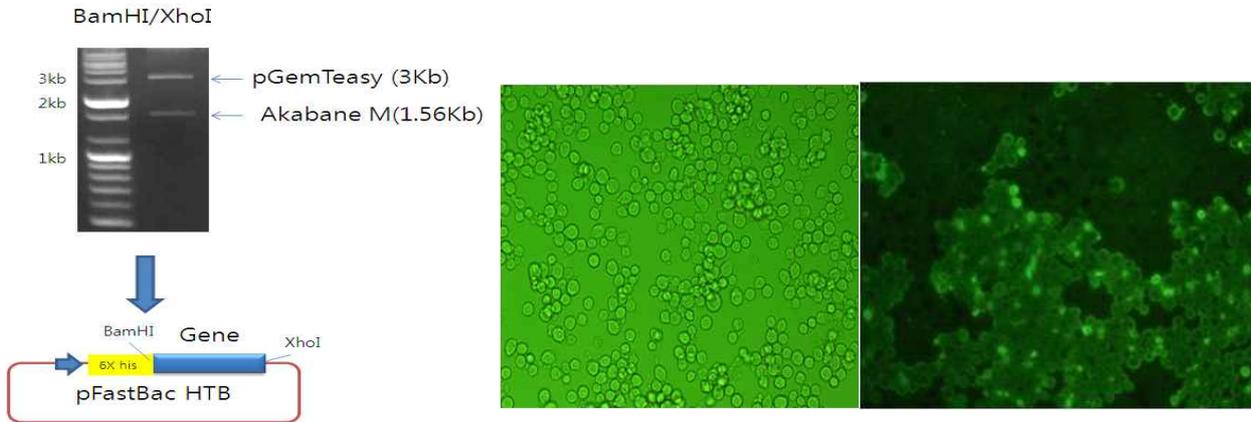


그림 38. 아까바네 바이러스 M gene의 pFastBac백터에 클로닝 및 아까바네 M 단백질 발현한 바이러스

#### 다. 유행열 바이러스의 N 단백질의 발현

소 유행열 바이러스의 N 유전자 1296 bp에 대한 유전자를 증폭하고 벡칼로바이러스 트랜스퍼 벡터인 pFastBac에 삽입하고 곤충세포인 Sf-9 세포에 transfection하여 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 그림 39에서 보는 것과 같이 특이적인 형광을 나타내었고, Western blotting 에서도 약 54 kDa의 단백질을 확인할 수 있었다. 이 단백질을 정제하여 항체를 측정하기 위한 진단법을 구축하는데 유용하리라 여겨진다. 이 단백질은 중화력이 없기 때문에 백신에 추가하여도 예방하는데 큰 도움이 되지 않아 추후에 진단용으로 사용할 필요가 있다.

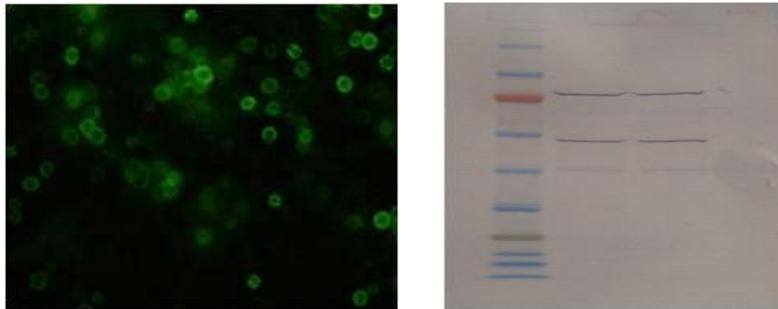


그림 39. 유행열 바이러스 N 유전자를 함유하는 벡칼로바이러스 및 단백질 확인

#### 라. 아까바네 및 유행열 바이러스의 준비

2005년도에 소 혈액에서 분리한 아까바네바이러스(KV0505 strain)를 확보하였으며, 바이러스의 특성을 RT-PCR로 확인한 결과 아까바네바이러스 유전자 cluster I 으로 확인되었으며, Vero 세포에서 증식하여 바이러스함량을 확인한 결과  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 나타났다. 아까바네 불활화백신을 생산하기 위해서는  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상 나타내야하기 때문에 BHK21 세포에서 6대 계대하여 바이러스의 증식을 확인한 결과  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상을 나타내었다. 아까바네 바이러스와 마찬가지로 유행열 바이러스(DS11 strain)의 함량을 확인한 결과  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml로 나타나 6대 계대하여  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상으로 증식하였다. 따라서 아까바네와 유행열 바이러스는 BHK21 세포에서 6대 이상 계대하여 증식하는 것이 바람직하였다. 국내에서는 소 유사산을 일으키는 여러 원인체 중에서 아까바네와 유행열이 2010년에 100건 이상

발생하였기 때문에 아까바네병 만을 예방하는 백신보다는 아까바네와 유행열에 대하여 동시 예방하는 백신이 필요하다. 현재 사용중인 백신도 아까바네 생백신, 유행열 생백신으로 각각 생산되고 있어 농가에서는 1회에 두 종류의 질병을 예방하는 것이 바람직하다. 따라서 아까바네 바이러스와 유행열 바이러스를 준비하고 불활화제로 BEI를 이용하여 불활화하였다. 에쥬번트로는 재조합 아까바네 베쿨로바이러스를 사용하고자 하였으나 발현량이 높지 않아 백신의 생산비용을 상승하는 문제를 일으킬 수 있다. 따라서 Seppic사에서 제공하는 상용 에쥬번트 IMS1313VG를 이용하여 아까바네 유행열 불활화 시험백신을 제작하였다.

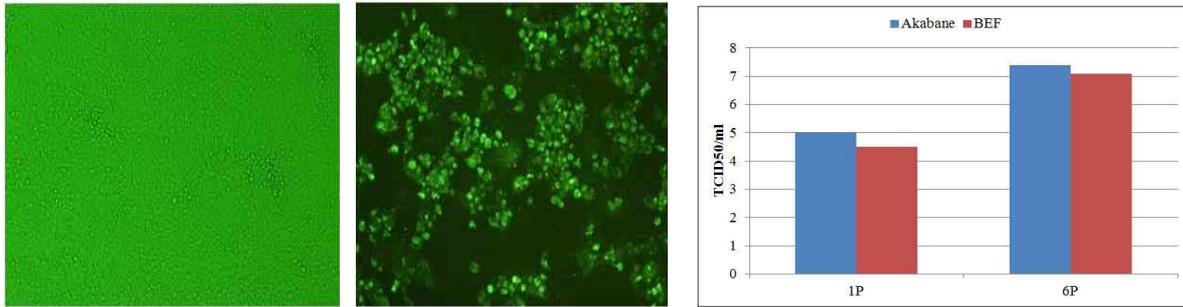


그림 40. 아까바네 바이러스 (KV0505 strain)의 CPE와 BHK21 cell에서 증식능

아까바네 및 유행열 불활화 혼합 시험백신을 마우스와 기니픽에 근육접종 하였다. 이때 현재 사용 중인 아까바네 생백신, 유행열 생백신, 아까바네, 유행열 및 에쥬번트로 FlaB (비브리오 flagelin을 대장균에서 발현시킨 단백질을 200 ug/ml를 추가) 추가하고 Seppic사의 IMS1313VG를 30%로 하여 시험백신을 제작하였다. 마우스 5두씩 5개군으로 준비하고 0.2 ml 씩 근육 접종하고 2주후에 2차 접종하고 2주후에 채혈하였다. 기니픽은 4두씩 5개군으로 준비하고 0.5 ml 씩 근육 접종하고, 2주후에 2차 접종하고, 2주후에 채혈하였다. 채혈한 마우스 및 기니픽에 대하여 아까바네 바이러스 및 유행열 바이러스에 대한 중화시험을 실시하여 항체가를 측정하였다. 그림 41에 보는 것과 같이 아까바네 생백신을 접종한 마우스에서 아까바네 바이러스의 항체가는 log<sub>2</sub> 6.7, 불활화백신을 접종한 마우스는 log<sub>2</sub> 7.8로 생백신 접종 마우스 보다 높게 나타났다. 그러나 FlaB를 추가한 백신은 log<sub>2</sub> 3.5를 나타내어 FlaB가 오히려 면역원성을 낮게하였다. 아까바네 생백신을 접종한 기니픽에서 log 8.6으로 나타났으며, 아까바네 유행열 혼합불활화백신을 접종한 기니픽에서는 log 10.2를 나타내었고, FlaB를 추가한 백신을 접종한 기니픽의 항체가도 마우스에서처럼 log<sub>2</sub> 7.0의 항체가를 나타내었다. 그러나 대조군이나 유행열 백신을 접종한 마우스 및 기니픽에서 아까바네 바이러스의 항체는 검출되지 않았다. 유행열 생백신을 접종한 마우스의 항체가는 log<sub>2</sub> 4를 나타냈으며, 아까바네 유행열 불활화 백신을 접종한 마우스는 log<sub>2</sub> 5.3을 FlaB를 첨가하여 접종한 마우스는 log<sub>2</sub> 5를 나타내었다. 유행열 생백신을 접종한 기니픽은 log<sub>2</sub> 9.75를 나타내었고, 아까바네 유행열 불활화 혼합백신을 접종한 기니픽은 log<sub>2</sub> 11을 나타내었고, FlaB를 첨가한 백신을 접종한 기니픽은 log<sub>2</sub> 10.5를 나타내어 마우스보다는 기니픽에서 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 항체가 잘 형성되었다.

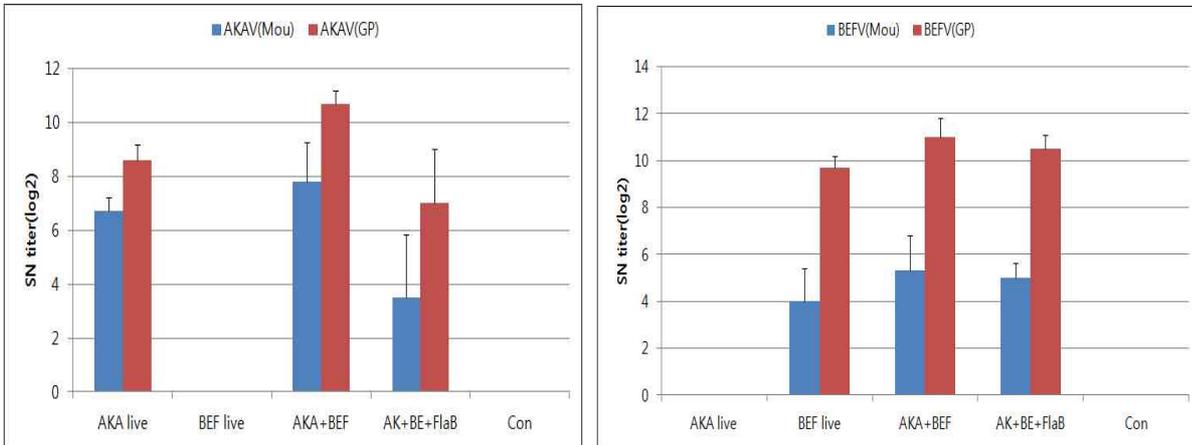


그림 41. 마우스 및 기니픽에 아까바네 및 유행열 불활화백신 접종 후 항체 반응

아까바네 및 유행열 불활화백신을 소와 모돈에 3 ml를 접종한 후 2주에 다시 재접종하고 2주 후에 채혈하여 항체를 측정하였다. 그림 42에서 보는 것과 같이 아까바네 및 유행열 불활화백신을 접종한 소에서 아까바네의 항체는 1차 접종 2주 후에는 log<sub>2</sub> 5.5로 나타났으며, 2차 접종 2주 후에는 log<sub>2</sub> 7.5를 나타내었다. 돼지에서 아까바네의 항체는 1차 접종 2주 후에 log<sub>2</sub> 4를 나타냈으며, 2차 접종 2주 후에 log<sub>2</sub> 6으로 상승하였다. 아까바네 및 유행열 불활화백신을 접종한 소에서 유행열 바이러스에 대한 항체는 1차 접종 2주 후에 log<sub>2</sub> 6을 나타내었고, 2차 접종 2주 후에는 log<sub>2</sub> 8.5로 상승하였다. 아까바네 및 유행열 불활화백신을 접종한 돼지에서는 1차 접종 2주 후에는 log<sub>2</sub> 4.6이었으며, 2차접종 2주 후에는 log<sub>2</sub> 7.3으로 상승하였다. 전체적으로 기니픽에서 아까바네 및 유행열 항체가 가장 높게 상승하였는데 이것은 체중에 비하여 백신의 접종량이 많았기 때문으로 여겨진다. 마우스와 기니픽에서는 유행열의 항체가 아까바네 항체보다 높게 나타났다. 그러나, 소와 돼지에서는 아까바네의 항체가 유행열 항체보다 높게 상승하였다. 아까바네와 유행열의 목적동물이 소이기 때문에 아까바네 유행열 불활화백신을 2차 접종한 소에서 log<sub>2</sub> 7.0 이상을 나타내어 우수한 면역원성을 유도하였다.

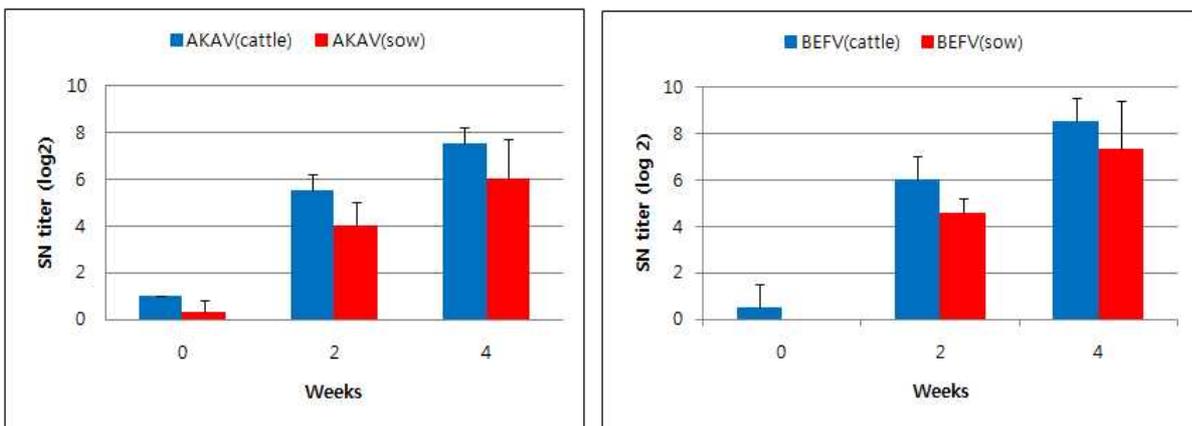


그림 42. 마우스 및 기니픽에 아까바네 및 유행열 불활화백신 접종 후 항체 반응

## 10. 소의 소모성 질환의 치료제로 Ribavirin

### 가. Ribavirin에 대한 억제 실험 방법 및 세포독성 평가

아이노바이러스, 아까바네 바이러스, 소 유행열 바이러스, 소 바이러스성 설사병바이러스, 추잔 바이러스, 전염성 소 비강폐렴바이러스와 파라인플루엔자바이러스는 소에서 소모성질환을 일으키고 소 산업에서 심한 경제적 손상을 일으킨다. 이러한 바이러스 감염에 대한 예방을 제공하기 위하여 백신이 좋은 성과를 나타냄에도 불구하고 바이러스 감염의 통제하기 위한 항바이러스제제의 사용이 요구되고 있다. Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide)은 광범위한 핵산유도체로 항바이러스제제로 이용되고 있으며, 사람에서 다양한 형태의 치료제로 사용되고 있다. 여러 종의 바이러스에 대해 항바이러스 역할이 주목받고 있다. Ribavirin은 사람의 바이러스 증식억제제로 알려져 있음에도 다른 동물의 바이러스에 대하여 증식억제제로 잘 알려져 있지 않다. 따라서 소의 소모성질환을 일으키는 다양한 바이러스에 대한 Ribavirin의 바이러스 억제능을 확인하고자 실험실내 실험을 실시하였다. 이 시험에 사용된 아이노바이러스, 아까바네 바이러스 소 유행열 바이러스, 추잔 바이러스, 비기관염바이러스들은 vero 세포에서 시험하였으며, 소 바이러스설사병바이러스와 파라인플루엔자는 MDBK 세포를 사용하였다. 96공 플레이트에 각 세포를 준비하고 배양 배지내에 ribavirin의 농도를 0, 25, 50, 100, 200, 400 and 800 uM로 조정하였다. ribavirin이 들어 있는 배지에 각각의 바이러스를 혼합하고 37에서 1시간 동안 배양한 후 세포에 감염시켰다. 그 플레이트는 4일 동안 CO2배양기에 배양하였고 매일 세포변성효과를 확인하였다. 각각의 바이러스는 세포변성효과 따라 바이러스함량을 확인하였다.

### 나. Ribavirin에 대한 억제 실험 효과 시험

그림 42에서 보는 것과 같이 모든 종류의 바이러스는 ribavirin의 농도에 따라 바이러스 증식억제능을 확인할 수 있었다. Ribavirin의 800 uM의 농도에서 아까바네와 파라인플루엔자는 전혀 증식하지 못하였다. Ribavirin 800 uM의 농도에서 아이노, 아까바네, 유행열, 추잔, BVDV, 비기관염, 파라인플루엔자 바이러스의 바이러스 함량은  $10^{4.0}$ , 0,  $10^{4.4}$ ,  $10^{2.5}$ ,  $10^{4.5}$ ,  $10^{2.5}$ , and 0 TCID<sub>50</sub>/0.1ml였다. 그리고 Vero 세포는 ribavirin에 독성을 나타내지 않았지만, MDBK 세포는 낮은 농도에서도 독성을 나타내었다. 결론적으로 7 종류의 소 바이러스를 이용하여 ribavirin의 바이러스 억제능을 확인한 결과 대부분의 바이러스에서 증식억제능을 확인할 수 있었다. 따라서 ribavirin이 소모성 질병을 일으키는 소 바이러스 질병의 치료적 목적에 사용가능하리라 사료된다.



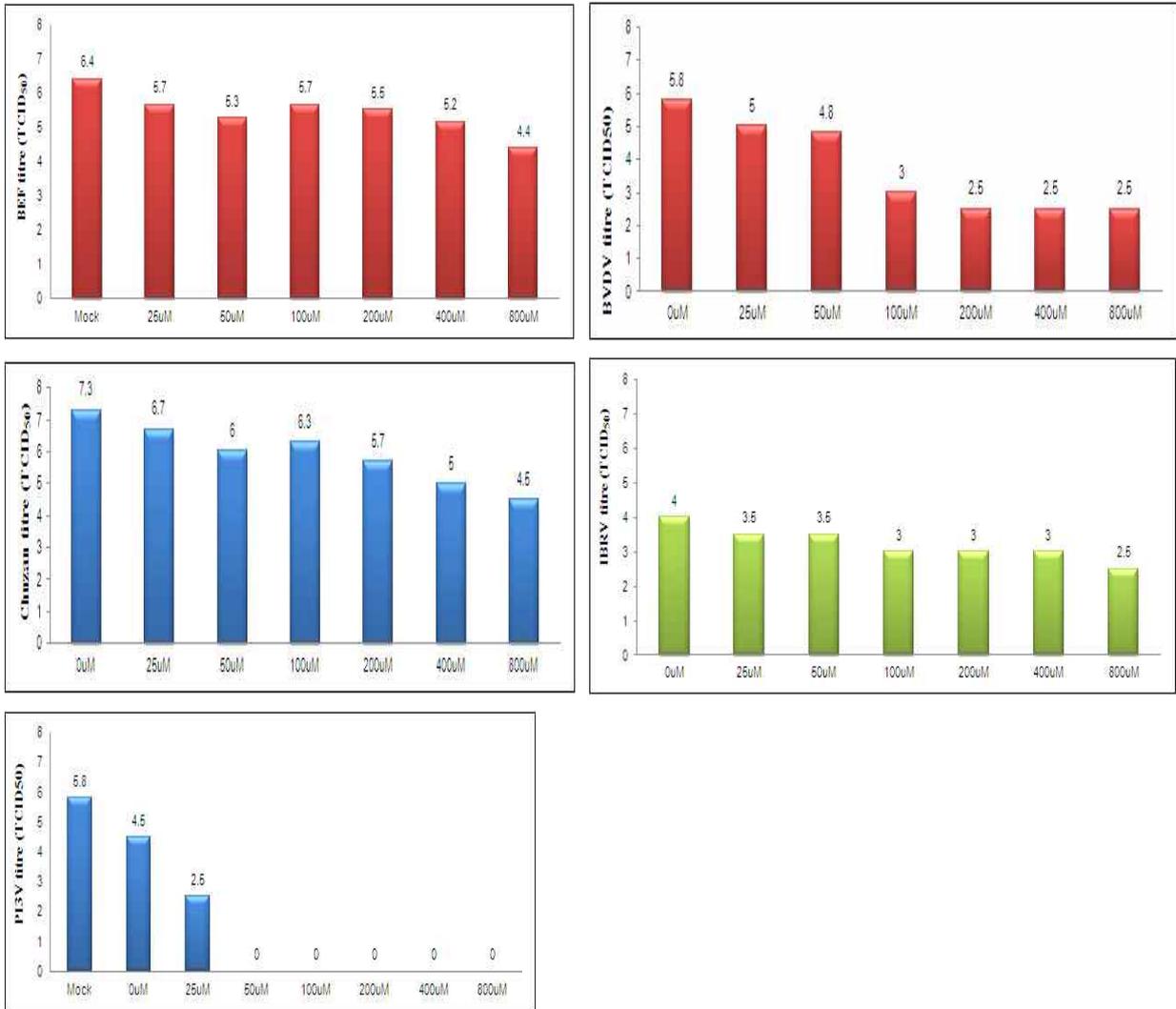


그림 42. 소 소모성 질환을 일으키는 바이러스에 대한 ribavirin의 증식억제능

## 제2절. 세부연구수행 결과

### 연구 주요 결과요약

#### 1. 년도별 소의 소모성 질병 진단 추이

BVDV의 경우 2009년 305건, 2010년 307건, 2011년 289건, 2012년 151건, 2013년 245건으로 확인되었으며, 2009년, 2010년 300건 이상 발생되어 국내 소에서 BVDV가 만연되고 있어 방역대책이 필요하며, 소 로타 바이러스 감염증이 지속적으로 증가하고 있었다.

#### 2. BVDV 불활화 백신에서 항원진단법 확립

BVDV 불활화 백신을 sodium citrate로 처리하면 BVDV 항원을 추출할 수 있으며, 그 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석하는 기법은 백신을 동물에 접종하지 않고 항원을 확인하는 방법으로 동물약품을 평가하는데 유용한 방법을 확립한 것이다.

#### 3. 국내 야외 BVDV의 분리

지속 감염우에서 7주의 BVDV를 분리하였고, 분리주의 E gene 분석한 결과 genotype 1으로 확인하였으며, MDBK 세포에서 세포변성효과를 나타내었으며, 그중 5주를 KVCC에 기탁하였다.

#### 4. BVDV E2 재조합 배칼로 바이러스의 작성

BVDV E2의 TCDM 부분을 클로닝하여 E2 유전자를 발현하는 재조합 배칼로 바이러스를 작성하였다. 이 재조합 바이러스는 BVDV type 1, 2의 항체에 특이적으로 반응하여, Mab 작성시 항원으로 사용하였다. BVDV E2 재조합 배칼로바이러스는 다량의 재조합 단백질을 생산할 수 있었다.

#### 5. BVDV의 특이 항체 생산

BVDV 특이 항체생산을 위하여 BVDV바이러스를 증식 및 농축하였고, 농축된 항원에 E2 재조합 단백질을 추가로 마우스에 면역하여 BVDV에 대한 총 18종을 생산하였다. 18종의 BVDV 특이항체 중에서 BVDV type 1에 특이적인 형광을 나타내었으며, 13종의 하이브리도마는 E2에 반응하였다. 그러나 BVDV Erns에 대해서는 반응하지 않았다. BVDV 특이 항체를 생산하는 하이브리도마에서 항체생산 유전자를 클로닝 하고 VI 및 VH 유전자를 확인하였다.

#### 6. 국내 사용 중인 아까바네 생백신주의 분자생물학적 평가

국내에서 사용 중인 5종의 아까바네 생백신에 대하여 생물학적 유전학적 평가를 실시한 결과 5개 회사 모두 동일한 유전자로 확인 되었으며, 마우스에서 안전하였다.

#### 7. 국내 남부지역에서 아까바네 및 유행열 바이러스에 대한 항체가 조사

2010년에 남원지역을 중심으로 아까바네 및 유행열 바이러스가 유행하여 3년이 지난

2013년에 울진 영주 밀양을 포함한 지역에서 얻은 1743두에 대해 항체가 검사를 수행한 결과 아까바네는 59.8%의 양성률을 유행열은 1.2%의 양성률을 나타내 백신접종이 필요한 것으로 확인되었다.

#### 8. 국내 소에서 신종 소 파라인플루엔자 5형 감염증 확인

갑작스럽게 폐사한 소 뇌조직 532개에서 소 파라인플루엔자 5형 바이러스 4주를 분리하였고 그 특성을 확인한 결과 기니픽의 혈구를 흡착하였고, MDBK 세포에서 세포변성효과를 나타내었으며, 전자현미경에서 파라믹소 바이러스의 형태를 확인하였으며, 유전자 검사 결과 개 파라인플루엔자바이러스와 유사한 특징을 확인하였다. 이번에 분리한 파라인플루엔자 5형 바이러스는 소에서는 국내에서 최초로 확인되었다. 소 파라인플루엔자 5형에 대한 혈청학적 조사를 실시하였는데 전국 7농장 750두에 대하여 평균 32.5%의 양성을 나타내었다.

따라서 소 파라인플루엔자 5형 바이러스에 대하여 진단용 RT-PCR 프라이머를 작성하였으며, 특이도, 민감도, 야외시료에 적용하여 가장 적합한 프라이머를 선발하였다.

#### 9. 개량된 아까바네 및 유행열 혼합 불활화 백신의 개발

아까바네 백신의 개량을 위하여 백신의 에주번트로 사용할 소 GMCSF유전자를 확인하고 클로닝하여 유전자 재조합 베쿨로바이러스를 작성하였으며, 27kDa의 단백질을 확인하였다. 아까바네 바이러스의 중화와 바이러스 부착에 중요한 M 분질의 글리코 단백질을 발현하기 위하여 3개의 부분으로 나누어 유전자를 증폭하고 클로닝하여 AKAM2에 대한 유전자 재조합베쿨로바이러스를 작성하였다. 그러나 재조합 베쿨로바이러스의 단백질 함량이 낮게 확인 되었다. 이뿐 만 아니라 유행열 N gene에 대하여 유전자 재조합 베쿨로바이러스를 제작하였고 특이항체를 검사하는 항원으로 사용이 가능하다. 아까바네 바이러스 (KV0505 strain)와 유행열 바이러스 (DS11 strain)을 BHK21세포에서 증식하여 혼합 불활화백신을 작성하고 마우스, 기니픽, 모돈, 소에서 안전성 및 면역원성을 조사한 결과 모두 안전하였으며, 마우스와 기니픽에서는 유행열바이러스에대한 항체가 높게 형성되었고, 소와 돼지에서는 아까바네에대한 항체가 높게 형성되었다. 이 혼합 불활화백신은 현재 사용중인 생백신보다 높은 항체가를 유도하였다.

#### 10 소모성 질환을 일으키는 소 바이러스에 대한 ribavirin의 바이러스 억제능 조사

7종의 소 소모성 바이러스에 대하여 ribavirin을 배지에 함유하고 바이러스의 증식 억제능을 조사한 결과 7종 모두의 바이러스에 대하여 800 uM의 농도에서 바이러스 증식능이 억제되었으며, 소모성질환을 일으키는 소의 바이러스질환에 대하여 ribavirin이 치료적 목적으로 사용이 가능할 것으로 예상된다.

## <제1협동 2과제>

# 돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장 적용

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장 적용에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 9월 일

협동연구기관명 : 농림축산검역본부

연 구 원 : 이 경 기

연 구 원 : 김 성 희

연 구 원 : 엄 재 구

연 구 원 : 김 연 희

연 구 원 : 최 정 원

연 구 원 : 변 재 원

연 구 원 : 김 하 영

연 구 원 : 이 명 현

연 구 원 : 최 영 균

연 구 원 : 김 선 희

위탁연구기관명 : 임프로 AH

위탁연구책임자 : 전 용 수

# 요 약 문

## I. 제 목

- 제1협동과제(제2과제): 돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장 적용

## II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 목적: 돼지 소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 면역제제 개발 및 면역증강 사양관리프로그램 개발 및 보급
- 필요성: 돼지 소모성질환의 피해 감소 및 양돈산업의 생산성 향상을 위해서는 현장에서 가장 문제되고 있는 돼지 주요 소모성질환의 유발 병원체를 예방 및 치료할수 있는 고면역 항체제제를 개발, 보급하고 돼지 사양관리 프로그램에 적용이 필요함

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 돼지소모성질환 농장단위 질병발생 모니터링과정을 통하여 분리된 병원체에 대한 특성조사
- 질병발생 위험지도 작성을 통한 기본 방제대책 수립
- 돼지소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 초유대용제 개발
- 자돈의 돼지 소모성질환 병원체 제어용 경구 면역제제 개발 및 시제품 생산
- 모돈 및 자돈 성장단계별 질병발생 제어에 적합한 맞춤형 면역증강 프로그램 개발
- 양돈장의 질병발생 유형별 맞춤형 국내 양돈장 적용 프로그램 개발 및 보급

## IV. 연구개발결과

- 국내 양돈산업에서 문제되고 있는 주요 돼지소모성질환을 모니터링하기 위하여 시험양돈장을 지정하고 사육구간별로 소모성질환 12종을 검사하였으며, 검색된 병원체에 대한 특성을 조사하였다. 또한 각 농장별, 사육구간별, 질병별로 질병발생 위험지도를 작성하여 제어해야할 병원체 및 사육구간을 확인하였다. 돼지소모성질환을 유발하는 핵심 병원체를 선별하고, 이를 이용하여 가장 효율적인 면역제제 개발용 항원을 제작하였다. 10종의 바이러스 및 세균을 이용하여 산란계에서 고도면역 난황항체를 제작하였고, 젖소에서 고도면역 초유항체를 제작하였다. 제작된 고역가 항체제제에 생균제, 당 및 비타민을 첨가하여 최종적으로 면역제제 시제품을 개발하였다. 어린 연령의 돼지에 설사를 유발하여 폐사율 및 성장지연을 유발하는 PED 바이러스, 로타바이러스 및 대장균 등이 감염된 농장을 대상으로 면역제제의 효능을 조사한 결과, 자돈의 폐사율 감소 및 설사 증상 완화 효과를 확인하였다. 초유항체제제 제조방법에 대한 특허 등록을 완료하였고, 돼지 연령별 면역제제 시제품을 제작하고, 사육구간별 2종의 제품을 산업화함으로서 농가에서 자돈 설사증 제어용 항체제제를 손쉽게 적용할 수 있도록 하였다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구를 통하여 “돼지소모성질병의 치료 및 예방을 위한 젖소 초유항체 조성물”에 대한 특허 등록을 완료하였으며, 난황항체 및 초유항체를 포함하는 면역제제 2종을 상품화하였다. 돼지췌코바이러스의 주요 면역항원을 고효율로 발현하기 위한 발현 시스템을 개

발하고 이를 특허 출원하였다.(돼지썩코바이러스 2형(PCV2)의 ORF2 재조합 유전자, 전달 벡터, 재조합 배클로바이러스, 돼지썩코바이러스 2형(PCV2) 재조합 캡시드 단백질 및 그의 제조방법) 농장별로 질병 조사에서 검색 및 분리된 세균 11주를 유전자원으로 등록하였으며, 돼지 주요 소모성질환의 특성 및 근절 방법을 관련 업종 종사자들에게 교육, 지도하였으며, 전문일간지 및 잡지에 홍보하였다. 향후 본 연구에서 확보된 면역제제의 제작방법, 면역제제의 효능 및 주요 병원체 단백질의 고효율 발현에 대한 학회 발표 및 논문을 진행할 예정이며, 사육구간별로 더욱 세분화된 면역제제를 상품화할 계획이다.

## SUMMARY

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine rotavirus (RotaV) and *Escherichia coli* (*E.coli*) mainly cause acute or contagious enteritis in piglets both before and after weaning. RotaV and *E.coli* infection are common in many pig farms, and PED have explosively been occurred in many regions in Korea recently. In the case of incomplete or ineffective sow vaccination, immune-materials such as egg yolk immunoglobulin (IgY) and hyperimmune colostrums could be used to piglets inevitably. we investigate on the prophylactic and therapeutic efficacy of hyperimmune IgY and colostrums-derived antibodies (immune-complex) against diarrheal diseases of piglet such as PED, RotaV and *E.coli*. In field efficacy of immune-complex, all piglets of the control group developed severe watery diarrhea, atrophy, weight loss and death. On the other hand, diarrhea was temporary and was not accompanied by weight loss in treatment group. While survival rate of treatment group of immune-complex feeding at 1 day of age was 94.1% (542/576) until 7 days old, survival rate of control group was 17.5% (86/492). In experiment of immune-complex feeding at 7 day of age, survival rate of treatment group was 88.8% (876/986) and that of control group was 36.5% (312/855) until weaning. The administration of immune-complex protected piglets from PEDV, RotaV and *E. coli* infection, and reduced their mortality. In conclusion, the present data demonstrated that the antibodies from IgY and cow colostrums were effective to enteric viral and bacterial infection of piglet.

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	95
제 2 장	국내외 기술개발 현황	97
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	98
제1절	돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장적용	
1.	돼지소모성질환 농장단위 질병발생모니터링 및 분리 병원체의 특성 조사	
2.	질병발생 위험지도 작성을 통한 기본 방제대책 수립	
3.	돼지소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 먹역제제 개발	
4.	자돈의 돼지 소모성질환 병원체 제어용 면역제제 시제품 개발	
5.	양돈장 질병발생 유형별 맞춤형 적용 프로그램 개발 및 보급	

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

국내 양돈장은 각종 소모성질환의 발생으로 인해 막대한 생산 손실을 입고 있으며, 농촌경제연구원(2006)의 발표에 따르면 질병 발생에 의한 양돈농가 피해규모는 폐사율을 18.5%로 가정했을 때 6,953억, 폐사율을 32.5%로 가정했을 때 1조 1,840억에 달하는 것으로 추정된다. 이러한 양돈분야 질병 발생 피해의 대부분은 만성적인 돼지 소모성질환에 의하여 발생하고 있어 돼지 소모성질환 제어를 통한 양돈 생산성 향상 및 국제 경쟁력 확보가 시급한 실정이다. 돼지의 소모성질환은 돼지에게 가해지는 각종 스트레스가 돼지의 면역(항병력)을 약화시키고, 양돈 현장에서 만성적으로 문제되는 질병(또는 증후군)중에서 주로 돼지유행성설사병(PED), 돼지생식기호흡기증후군(PRRS), 돼지썩코바이러스병(PCVD), 돼지호흡기복합병(PRDC)이 복합되어 발생되고, 피해가 악화되고 있다. 따라서 모돈군 및 자돈군의 성장단계별로 이들 핵심 질병에 대한 면역을 제공하는 동시에 돼지의 선천적 항병력을 증강시켜 각종 환경 스트레스를 극복해 낼 수 있도록 해주는 돼지의 종류(성장단계)별 맞춤형 면역복합제제의 개발과 현장적용을 위한 산업화가 필요하다. 돼지 소모성질환을 막기 위해서는 우선적으로 양돈장에 주요 병원체의 유입을 차단하여야 하고, 돼지의 사육 환경 및 위생 관리를 철저히 해야 한다. 또한 돈군의 면역성을 증강시키기 위해 백신 접종이나 면역제제 투여도 하나의 관리 방법이다. 이외 질병에 감염된 돼지는 항생제 투여나 대증요법을 통해 직접적으로 치료를 행할 수도 있다. 면역제제는 과거에 면역혈청을 제작하여 사람이나 동물에 사용되어온 일종의 치료 및 예방용 제제로서 최근 국내에서는 산란기에 사람이나 동물의 병원체를 고도면역시켜 생산된 난황내 존재하는 IgY 항체를 이용하여 주요 질병을 치료 및 예방하는 방법이 많이 개발되고 사용되고 있다. IgY 제제는 기존의 면역혈청제제보다 생산량이나 부작용이 적은 장점이 있고, 면역된 산란계로부터 손쉽게 연속적으로 IgY 항체를 얻을 수 있다는 장점이 있지만 별도의 산란계 사육 시설이 필요하고 지속적인 항원 접종 및 관리가 필요한 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하고 고역가의 항체제제를 생산하기 위해 적용될 수 있는 방법이 젖소를 대상으로 병원체를 고도면역시켜 생산된 초유를 이용한 면역제제를 제조하는 것이 하나의 방법이다. 젖소가 분만후 몇일간 분비하는 초유(colostrum)는 단백질, 당, 지질, 비타민, 미네랄 등의 영양소를 함유하고 있을 뿐만 아니라 다양한 성장인자(growth factor)와 항미생물인자(anti-microbial factor) 등의 생체 활성성분을 가지고 있다. 여러 가지 성장인자는 신생자우의 성장과 발달을 촉진시킨다. 항미생물인자로는 면역글로불린, 락토페린(lactoferrin) 및 라이소자임(lysozyme) 및 락토페록시다제(lactoperoxidase) 등이 있으며, 특히 어미로부터 섭취된 초유에는 생후 몇주간 병원체로부터 방어와 관련된 면역글로불린의 역할이 매우 중요하며, IgG, IgM, IgA의 농도가 정상적인 우유에 비해 약 100배의 농도가 포함되어 있다. 송아지에서 다발하는 질병, 특히 소화기 질병에 대한 치료를 목적으로 젖소에 여러 가지 병원체를 고도면역시켜 제작한 면역제제가 개발되고 일부 상용화되어 사용되고 있다. 그러나 국내에는 이러한 항체 역가가 높고, 치료 및 예방효과가 우수한 초유를 이용한 돼지용 초유면역제제는 개발되어 있지 않다. 돼지는 일반적으로 소보다 사육 밀도가 높고, 질병에 더욱 취약하기 때문에 많은 예방 백신이나 치료 제제를 사용하게 된다. 특히 모돈군의 질병에 대한 면역수준이 불균형하고, 초유 및 유즙이 불량하거나 정상적인 포유 기능이 저하될 경우 그 자돈은 이러한 질병에 감염될 가능성이 높다. 포유자돈 구간에서 적절한 면역 결핍에 의한 질병 감염은 자돈 폐사와 같은 직접적인 피해뿐만아니

라 성장이 정체되고 위축이 발생되면 농장의 생산성 저하를 초래하여 더 큰 경제적인 피해를 초래한다. 이러한 자돈구간에는 소화기질병, 호흡기질병 및 전신성 질병을 유발하는 다양한 바이러스 및 세균이 존재하며, 질병 발생도 단일 병원체에 의한 감염보다는 여러 가지 병원체가 복합적으로 감염되어 증상을 악화시킨다. 병원체에 대한 확고한 모돈의 면역물질을 자돈에 이행되기만 하면 질병에 대한 문제점은 해결될 수 있으나, 농장별, 돈군별로 이러한 균형적인 모돈 면역을 유지하기는 쉽지가 않다. 따라서 이러한 부족한 자돈의 질병에 대한 면역능을 증강시키기 위해서는 앞에서 설명한 여러 가지 면역제제가 필요하며, 특히 질병에 내과할수 있는 충분한 면역물질을 투여받는 것이 중요하다. 따라서 본 과제에서는 난황항체 및 국내에서는 적용되고 있지 않는 젖소의 면역초유를 이용하여 부족한 돼지의 면역능을 강화하기 위한 제제의 개발이 주요한 목적이며, 이러한 제제의 적용을 통해 자돈에 상습적으로 감염되는 여러 가지 질병을 치료 및 예방함으로써 소모성질병으로부터의 피해를 최소화하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

돼지 소모성질병을 제어하기 위해서는 여러 가지 병원체에 대한 확고한 면역 부여가 필수적이며, 이를 위해서는 해당 병원체에 대한 효과적인 백신 접종으로 가능하다. 돼지 소모성질병을 유발하는 병원체는 여러 가지가 존재하며, 이러한 병원체에 대한 백신도 다양하지만, 병원체 혹은 백신에 따라 그 효능 또한 다를 수 있다. 여러 종류의 소모성질병 유발 병원체에 대한 백신 접종은 쉬운 작업이 아니며, 백신접종을 실시하지 않았거나 효과가 적은 백신 접종을 하였을 경우 해당 병원체가 농장에 유입되면 질병이 발생될 수 밖에 없으며, 이러한 경우 보조적으로 면역체제의 적용이 필요하다. 국내에서는 항체체제를 이용한 질병 예방 및 치료를 목적으로 하는 제품이 상품화되어 일반 양돈장에 적용되고 있으며, 난황항체가 대부분을 차지하고 있다. 소의 경우에는 국내에 난황항체를 이용한 제품도 많고, 초유항체체제 개발 및 특허 사항이 있지만, 돼지 질병에 대한 젖소 초유항체체제 개발 및 적용은 전무하다. 외국에서는 난황항체 및 초유항체는 사람뿐만아니라 동물에 적용 사례가 많으며, 젖소 초유항체를 이용한 돼지의 소화기 질병 제어 관련 연구 사례가 다수 있다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제1절 돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장 적용

##### 1. 돼지소모성질환 농장단위 질병발생 모니터링 및 분리 병원체의 특성 조사

###### 가. 돼지 소모성질환 농장단위 질병모니터링 및 질병발생 동향 파악

###### 1) 돼지 소모성질환이 문제되는 시험 양돈장 지정

- 1년차에 지역별로 소모성질환이 문제되는 20개 양돈장에 대하여 임상관찰, 혈청검사 및 부검조직·분변에 대한 항원검사를 실시하고, 소화기성 질환, 호흡기성 질환 및 복합 질환 감염 패턴에 따라 최종 6개소의 시험양돈장 선정하였다.

표 1. 최종 선정된 시험양돈장

농장명	지역	사육형태	농장규모(모돈수)
A	경남	일괄	250
B	충남	일괄	450
C	경기	일괄	400
D	경남	일괄	900
E	경남	일괄	320
F	경남	일괄	200

###### 2) 시험양돈장에 대한 정기 모니터링 검사

- 시험양돈장에 대한 세밀한 질병모니터링을 실시하기 위하여 혈액 및 분변시료를 사육 구간별로 채취하여 주요 원인체에 대한 항원·항체검사 실시하였다.

표 2. 지정양돈장에 대한 시료 채취 내역

시료	모돈				자돈/육성돈				계
	후보돈	1-2산	3-4산	포유자돈	이유자돈	70일	100일	130일	
전혈(혈청)	4	5	5	20*	5	5	5	5	54
분변 (돈사, 돈방)	-	1	1	2	2	2	2	2	12
분변 (개체 swab)	4	5	5	20	5	5	5	5	54

- 전혈(혈청) 혹은 분변시료를 이용하여 바이러스성 질병 4종(PRRSV, PEDV, PCV2, RotaV)과 세균성 질병 2종(E.coli, Sal)에 대한 항원검사(PCR, RT-PCR, 세균분리)를 실시하였고, 혈청 시료를 이용하여 바이러스성 질병 3종(PRRSV, PCV2, CSFV)과 세균성 질병 5종(App, AR, Mh, Hps, Pm)에 대한 항체검사(ELISA, 응집시험)를 실시하였다.

표 3. 질병별 항원·항체 검사방법

	질병명	항원검사법	항체검사법
바이러스성 질병	돼지열병	-	
	돼지생식기호흡기증후군	RT-PCR	ELISA
	돼지유행성설사병	RT-PCR	-
	돼지썩코바이러스감염증	PCR	ELISA, IFA
	돼지로타바이러스감염증	RT-PCR	-
세균성 질병	대장균증	균분리, PCR	-
	살모넬라감염증	균분리, PCR	-
	위축성비염	-	응집반응
	파스튜렐라페렴	-	ELISA
	홍막페렴	-	ELISA
	유행성페렴	-	ELISA
	글래서병	-	ELISA

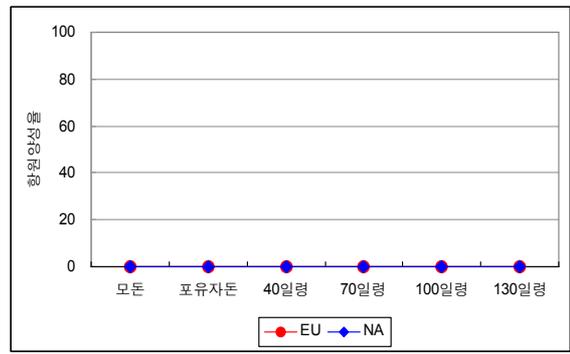
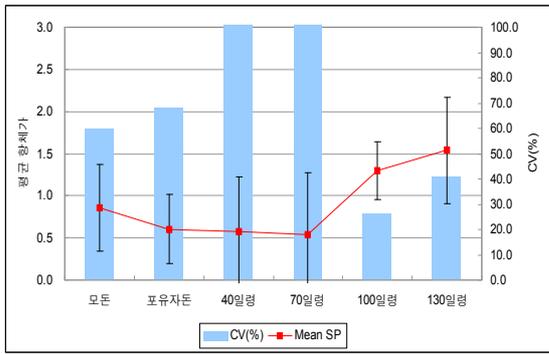
3) 시험양돈장에 대한 항원·항체검사 세부 결과

- 각 질병별 항원검사를 통해 가장 감염률이 높은 구간을 추적하고, 항체검사는 평균 항체가 의 일정한 면역수준에서 많이 상승하는 구간의 앞 구간을 감염 시점으로 정하여 분석하였으며, 대표적으로 A농장의 세부 검사결과는 아래와 같다.

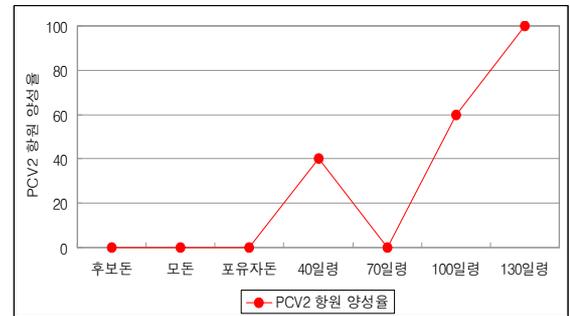
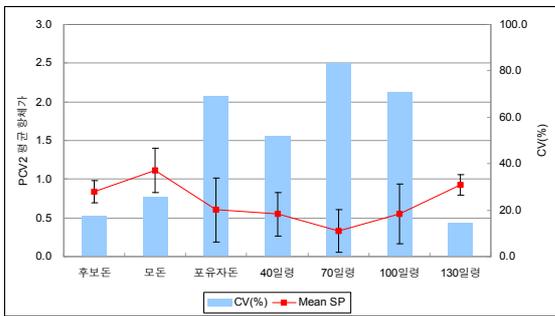
표 4. A농장의 분변에 대한 항원검사 결과

질병명	PED	Rota	대장균	살모넬라
검사결과	+	-	+	-
감염구간	포유, 이유자돈	-	포유,이유자돈	-

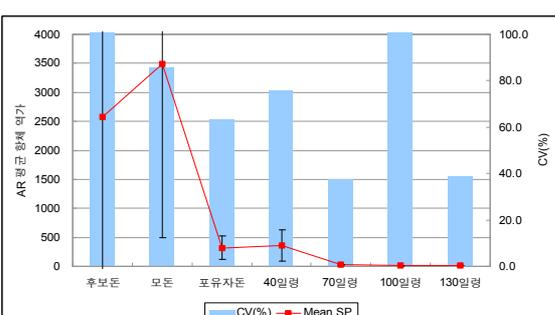
<PRRSV, 좌: 항원, 우: 항체>



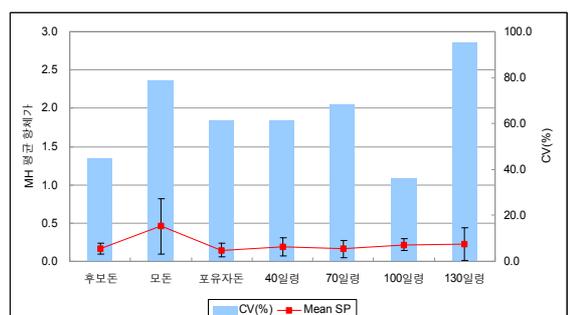
<PCV2, 좌: 항원, 우: 항체>



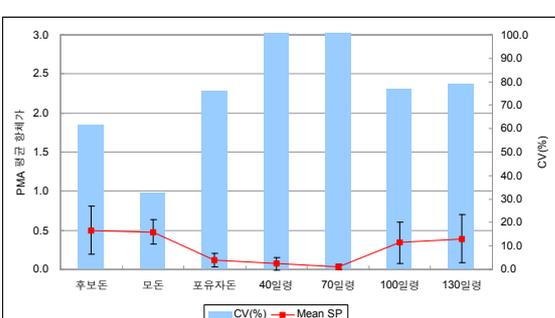
<위축성비염>



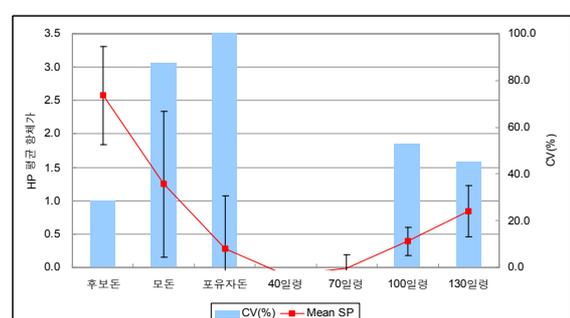
<유행성폐렴>



<파스튜렐라 폐렴 A형 >



<글래서병>



<홍막페럼, 좌: App 2형, 우: App 5형>

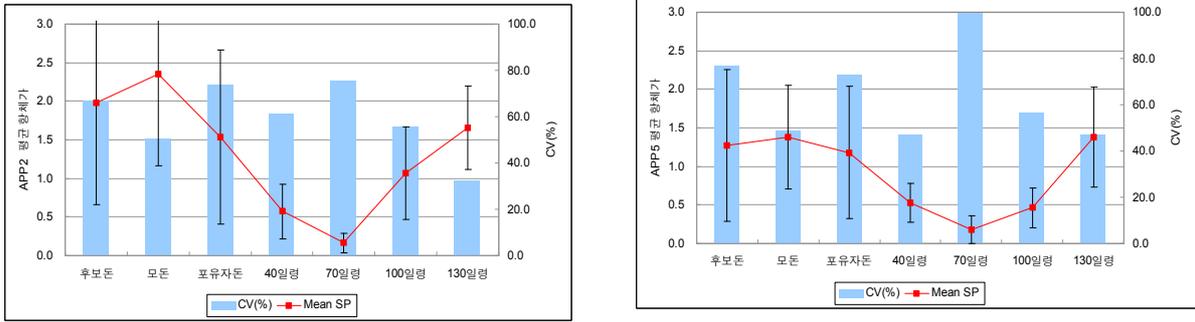


그림 1. A농장의 질병별 항원·항체검사 결과

- A농장의 분석방법과 동일하게 6개 농장의 질병별 검사결과를 종합한 결과, 소화기질병의 경우 RotaV와 E.coli 감염률이 높았고, 특히 RotaV와 E.coli 복합감염 농가가 많았으며, 호흡기질병의 경우 PRRS와 PCV2 감염률이 가장 높았으며, 대부분 2종 이상의 복합감염이 대다수를 차지하였다.

표 5. 농장별 질병 감염 상황

농장	포유상태	방역상태	소화기질병				호흡기질병				전신성질병			
			PED	Rota	E.coli	Sal	PRRS	AR	Pm	App	Mh	Hps	CSFV	PCV2
A	일부 불량	양호	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
B	-	양호	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
C	-	일부 불량	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
D	양호	불량	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
E	양호	일부 불량	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
F	일부 불량	양호	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+

표 6. 농장별 주요 질병 요약

농장	소화기 질병	호흡기질병
A	PED, E.coli	PCV2, App, Hps
B	Sal	PRRS, PCV2, Mh
C	Rota, E.coli	PRRS, Hps
D	Rota, E.coli	PCV2, Pm, Mh
E	E.coli	PCV2, App
F	Rota, E.coli	PRRS, PCV2, AR, Mh

4) 주요 병원체에 대한 특성조사

가) 주요 바이러스 분자생물학적 특성을 분석을 위한 6개 농장에서 검색된 바이러스 (PEDV, RotaV, PCV2) 등에 대한 유전자 염기서열 조사

- PEDV는 1개 농장에서 검색된 바이러스와 ‘10-’ 11년 발생된 바이러스를 이용하여 염기서열 분석 결과, S gene은 2개의 group으로 구분되었으며, group간에는 95.3%의 nucleotide(nt) 상동성을 보였고, ORF3, M, N, E gene은 100%, 99.1%, 98.9%, 97.8%의 상동성을 보였으며, 국내 보고된 다른 PEDV와 spike protein의 amino acid(aa) 상동성을 분석한 결과, 최대 6.1%의 차이를 보였고, 생독백신주, 불활화백신 주와는 8.2%, 8.9%의 차이를 보였으며, 중화 epitope 변이에서는 COE epitope의 변이가 심하였으나, endodomain epitope의 변이는 없었다.

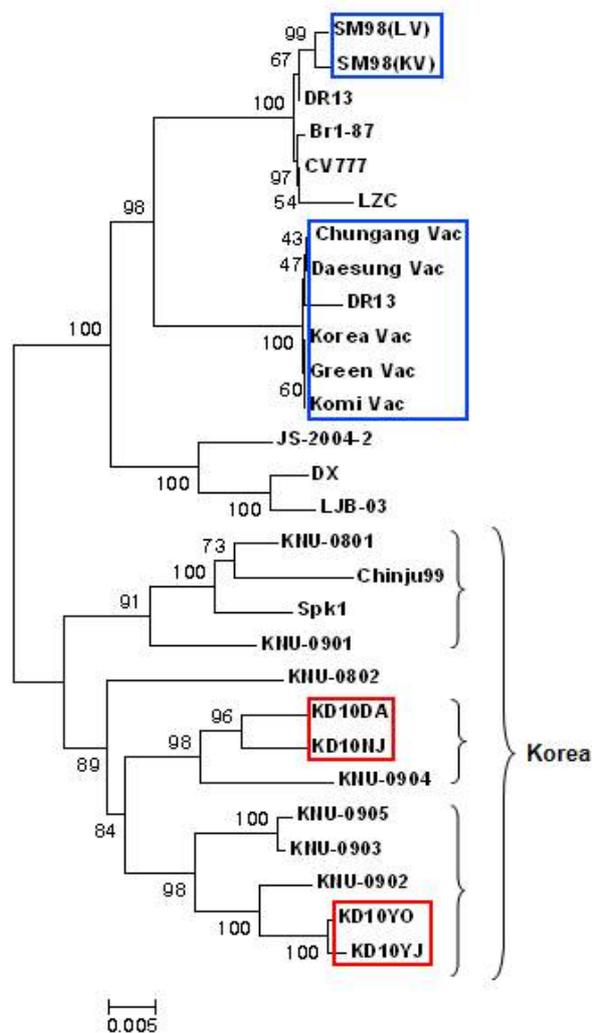


그림 2. 국내 발생 PEDV의 S gene에 대한 phylogenetic tree. □ 백신주, □ 야외주

표 7. 국내 발생 PEDV의 각 ORF별 상동성 비교

ORF	KD10YO & KD10DA		KD10YO & others	
	nucleotide	Amino acid	nucleotide	Amino acid
S	95.3	93.9	92.5~97.2	91.1~97.8
ORF3	100.0	100.0	90.3~99.8	89.7~100.0
E	97.8	98.7	96.1~97.8	97.3~98.6
M	99.1	99.6	96.2~99.6	95.9~100.0
N	98.8	99.1	94.4~98.4	93.7~98.3

표 8. 국내 발생 및 백신주 PEDV의 S gene의 상동성 비교

		KD10YO	KD10DA	KNU-0801	KNU-0902	KNU-0904	LV	KV (SM98P)	CV777	
Field strains	KD10YO	-	95.2	94.5	98.6	95.0	93.1	92.5	93.4	nucleotide
	KD10DA	93.9	-	95.5	95.6	97.8	93.3	92.7	93.5	
	KNU-0801	93.9	94.4	-	94.8	95.1	94.1	93.1	93.9	
	KNU-0902	97.8	94.0	94.0	-	95.3	93.3	92.6	93.5	
	KNU-0904	93.9	97.7	94.4	94.0	-	92.9	92.6	93.4	
Vaccine strains	LV	91.8	91.9	93.6	92.2	91.9	-	96.0	96.8	
	KV (SM98P)	91.1	91.2	92.1	91.5	91.2	94.7	-	99.0	
	CV777	92.5	92.4	93.3	92.9	92.5	95.8	98.3	-	
		Amino acid								

- RotaV의 동일 G type내 상동성을 확인한 결과, G5형은 82.5~99.8%, G4형은 83.2~95.6%, G9형은 92.5~99.7%로 G5와 G4형의 변이가 심하였으며, RotaV(5주)의 전체 염기서열을 분석하여 각 ORF별 type을 분류한 결과, NSP1 gene은 모두 A8형으로 돼지 유래 Gottfried주와 동일하였고, NSP5 gene은 사람의 H2형을 가진 바이러스 2주가 확인되었다.

표 9. 동일 type간 RotaV 상동성 비교

G type	Identity(%)	
	nucleotide	amino acid
G2	81.3 ~ 85.5	86.1 ~ 89.8
G4	83.2 ~ 95.6	89.0 ~ 96.8
G5	82.5 ~ 99.8	89.0 ~ 100
G9	92.5 ~ 99.7	94.3 ~ 99.6

표 10. RotaV(5주)의 전체염기서열 분석을 통한 ORF별 분류

	Strains	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
Field strains	KDG9A	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H2
	KDG9A	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
	KDG3A	G3	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E9	H1
	KDG5A	G5	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H2
	KDG3B	G3	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E9	H1
Standard strains	Wa*	G1	P[8]	I1	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	DS-1*	G2	P[4]	I2	R2	C2	M2	A2	N2	T2	E2	H2
	A131	G3	P[7]	I5	R1	C2	M1	A1	N1	T1	E1	H1
	Gottfried	G4	P[6]	I1	R1	C1	M1	A8	N1	T1	E1	H1
	OSU	G5	P[7]	I5	R1	C1	M1	A1	N1	T1	E1	H1

\* Human strains

- 5개 농장에서 분리된 PCV2와 과거 분석된 PCV2의 ORF2 유전자에 대한 염기서열 분석 결과 20개는 PCV2b에 속하였고, 2개는 PCV2a로 분류되었으며, PCV2a 분리주간에는 높은 상동성(99.7%)을 보였으며, PCV2b 분리주간에는 93.1-99.8%의 상동성을 보였다. 또한 PCV2b 분리주는 다시 2개의 PCV2b-1A, 11개의 PCV2b-1B 및 7개의 PCV2b-1C로 분석됨에 따라 국내에서는 PCV2b-1B가 가장 많이 검색되는 바이러스형인 것으로 분석되었다.

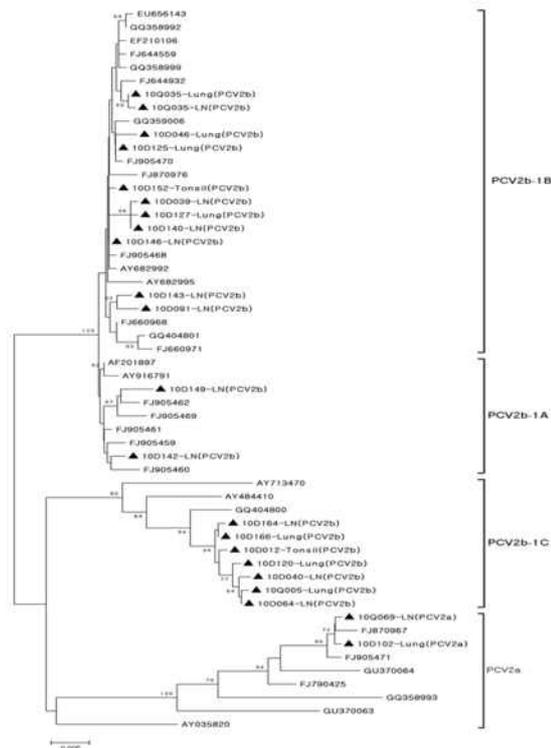


그림 3. 국내 발생 PCV2의 ORF2 gene에 대한 phylogenetic tree

나) 분리된 E.coli의 부착인자 및 독소형 분석

- 5농장에서 E.coli가 분리되었고, 구간별로는 40일령 자돈사와 100일령 육성사에서 분리률이 가장 높았으며, 자돈사는 ETEC E.coli, 육성사는 STEC E. coli 분포가 높으며, 주요 fimbriae type은 F4, F18이고, LT, STa, STb, Stx2e등 다양한 toxin type이 확인되었다.

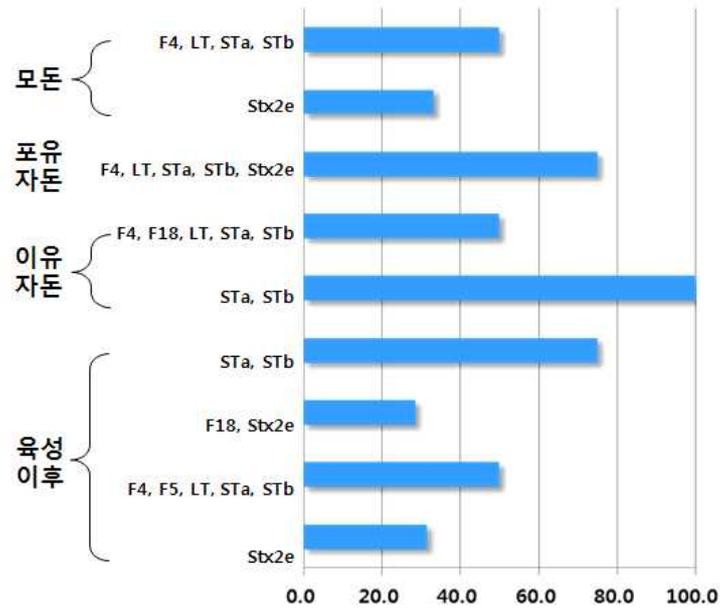


그림 4. 사육구간별 E.coli 분리주의 부착인자 및 독소형

2. 질병발생 위험지도(Farm disease risk assessment mapping) 작성을 통한 기본 방제대책 수립

가. 사육단계별 질병발생 위험요인 분석 및 주요 감염구간 및 집중관리 시기 도출

- 6개 시험양돈장의 검사결과를 바탕으로 각 양돈장의 질병발생 위험지도를 작성하였다.

표 11. A 농장의 질병발생 위험지도

질병명		사육구간						
		후보돈	모돈	포유자돈	40일령	70일령	100일령	130일령
소화기 질병	PED							
	Rota							
	E.coli							
	Sal							
호흡기 질병	PCV2							
	PRRS							
	AR							
	Pm							
	App							
	Mh							
Hps								

※ 소화기질병은 후보돈 및 모돈을 통한 설사병 위험도가 높고, PCV2는 전 구간에서 항원이 검색되어 자돈 백신(면역제제) 투여가 필요하며, 홍막폐렴과 글래서병은 70일령 구간에서 감염이 추정됨으로 백신 투여 및 연령별 격리, 혼사 방지 작업 필요

표 12. B 농장의 질병발생 위험지도

질병명		사육구간						
		후보돈	모돈	포유자돈	40일령	70일령	100일령	130일령
소화기 질병	PED							
	Rota							
	E.coli							
	Sal							
호흡기 질병	PCV2							
	PRRS							
	AR							
	Pm							
	App							
	Mh							
Hps								

※ 소화기질병은 70일령이후 육성돈에 살모넬라감염이 있고, PCV2는 전구간에서 검색되어 피해상황에 따라 모돈 백신 적용이 필요하며, 이유자돈이후 PRRS는 안정화되었으나 모돈 및 포유자돈에 의해 다른 구간에 전파 확산이 우려됨

표 13. C 농장의 질병발생 위험지도

질병명		사육구간						
		후보돈	모돈	포유자돈	40일령	70일령	100일령	130일령
소화기 질병	PED							
	Rota							
	E.coli							
	Sal							
호흡기 질병	PCV2							
	PRRS							
	AR							
	Pm							
	App							
	Mh							
	Hps							

※ RotaV, E.coli 복합감염에 의한 설사병 피해가 심함에 따라 모든 접종 백신의 항원 성분 확인이 필요하고, PRRS는 비교적 안정화되었으나, 40일, 70일 구간에서 항원이 미약히 검출되어 구간별 격리 및 안정화 지속 관리 필요

표 14. D 농장의 질병발생 위험지도

질병명		사육구간						
		후보돈	모돈	포유자돈	40일령	70일령	100일령	130일령
소화기 질병	PED							
	Rota							
	E.coli							
	Sal							
호흡기 질병	PCV2							
	PRRS							
	AR							
	Pm							
	App							
	Mh							
	Hps							

※ RotaV, E.coli 복합감염에 의한 설사병 피해가 심함에 따라 모든 접종 백신의 항원 성분 확인이 필요하고, 세균성 질병의 경우, 70일령부터 마이코플라즈마병과 파스튜렐라페럼의 발생이 의심됨

표 15. E 농장의 질병발생 위험지도

질병명		사육구간						
		후보돈	모돈	포유자돈	40일령	70일령	100일령	130일령
소화기 질병	PED							
	Rota							
	E.coli							
	Sal							
호흡기 질병	PCV2							
	PRRS							
	AR							
	Pm							
	App							
	Mh							
	Hps							

※ 대부분의 구간에 다양한 E.coli 감염이 심하며, 육성사는 STEC E. coli가 많이 검색되어 적절한 항생제 및 백신 투여가 요구됨

표 16. F 농장의 질병발생 위험지도

질병명		사육구간						
		후보돈	모돈	포유자돈	40일령	70일령	100일령	130일령
소화기 질병	PED							
	Rota							
	E.coli							
	Sal							
호흡기 질병	PCV2							
	PRRS							
	AR							
	Pm							
	App							
	Mh							
	Hps							

※ 다양한 소화기성, 호흡기성 병원체가 심각하게 검색되어 모돈 교체 및 울인-울아웃으로 농장 전체에 대한 돼지 교체가 필요

3. 돼지소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 면역제제 개발

가. 소모성질환 저감을 위한 면역복합제제의 구성 및 개발방향 설정

1) 질병의 특성에 따라 돼지 연령별 면역복합제제 구성 구분

- 포유기 감염 질병인 돼지유행성설사병, 돼지췌코바이러스감염증, 대장균증, 로타바이러스감염증 및 PRRS와 육성기이후 감염 질병인 살모넬라감염증, 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 흉막폐렴, 유행성폐렴, 글래서병으로 구분하였으며, 고면역 항체제제 생산을 위한 면역제제는 닭을 이용한 난황항체제제와 유우의 초유를 이용한 초유제제를 각각 생산하였다.

2) 고면역 항체제제 생산을 위한 원인체별 집중 항원 설정 및 제작

- 야외 바이러스 분리가 어려운 바이러스(PEDV, PCV2)에 대한 재조합 항원 및 재조합 바이러스 항원 생산 및 적용을 고려하였으며, 다양한 혈청형을 가진 원인체(RotaV, E.coli, App)에 대한 다가 항원 생산하여 적용하였다.

표 17. 항체제제 생산을 위한 면역 항원 성분 구성

구분	난황항체(IgY)		초유항체	
	병원체	항원	병원체	항원
성분	PEDV	백신주, 재조합항원	PEDV	백신주, 재조합항원
	RotaV	분리주(G4, 5, 9)	RotaV	분리주(G4, 5, 9)
	PCV2	재조합항원, 재조합바이러스	PCV2	재조합항원
	PRRS	백신주 1종, 분리주 1종	PRRS	백신주 1종, 분리주 1종
	E.coli	표준주 4종, 분리주 10종	E.coli	표준주 4종, 분리주 10종
	Sal	분리주 1종	Sal	분리주 1종
	AR	분리주 1종	AR	분리주 1종
	Mh	분리주 1종	Mh	분리주 1종
	Pm	분리주 1종(A형)	Pm	분리주 1종(A형)
	Hps	분리주 3종(1, 4, 5형)	Hps	분리주 3종(1, 4, 5형)
	App	분리주 2종(2, 5형)	App	분리주 2종(2, 5형)
	부형제	ISA 70, 기타		ISA25, Alum hydroxide, 기타

가) 주요 바이러스질환 면역항원 생산

- PEDV와 PCV2와 같이 백신주이외의 야외주는 분리가 어려우므로 주요 중화항체를 생산하는 단백질을 발현하는 재조합항원을 발현하였으며, 재조합항원 제작을 위한 클로닝, 형질전환, 세포발현등의 실험이 진행하였다.

< PCV2 재조합 캡시드 단백질 발현 >

- 베쿨로바이러스를 이용한 PCV2 재조합 캡시드단백질의 발현을 높이기 위하여 코돈 최적화(codon usage)한 유전자를 합성하여 이용하였으며, 코돈 최적화된 유전자를 인공적으로 합성하고, 클로닝 및 형질도입(transfection)을 통해 재조합 베쿨로바이러스를 제작하였다.

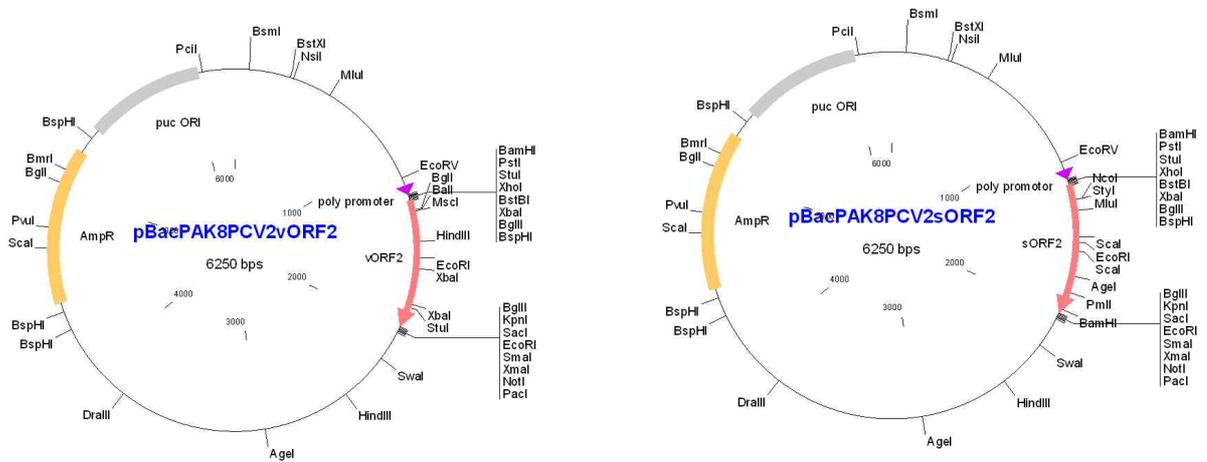


그림 5. PCV2 야외분리주의 ORF2 유전자(vORF2, 좌) 및 코돈 최적화에 의한 합성 ORF2 유전자(sORF2, 우)가 삽입된 전달벡터(pBacPAK8) 지도

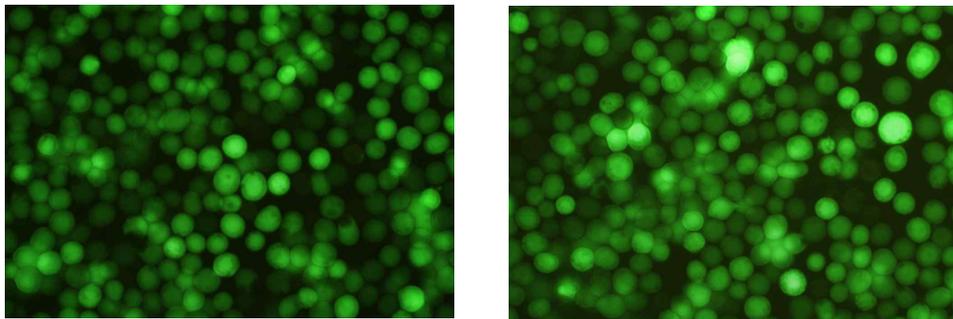


그림 6. PCV2 야외분리주의 ORF2 유전자 삽입 베칼로바이러스(reBacPCV2vORF2, 좌) 및 코돈 최적화에 의한 합성 ORF2 유전자 삽입 베칼로바이러스(reBacPCV2sORF2, 우) 감염 곤충세포의 형광발색 사진

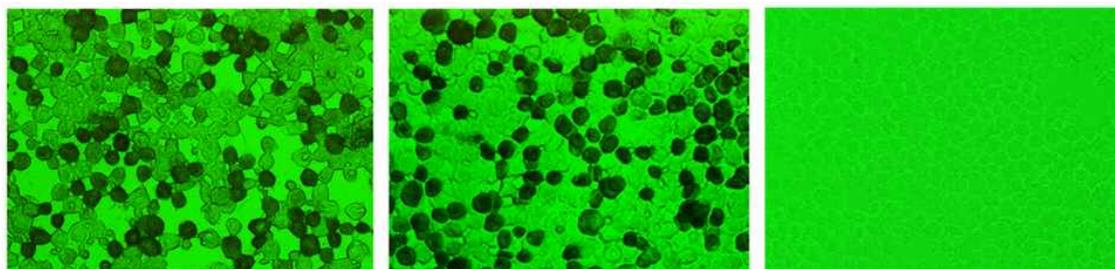


그림 7. 재조합 베칼로바이러스 감염세포에서 PCV2 야외분리주의 ORF2 유전자 이용 재조합 캡시드단백질(vCap, 좌) 및 코돈 최적화에 의한 합성 ORF2 유전자 이용 재조합 캡시드단백질(sCap, 중간)에 대한 특이 단크론항체 반응성 사진(대조 세포, 우)

- 동일 역가의 재조합 베칼로바이러스를 감염시킨 곤충세포에서는 코돈 최적화된 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(sCap)이 PCV2 야외주의 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(vCap)보다 발현 효율이 약 2배 정도 높은 것으로 효소면역측정법(ELISA)으로 확인하였으며, 웨스턴블로팅(western blotting)으로도 발현이 증강되는 것을 확인하였다.

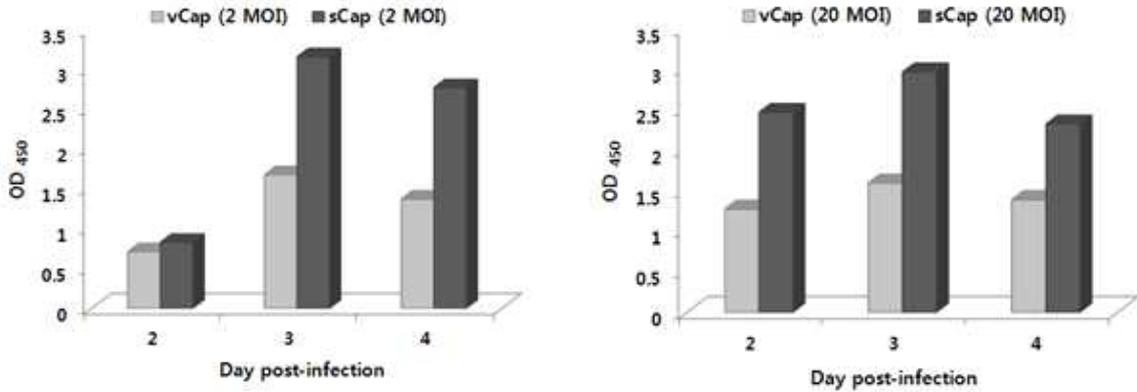


그림 8. PCV2 야외분리주의 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(vCap, 회색). 및 코돈 최적화된 합성 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(sCap, 흑색)의 발현 측정치(감염량 및 감염시간별)

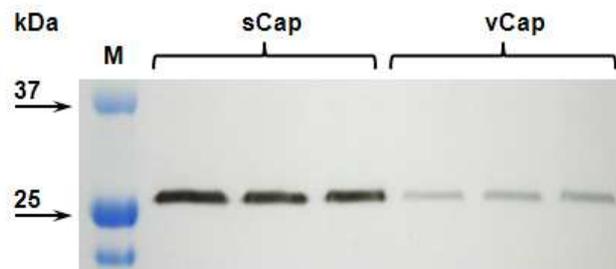


그림 9. 코돈 최적화된 합성 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(sCap, 좌)와 PCV2 야외주의 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(vCap, 우)의 발현 반응치 (20MOI 감염, 3일간 배양)

- PCV2의 vCap과 sCap의 면역 원성을 비교 평가하기 위해 산란계를 이용한 면역후 혈청역가를 조사한 결과 PCV2의 vCap보다는 sCap을 접종한 닭에서 항체 형성이 높은 것을 확인하였다.

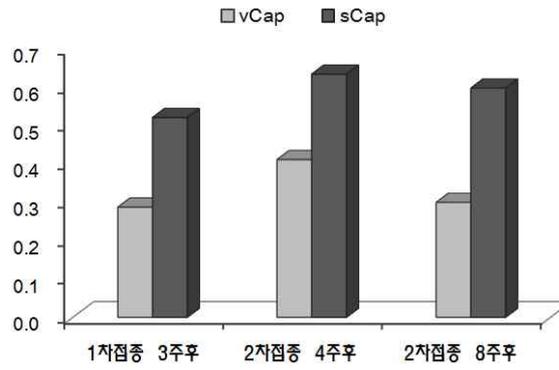


그림 10. PCV2 야외분리주의 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(vCap, 회색) 및 코돈 최적화된 합성 ORF2 유전자를 이용한 재조합 캡시드단백질(sCap, 흑색)의 닭에 대한 항체 형성능 비교

< PEDV spike 재조합 단백질 발현 >

- PED 바이러스 구조단백질중 중화항체를 생성하는 spike protein에 대한 재조합 단백질 발현을 위하여 Baculovirus 발현시스템을 이용하였으며, 발현 전략은 spike protein 구조 중 S1, S2 domain과 전체(S1+S2) protein을 구분하여 발현하였다. 야외주 PED 바이러스(KD10YO)를 이용하여 S1 domain은 2,367bp, S2 domain은 1,782bp를 증폭하였고, 증폭된 S1과 S2를 연결하여 전체 spike protein gene을 확보하고, 각각의 gene을 6×polyhistidine이 tagging된 발현벡터에 삽입하였다.

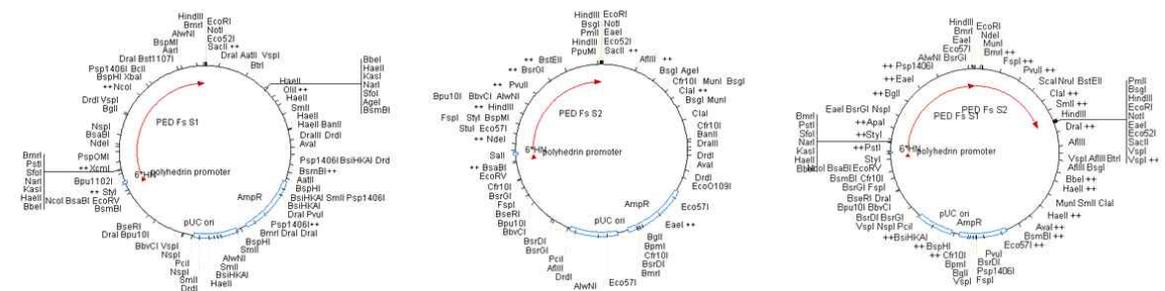


그림 11. PEDV 재조합 spike protein 제작을 위한 발현벡터. PEDV S1 발현벡터(좌), PEDV S2 발현벡터(중), PEDV S(S1+S2) 발현벡터(우)

- 각각의 발현벡터와 baculovirus DNA를 이용하여 곤충세포(Sf9)에 transfection후 plaque assay를 실시하고, 순수 재조합 바이러스를 계대하였다. 단백질 발현 유무를 확인하기 위하여 감염 곤충세포를 수거하여 lysis buffer첨가후 sonication하여 상청액을 회수하였으며, anti-HN 토끼 항혈청을 이용하여 Western blot을 실시한 결과, PED 바이러스의 S1 domain은 약 125 kDa, S2 domain은 약 65 kDa, S 전체는 약 190 kDa의 발현 단백질을 확인하였다.

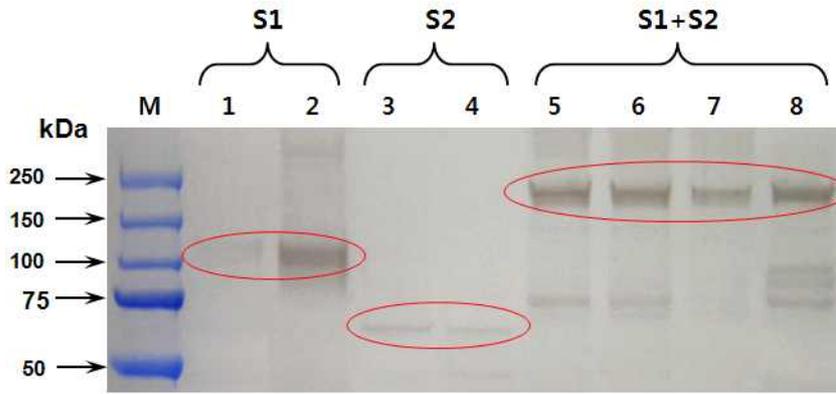


그림 12. PEDV 재조합 spike protein 확인을 위한 Western blot. M; protein standard, 1~2; PEDV S1 protein, 3~4; PEDV S2 protein, 5~8; PEDV S protein (anti-HN rabbit serum 사용)

- PEDV 면역 항원 개량을 위해 baculovirus를 이용한 spike 단백질의 면역원성을 산란계 접종을 통해 확인한 결과 S1, S2 및 전체 유전자를 이용한 재조합 단백질 모두 항체 형성이 없어 면역 항원으로 사용을 배제하였으며, 기존 백신 바이러스를 농축후 산란계에 접종한 결과 생독 및 사독 백신주 모두 항체 형성을 확인함

표 18. PEDV 항원별 산란계 접종후 중화항체 산생능 비교 결과

항원	두수	중화항체 역가		
		1차접종 3주후	2차접종 4주후	3차접종 4주후
재조합 단백질	5	<1:2	<1:2	<1:2
백신 바이러스(P5V)	5	8.2	10.5	12.6
백신 바이러스(KV)	5	6.8	17.6	19.5

#### 나) 돼지소모성질환 제어용 난황항체제제 및 초유제제 생산용 항원 최종 결정

- 주로 어린 돼지에서 폐사와 성장지연을 유발하여 농장에 심각한 피해를 주는 돼지전염성위장염(TGE), 돼지유행성설사병(PED), 돼지로타바이러스감염증(RotaV) 등의 바이러스 설사병 3종, 신생자돈에서 이유자돈까지 설사병과 이유이후 부종병을 유발하는 병원성 대장균증(*E. coli*)와 이유이후 심한 설사를 유발하는 돼지살모넬라증(*S. typhimurium*) 등의 세균성 설사병 2종, 돼지유행성폐렴(*M. hyopneumoniae*), 글래서병(*H. parasuis*), 돼지파스튜렐라증(*P. multocida*) 등 이유자돈 이후에 폐렴 및 흉막염을 유발하는 세균성 호흡기질병 3종 및 전신성 감염을 유발하는 돼지썩코바이러스감염증(PCV2)와 돼지연쇄구균감염증(*S. suis*) 등 총 10종의 주요 돼지질병 선정하고, 면역제제 생산을 위한 접종용 항원의 구성을 위해 설사병 3종 바이러스(TGEV, PEDV, RotaV)는 대표 백신주나 야외주 바이러스는 적합 세포주에서 배양하여 농축

후 불활화하였으며, *E. coli*, *S. typhimurium*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *P. mutocida*, *S. suis* 등의 세균은 배양후 불활화하여 원심 농축하였으며, 바이러스 배양이 힘든 PCV2의 경우 그 주요 면역 단백질(capsid 단백질)을 배큐로바이러스 발현 시스템을 이용하여 발현후 그 배양액과 세포를 파쇄한후 불활화하여 사용하였다.

표 19. 돼지용 면역제제 제조용 병원체(10종)의 항원별 구성성분 및 사용 균주

질병명	균주	접종 항원
돼지전염성위장염(TGE)	백신주(평택주)	바이러스 농축항원
돼지유행성설사병(PED)	백신주(SM98)	바이러스 농축항원
돼지로타바이러스감염증(RotaV)	분리주(G4, G5, G9)	바이러스 농축항원
돼지썩코바이러스감염증(PCV2)	재조합 캡시드 단백질	재조합항원
돼지대장균증( <i>E. coli</i> )	표준주 및 분리주	균체항원
돼지살모넬라증( <i>S. typhimurium</i> )	분리주	균체항원
돼지유행성 폐렴( <i>M. hyopneumoniae</i> )	분리주	균체항원
글래서병( <i>H. parasuis</i> )	분리주	균체항원
돼지파스튜렐라증( <i>P. mutocida</i> )	분리주(A type)	균체항원
돼지연쇄구균감염증( <i>S. suis</i> )	분리주	균체항원

다) 돼지소모성질환 제어용 난황항체 제제 및 초유제제 시제품 생산

① 병원체별 배양 최적 조건 설정

- 돼지전염성위장염(TGE) 바이러스 배양: 돼지고환(ST) 세포를 이용하여 TGE 바이러스 백신주(평택주)를 증식 배양하고, 세포변성효과(CPE)가 약 80% 정도 보일 때 -70℃와 실온에서 3회 동결 용해한 후, 원심분리하여 회수된 배양 상청액을 -70℃에 보관하였다.
- 돼지유행성설사병(PED) 바이러스 배양: 아프리카 원숭이신장(Vero) 세포를 이용하여 PED 바이러스 백신주(SM98주)를 증식 배양하고, 세포변성효과(CPE)가 약 80% 정도 보일 때 -70℃와 실온에서 3회 동결 용해한 후, 원심분리하여 회수된 배양 상청액을 -70℃에 보관하였다.
- 돼지로타바이러스(RotaV) 배양: 야외주 분리를 위해 리서스원숭이신장(TF104) 세포를 roll tube에서 배양하고, 돼지의 장 및 분변 부유액을 원심분리 및 필터 여과한 후, trypsin 처리하여 세포에 접종하여 세포변성효과(CPE)가 관찰 바이러스에 대하여 RotaV VP7 유전자를 이용한 G typing을 실시한 후, 최종 확인된 RotaV는 plaque assay를 통해 순수 분리함. 면역제제에 사용된 야외주는 국내에서 가장 많이 발생되고 있는 G4, G5 및 G9 RotaV 3종을 대량 배양하여 사용하였다.
- 돼지썩코바이러스(PCV2) 재조합 단백질 생산: 재조합 baculovirus는 10 MOI로 Sf9 세포에 접종하고 3일후 그 감염 세포를 수거하여 -70℃와 실온에서 3회 동결 용해한 후, 초음파 파쇄후 -20℃에 보관하였다.

- 돼지대장균(*E. coli*) 배양: 돼지에서 문제되는 병원성 *E. coli*를 배양하기 위해 섬모형에 따라 표준주 4종(K88, K99, 987P, F41) 및 독신 산생형에 따라 야외주 10종(LT, ST, Hly 산생주)을 BHI(Brain heart infusion) 액체배지에 100rpm으로 20시간 진탕배양하였다.
- 돼지살모넬라(*S. typhimurium*) 배양: 돼지에서 분리된 *S. typhimurium*을 BHI 액체배지에 100rpm으로 20시간 진탕배양하였다.
- 돼지유행성폐렴균(*M. hyopneumoniae*) 배양: 돼지의 폐에서 분리한 *M. hyopneumoniae*균을 Mycoplasma broth에 5-7일간 배양하였다.
- 돼지파스튜렐라(*P. mutocida*) 배양: 돼지에서 분리된 *P. mutocida*(A type)를 BHI 액체배지에 100rpm으로 20시간 진탕배양하였다.
- 글래서병균(*H. parasuis*) 배양: 돼지에서 분리된 *H. parasuis*를  $\beta$ -NAD(40ug/ml)가 첨가된 BHI 액체배지에 100rpm으로 20시간 진탕배양하였다.
- 돼지연쇄구균(*S. suis*) 배양: 돼지에서 분리된 *S. suis*를 BHI 액체배지에 200rpm으로 20시간 진탕배양하였다.

## ② 면역제제 제조용 생산용 접종 항원 제조

- TGEV, PEDV, RotaV 등의 바이러스 항원( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml 이상)은 Pellicon filter(5K)를 이용하여 원배양 분량의 1/5로 농축한 후, 0.1M BEI(Bromoethylamide hydrobromide)을 농축 분량의 10% 첨가하여 바이러스를 불활하였다.
- baculovirus 발현 시스템을 이용하여 제작된 PCV2 capsid 단백질(세포 초음파 파쇄 상청액)도 동일한 방법으로 불활화하고, Spectrophotometer(410nm)를 이용한 OD치가 0.5가 되도록 희석 부유하였다.
- *E. coli*, *S. typhimurum*, *M. hyopneumoniae*, *H. parasuis*, *P. mutocida*, *S. suis* 등의 불활화 균체항원은 Spectrophotometer(410nm)를 이용한 OD치가 1.0이 되도록 부유하였다.
- 각각의 항원을 혼합하고 균일한 현탁액을 만든 후, 난황항체제 제조용 항원은 면역증강제 ISA 70과 혼합하고, 초유제제는 수산화알루미늄 겔과 면역증강제(oil adjuvant, ISA25)를 전체 현탁액의 10%와 5%가 되게 첨가하여 균질기에서 1,000rpm에서 30분간 유제하였다.



그림 13. 난황항체제제(좌) 및 초유항체제제(우) 생산을 위한 접종 항원 혼합액 시제품

③ 면역제제 생산을 위한 농장 선정 및 관리

- 난황항체 생산하기 위한 산란계 농장 1개소와 초유항체 생산을 위한 유우 농장을 4개소를 선정하여 관리하였다. 난황항체 생산을 위해 60일령 산란계에 3주간격으로 3회 1ml의 항원을 접종하고, 2개월 단위로 추가 접종하였으며, 초유항체 생산을 위해 임신 젖소에 대하여 분만 3주간격으로 3회 2ml의 항원을 접종하였다.

표 20. 주요 바이러스질병 면역항원 생산

용도	지역	사육규모	접종 프로그램
난황항체	경남 고성군	1,000수	60일령 3주간격 3회(2개월마다 추가접종)  분만전 3주간격 3회
	충남 예산군	200두	
면역초유	경북 경산시	80두	
	경북 경산시	40두	
	경남 창원군	80두	



그림 14. 난황항체 생산을 위한 산란계 농장 시험 장면(좌상: 시험농장 계사, 우상: 산란계 접종, 좌하: 접종 항원별 산란계, 우하: 산란계 채혈)



그림 15. 초유항체 생산을 위한 유우농장 시험 장면(좌상: 시험농장 우사, 우상: 유우 채혈, 좌하, 우하: 초유 수집)

④ 난황항체제제 및 초유제제 시제품 생산

- 난황제제는 난황 수집후 spray 건조하여 사용하였으며, 초유제제는 초유면역항체 생산용 항원을 접종한 분만 젖소로부터 30시간이내의 초유를 멸균된 용기에 수거한 후, spray 건조하였다.



그림 16. 면역제제 원료 보관(상) 및 난황항체제제 건조 분말(하,좌), 초유항체제제 건조 분말(하,중), 난황항체제제와 초유항체제제 혼합 분말(하,우)

- ⑤ 난황항체제제 및 초유제제에 대한 병원체별 항체 역가 측정  
 - 시제품으로 생산된 면역제제에 대한 병원체별 항체 역가를 조사하였다.

표 21. 난황항체제제의 병원체별 항체 역가 측정 결과

질병명	항체 역가(ELISA)		
	접종전 난황분말	1차접종 4주후 난황분말	3차 접종 4주후 난황분말
TGEV	10	160-320	1,280-2,560
PEDV	10	160-320	1,280-2,560
RotaV	10	160-320	2,560
E.coli표준주	20	160-320	5,120
E.coli야외주	20	320	5,120
S.typhimurum	20	160-320	5,120

표 22. 초유항체제제의 병원체별 항체 역가 측정 결과

질병명	항체 역가							
	미접종우 초유		접종우 초유1		접종우 초유2		접종우 초유3	
	ELISA	응집	ELISA	응집	ELISA	응집	ELISA	응집
TGE	10		5,120		10,240		10,240	
PED	10		5,120		10,240		10,240	
RotaV	10		10,240		10,240		10,240	
PCV2	10		2,560		5,120		2,560	
<i>E. coli</i> (표준주)	20	20	5,120	640	10,240	1,280	10,240	640
<i>E. coli</i> (분리주)	20	20	5,120	640	10,240	2,560	10,240	640
<i>S. typhimurium</i>	10	10	5,120	320	10,240	1,280	10,240	640
<i>M. hyopneumoniae</i>	10		5,120		10,240		5,120	
<i>H. parasuis</i>	10		5,120		5,120		5,120	
<i>P. multocida</i>	10		5,120		10,240		5,120	
<i>S. suis</i>	40		5,120		10,240		5,120	

4. 자돈의 돼지 소모성질환 병원체 제어용 면역제제 시제품 생산

가. 사육단계별 병원체 제어용 면역제제 시제품 생산

- 난황항체 및 초유항체제제에 발육 및 성장 촉진을 위해 생균제 3종과 당 및 비타민제제를 포함하여 최종 시제품을 생산하였다.

표 23. 면역제제 최종 시제품 함유 성분

구분	Antibodies				Bioactives	Probiotics
	IgY		Columstrum			
	Diarrhea disease	Respiratory disease	Diarrhea disease	Respiratory disease		
ICF1-F3	PEDV RotaV TGEV E.coli S.typhimurum C.Perferigens	PCV2 M.hyopneumoniae H.parasuis S.suis Pmultocida A	PEDV RotaV TGEV E.coli S.typhimurum C.Perferigens	PCV2 M.hyopneumoniae H.parasuis S.suis Pmultocida A	Fructo-oligo Sorbitol Vitamin-C Glycine등	S.faecalis Cl.butyrnicum B.coagulance

- \* S.faecalis : Streptococcus faecalis 1 x 10<sup>10</sup>/Kg
- \* Cl.butyrnicum : Clostridium butyrnicum 1 x 10<sup>8</sup>/kg
- \* B.coagulance : Bacillus coagulance 1 x 10<sup>8</sup>/kg

나. 사육단계별 제제 제형 및 사용방법 구성

- 사육단계별로 난황항체 및 초유항체가 포함된 제제의 제형을 확정하였다.



그림 17. 사육단계별 난황항체 및 초유항체 포함 면역제제의 제형

5. 양돈장 질병발생 유형별 맞춤형 적용 프로그램 개발 및 보급

가. 면역제제 적용후 핵심병원체 감염 저감효과 분석

1) 초유면역항체제제를 이용한 자돈의 설사병 치료 및 예방 효과(A 농장)

- 모든 650두 규모의 포유자돈의 설사로 인해 폐사가 심한 일관사육농장을 대상으로 초유면역항체제제를 투여후 효능을 평가하였다. 이 농장의 사육 포유자돈의 설사분변 및 부검후 조직 검사 결과, PEDV가 상재화되어 있고, RotaV와 병원성 *E. coli*가 복합감염되어 있었다. 먼저 1일령 신생자돈에 대한 초유면역항체제제의 설사병 억제 효과 확인을 위해 분만사별로 투여군에는 1일령 자돈에 1일 2회씩 2ml의 초유제제를 2일간 직접 구강투여하였으며, 비투여군에서는 초유제제대신 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하고 1주일간 자돈의 생존두수를 조사하였다. 표 3과 같이 총 576두의 투여군에서는 1주일후 543두가 생존하여 생존율이 94.1%로 확인되었고, 총 492두의 비투여군에서는 86두가 생존하여 생존율이 17.5%로 조사되었다. 따라서 신생자돈구간에 PEDV, RotaV 및 병원성 *E. coli*가 복합감염되어 있는 농장에 초유제제 투여 시험결과 1주일간 자돈생존율 약 76% 향상되는 결과를 보임에 따라 본 제제가 신생 자돈의 설사병 치료 및 예방에 효과가 아주 있는 것으로 분석되었다.

표 24. 돼지유행성설사병, 돼지로타바이러스 및 병원성 대장균 복합감염농장의 신생자돈(1일령)에 대한 면역항체제제 투여후 생존율

구분	두수	1주일 생존두수	생존율(%)
투여군 <sup>1)</sup>	576	542	94.1
비투여군 <sup>2)</sup>	492	86	17.5

1) 초유제제 2ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

2) 식염수 2ml씩 1일 2회 2일간 경구투여



그림 18. 신생자돈 면역제제 투여군과 비투여군 비교 사진(A, B; 면역제제 비투여군, C; 면역제제 경구 투여, D; 면역제제 투여군)

- 또한 동일 농장의 1주령 돼지에 대하여 1두당 평균 20ml씩 섭취될 수 있도록 초유제제를 액상으로 제조하여 1일 1회씩 2일간 공급하고 이유시(21 ~ 28일령)까지 생존율을 조사하였다. 표 4과 같이 총 986두의 투여군에서는 이유시 846두가 생존하여 생존율이 88.8%로 확인되었고, 총 855두의 비투여군에서는 312두가 생존하여 생존율이 36.5%로 조사되었다. 따라서 포유자돈구간에 PEDV, RotaV 및 병원성 *E. coli*가 복합감염되어 있는 농장에 초유제제 투여 시험결과 이유시 자돈생존율 약 52% 향상되는 결과를 보임에 따라 본 제제가 포유 자돈의 설사병 치료 및 예방에 효과가 아주 있는 것으로 분석되었다.

표 25. 돼지유행성설사병, 돼지로타바이러스 및 병원성 대장균 복합감염농장의 포유자돈(1주령)에 대한 면역항체제제 투여후 생존율

구분	두수	이유시 생존두수	생존율(%)
투여군 <sup>1)</sup>	986	876	88.8
비투여군 <sup>2)</sup>	855	312	36.5

1) 초유제제 20ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

2) 식염수 20ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

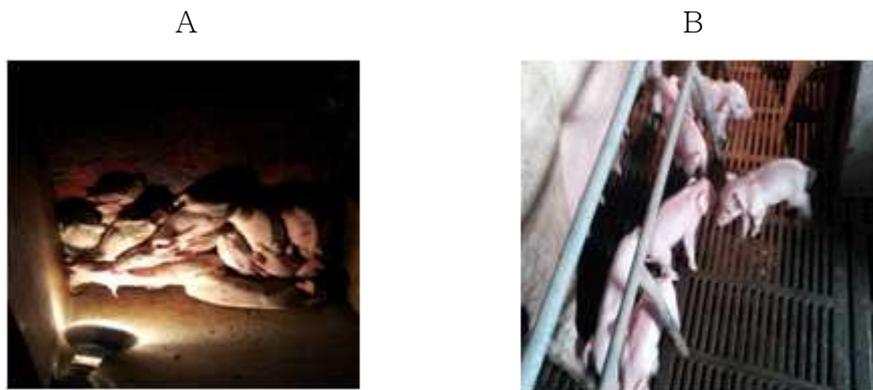


그림 19. 포유자돈 면역제제 투여군과 비투여군 비교 사진(A; 면역제제 비투여군, B; 면역제제 투여군)

## 2) 초유면역항체제제를 이용한 자돈의 설사병 치료 및 예방 효과(B 농장)

- 모돈 350두 규모의 포유 및 이유자돈의 설사로 인해 포유자돈 폐사와 이유자돈의 성장 정체로 피해를 보는 일관사육농장을 대상으로 초유면역항체제제를 투여후 효능을 평가하였다. 이 농장의 사육 자돈의 설사분변 및 부검후 조직 검사 결과, RotaV와 병원성 *E. coli*가 복합감염되어 있었다. 먼저 10일령 포유자돈에 대하여 초유면역항체제제를 1두당 평균 20ml씩 섭취될 수 있도록 초유제제를 액상으로 제조하여 1일 1회씩 2일간 공급하고 이유시(24일령)까지 생존율을 조사하였다. 표 5 과 같이 총 416두의 투여군

에서는 이유시 382두가 생존하여 생존율이 91.8%로 확인되었고, 총 345두의 비투여군에서는 196두가 생존하여 생존율이 56.8%로 조사되었다. 따라서 포유자돈구간에 RotaV와 병원성 *E. coli*가 복합감염되어 있는 농장에 초유제제 투여 시험결과 이유시 자돈생존율 약 35% 향상되는 결과를 보임에 따라 본 제제가 포유 자돈의 설사병 치료 및 예방에 효과가 아주 있는 것으로 분석되었다.

표 26. 돼지로타바이러스와 병원성 대장균 복합감염농장의 포유자돈(10일령)에 대한 초유면역항체제제 투여후 생존율

구분	두수	이유시 생존두수	생존율(%)
투여군 <sup>1)</sup>	416	382	91.8
비투여군 <sup>2)</sup>	345	196	56.8

1) 초유제제 20ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

2) 식염수 20ml씩 1일 2회 2일간 경구투여



그림 20. 포유자돈(10일령) 면역제제 투여군과 비투여군 비교 사진(A; 면역제제 비투여군, B; 면역제제 투여군)

- 또한 동일 농장의 4주령 돼지에 대하여 1두당 평균 30ml씩 섭취될 수 있도록 초유제제를 액상으로 제조하여 1일 1회씩 2일간 공급하고 투여 10일후 설사증상 발현 유무를 조사하였다. 표 6과 같이 총 315두의 투여군에서는 설사증상을 보이는 개체가 19두로 증상발현율이 6%로 확인되었고, 총 230두의 비투여군에서는 189두가 계속적으로 설사증상을 보여 증상발현율이 82.2%로 조사되었다. 따라서 이유자돈구간에 RotaV와 병원성 *E. coli*가 복합감염되어 있는 농장에 초유제제 투여 시험결과 설사증상이 약 76.2% 완화되는 결과를 보임에 따라 본 제제가 이유 자돈의 설사병 치료 및 예방에 효과가 아주 있는 것으로 분석되었다.

표 27. 돼지로타바이러스와 병원성 대장균 복합감염농장의 이유자돈(4주령)에 대한 면역항체제 투여후 임상증상 발현율

구분	두수	설사 발현두수 <sup>3)</sup>	발현율(%)
투여군 <sup>1)</sup>	315	19	6.0
비투여군 <sup>2)</sup>	230	189	82.2

1) 초유제제 20ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

2) 식염수 20ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

3) 투여 10일후 설사증상을 보이는 개체 두수



그림 21. 이유자돈(4주령) 면역제제 투여군과 비투여군 비교 사진(A; 면역제제 비투여군, B; 면역제제 투여군)

### 3) 초유면역항체제제를 이용한 육성돈의 설사병 치료 및 예방 효과(C 농장)

- 육성돈에서 병원성 *E. coli* 와 *S. typhimurium* 감염에 의한 설사로 문제되는 일관사육농장을 대상으로 초유면역항체제제를 투여후 효능을 평가하였다. 즉, 10주령 육성돈에 대하여 초유면역항체제제를 1두당 평균 40ml씩 섭취될 수 있도록 초유제제를 액상으로 제조하여 1일 1회씩 2일간 공급하고 투여 10일후 설사증상 발현 유무를 조사하였다. 표 7과 같이 총 180두의 투여군에서는 설사증상을 보이는 개체가 15두로 증상발현율이 8.3%로 확인되었고, 총 175두의 비투여군에서는 72두가 계속적으로 설사증상을 보여 증상발현율이 41.1%로 조사되었다. 따라서 육성돈구간에 병원성 *E. coli* 와 *S. typhimurium*가 복합감염되어 있는 농장에 초유제제 투여 시험결과 설사증상이 약 32.8% 완화되는 결과를 보임에 따라 본 제제가 육성돈의 설사병 치료 및 예방에 효과가 아주 있는 것으로 분석되었다.

표 28. 병원성 대장균과 살모넬라균 복합감염농장의 육성돈(10주령)에 대한 초유면역항체제제 투여후 임상증상 발현율

구분	두수	설사발현두수 <sup>3)</sup>	발현율(%)
투여군 <sup>1)</sup>	180	15	8.3
비투여군 <sup>2)</sup>	175	72	41.1

1) 초유제제 40ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

2) 식염수 40ml씩 1일 2회 2일간 경구투여

3) 투여 10일후 설사증상을 보이는 개체 두수

4) 초유면역항체제제를 이용한 자돈의 호흡기 치료 및 예방 효과(D 농장)

- 이유자돈에서 기침과 복식호흡 등의 호흡기 증상을 보이는 일관사육농장을 대상으로 초유면역항체제제를 투여후 효능을 평가하였다. 즉, 1일령 신생자돈에 대한 초유면역항체제제의 호흡기증상 억제 효과 확인을 위해 분만사별로 투여군에는 1일령 자돈에 1일 2회씩 2ml의 초유제제를 2일간 직접 구강투여하였으며, 비투여군에서는 초유제제대신 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하고 이유시(26일령) 자돈의 호흡기증상 발현 유무를 조사하였다. 표 8과 같이 총 580두의 투여군에서는 호흡기증상을 보이는 개체가 12두로 증상발현율이 2.1%로 확인되었고, 총 410두의 비투여군에서는 72두가 계속적으로 기침 및 복식호흡증상을 보여 증상발현율이 17.6%로 조사되었다. 따라서 자돈 구간에 호흡기 바이러스 및 세균이 복합감염되어 있는 농장에 초유제제 투여 시험결과 호흡기증상이 약 15.5% 완화되는 결과를 보임에 따라 본 제제가 자돈의 호흡기질환의 치료 및 예방에 효과가 있는 것으로 분석되었다.

표 29. 이유자돈에서 호흡기 질병이 있는 농장의 신생자돈(1일령)에 대한 초유면역항체제제 투여후 임상증상 발현율

구분	두수	호흡기증상 발현두수 <sup>3)</sup>	발현율(%)
투여군 <sup>1)</sup>	580	12	2.1
비투여군 <sup>2)</sup>	410	72	17.6

- 1) 초유제제 2ml씩 1일 2회 2일간 경구투여
- 2) 식염수 2ml씩 1일 2회 2일간 경구투여
- 3) 이유시(26일) 호흡기증상을 보이는 개체 두수

나. 질병발생 유형별, 연령별 면역제제 적용 프로그램 작성

- 면역제제 투여량 및 투여 방법에 따라 신생자돈용, 이유준비용, 이유자돈용 및 육성비육용제제로 구분하였고, 질병의 정도 및 지속기간에 따라 투여 회수를 산정하였다.

표 29. 돼지 연령별 면역제제 적용 프로그램

구분	신생돈	포유돈	이유돈	육성돈	비육돈	위축돈	투여 방법
신생자돈용제제(IC-F1)	√	√					개체별 경구투여용
이유준비용제제(IC-F2)		√				√	음수 혼합 투여용
이유자돈용제제(IC-F3)			↔			√	음수 혼합 투여용
육성비육용제제(IC-F4)				↔	↔	√	음수 혼합 투여용

해당구간 지속투여(↔), 해당구간중 일시 투여(√)

다. 돼지 사육구간별 면역제제 사용방법(설명서) 작성 및 보급

- 면역제제 사용의 편리성을 위해 사육 연령별 사용방법(설명서)를 작성하였다. 우선적으로 사용 빈도가 높을 것으로 예상되는 신생자돈용, 이유준비용, 이유자돈용 제제에 대하여 농가가 쉽게 사용할 수 있도록 간략한 설명서를 작성하여 보급하였다.

## 돼지 면역제제 사용 설명서

### [효능 및 효과]

#### 1. 자돈의 설사, 호흡기 질병의 예방과 치료

- 돼지에서 유행성설사병(PEDV), 전염성위장염(TGEV), 로타바이러스증(RotaV), 병원성대장균증(E.coli), 살모넬라증(S. typhimurium) 등으로 인한 설사병 예방 및 치료
- 돼지에서 써코바이러스감염증(PCV2), 연쇄상구균증(S. suis), 글래씨병(H. parasuis), 파스튜렐라성폐렴(P. multocida), 유행성폐렴(M. hyopneumoniae) 등으로 인한 호흡기질병 예방 및 치료

#### 2. 자돈의 체질강화 및 발육 촉진

- 성장인자 공급을 통한 자돈의 체질강화와 성장발육의 촉진으로 조기출하를 통한 사육비 절감

### [신생자돈용(IC-F1), 25g/통]

#### 1. 분말 용해

- IC-F1 분말병(25g/병)에 미지근한(37~40°C) 먹는 물 45ml을 부어 흔든 후, 물 45ml을 추가로 부어 충분히 흔들어서 잘 녹임
  - ☞ 찬물을 사용하면 잘 녹지 않을 수 있음
  - ☞ 물에 녹인 IC-F1 용액에 뜨는 소량의 부유물은 유지방 성분이며, 이는 정상적인 현상으로 효과에 영향을 주지 않음
  - ☞ 물에 녹인 IC-F1 용액을 상온에 보관하는 경우 효과가 저하되고, 쉽게 변질될 수 있으므로, 즉시 모두 사용하여야 하며, 만약 투여 후 다량의 IC-F1 용액이 남은 경우에는 냉장(약 4°C) 보관하고 48시간 이내에 사용해야 함
  - ☞ 냉장보관된 IC-F1 용액은 미지근하게(37~40°C) 데운 후 충분히 흔들어서 사용
- IC-F1 용액은 펌프 용기나 주사기를 사용하여 구강으로 투여함

#### 2. 용법 및 용량

- 분만직후(1일령) 3시간 이내 두당 2ml씩 경구투여하고, 6시간 후 2ml 투여 → 2일령에 6시간 간격으로 2회 경구투여(총 4회 8ml 경구투여)
- 2일간 투여 후에도 설사가 계속되는 포유자돈은 별도로 두당 4ml를 1회 추가 투여

### [포유자돈용(IC-F2), 100g/통]

## 1. 분말 용해

- IC-F2 분말병(100g/병)을 미지근한(37°C~40°C) 먹는 물 5liter에 부어 충분히 저어서 잘 녹임

## 2. 용법 및 용량

- 3일령부터 이유전까지 mamma급이통을 이용하여 1두당 20ml 정도 섭취하도록 1일 3회 3일정도 급여
- 3-5일령의 어린 포유자돈 설사발생시 IC-F1 경구투여 가능

### [이유자돈용(IC-F3), 150g/통]

## 1. 분말 용해

- IC-F3 분말병(150g/병)을 미지근한(37°C~40°C) 먹는 물 10liter에 부어 충분히 저어서 잘 녹임

## 2. 용법 및 용량

- 이유자돈 두당 200ml 정도 섭취하도록 1일 3회 3일정도 급여
- 3일간 공급하고, 추가로 위축돈 발생시 따로 격리하여 1일 2회 2일간 추가 투여

### [사용시 주의사항]

1. 신생포유자돈이 초유섭취전후 관계없이 분만후 빠른시간내에 투여할수록 장간막을 통한 항체흡수가 높아지므로, 분만직후 3시간 이내에 가능하면 신속히 IC-F1용액 2ml를 구강으로 투여한다.
2. 구강으로 정확하게 투여하고 정량이 제대로 섭취되었는지 분명히 확인한다.
  - 강제로 잘못 투여하여 기관지로 들어가면 이물성폐렴으로 폐사될 수 있다.
  - 정량이 섭취되지 않고 흘러나오거나, 구토한 경우 효과가 없으므로 추가로 투여한다.
3. 음수통(급여통)은 여러마리가 동시에 먹을 수 있는 것을 사용하며, 넘어져 쏟아지지 않도록 견고하게 고정하여야 한다. 만약 한마리씩 단독으로 섭취하는 방식의 밸브식 자동급수기를 사용하는 경우 위축돈(허약자돈)은 먹을 수 없게 되며, 밸브 막힘 및 잔여 용액의 부패 등이 발생할 수 있다.
4. 위축돈(허약자돈)이 정상자돈에 밀려서 충분히 섭취를 못하거나, 심하게 위축된 경우에는 IC-F3를 투여해도 잘 먹지 않으므로 위축돈만 따로 격리하여 급여하고 관리하는 것이 중요하다.
5. 처음 급여할 때는 음수를 1~2시간 단수시킨 후 용액을 급여하면 쉽게 스스로 섭취한다.(2차 투여부터는 절수하지 않아도 맛을 알고 잘 먹는다.)

<제2협동>

동물질병제어를 통한 축산식품 유래 위해물질 제어기술 개발

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동물질병제어를 통한 축산식품 유래 위해물질 제어기술 개발”의 보고서로 제출합니다.

2104년 9월 17일

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 윤 희 정

연 구 원 : 박 영 경

연 구 원 : 김 대 호

연 구 원 : 송 재 원

연 구 원 : 정 연 수

연 구 원 : 신 숙

## 요 약 문

I. 제 목 : 동물질병제어를 통한 축산식품 유래 위해물질 제어기술 개발” 에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 항생제 대신 사용할 수 있는 대체물질 혹은 면역 증강물질의 개발을 통한 생산성 증대
- 항생제 대체물질을 함유한 사료첨가제의 상품화를 통해 농가 질병 제어에 기여
- 안전한 축산물 생산 기반 구축 및 축산업의 세계시장 경쟁력 확보

III. 연구개발 내용 및 범위

- 동물질병제어를 통한 축산식품 유래 위해물질 제어기술 개발
  - 국내 축산 현장의 병원성 세균 및 지표세균의 오염 실태 분석
  - 축산물 유래 주요 세균의 항생제 내성실태 조사 및 내성 유전자 · 병원성 유전자 분석
  - 축산 현장에서 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석 및 예방 대책을 위한 가이드라인 확립
  - NK34의 항균력 측정
  - 알칼리미네랄/ 천연미네랄/ 혼합제제 비특이 면역물질의 면역 증강 효과 확인
  - 산업화에 적용 가능한 후보물질 선택
  - 항생제 대체물질이 함유된 시제품 생산

IV. 연구개발결과

- 국내 양돈현장의 세균 오염 실태 조사
- 항생제 대체물질 후보균의 면역증강능력 평가
- 항생제 대체물질의 사료첨가제 시제품 생산

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 국내 양돈 현장 내 유해미생물 제어를 위한 항생제 대체물질의 사료첨가제로의 적용 및 산업화

## SUMMARY

Bacterial infection followed by viral infection make difficult to increase productivity and treat diseases of pig. It is necessary to control bacterial infection and antimicrobials resistant bacteria for decreasing swine wasting diseases. A total of 644 bacteria were isolated from pig nationwide. *E.coli* (80%) and *Enterococcus* spp. (75%) were the most frequently isolated bacteria. Generally, resistant rates of antimicrobials were high in  $\beta$ -lactam, tetracycline, and streptomycin. Enhancement of protective effect and stress relaxation of sow and feeding and management environmentally are necessary to control bacterial diseases. In the mixed materials (natural mineral nonspecific immunostimulator and 2<sup>nd</sup> material) fed-group, higher increases of weight were observed compared to the non-fed-group. Also, statistical increases of weight were observed after 7 weeks in the mixed materials fed-group. In immunecells, antigen-presenting cells of MHC class II and Memory T helper cells were expressed statistically high in the mixed materials fed-group. CD 4 lymphocytes were also increased after 7 weeks in the mixed materials fed-group. Therefore we selected the mixed materials as alternatives of antimicrobials and tried to commercialize. Feeding supplements containing alternatives of antimicrobials is expected an improvement of immunostimulating effect in pigs.

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성-----132

1. 연구배경
2. 연구목적

## 제 2 장 연구개발내용 및 방법

제1절 국내 양돈 현장의 병원성 세균 및 지표세균의 오염실태분석  
----- 133

1. 돼지분변 및 환경으로부터 샘플채취
2. 주요 분리 대상 세균 및 확진
3. 분리된 세균에 대한 주요 항생제 내성 프로파일

제2절 항생제 대체물질의 축산물 유래세균에 대한(in vitro) 항균스펙트럼 및 안정성 평가 ----- 140

1. Bacteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS) 물질 NK34의 항균능 측정
2. 알칼리 미네랄 비특이 면역물질 (Alkali mineral nonspecific immunostimulator)의 면역 증강 효과 확인
3. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimulator)의 면역 증강 효과 확인

제3절 항생제 대체물질의 사료첨가제로의 제조 ----- 143

1. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimulator)과 제 2 물질과의 혼합제제의 면역 증강 효과 확인

## 제 3 장 연구개발결과

제1절 국내 양돈 현장의 병원성세균 및 지표세균의 오염 실태 분석  
-----145

1. 돼지 분변 및 환경에서 주요 병원성 세균 및 지표세균 오염 현황
2. 분리된 세균에 대한 주요 항생제 내성 프로파일
3. 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자 분석
4. 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석 및 예방 대책을 위한 가이드라인 확립

제2절 항생제 대체물질의 축산물 유래 세균에 대한(in vitro) 항균 스펙트럼 및 안정성 평가 ----- 151

1. Bteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS) 물질 NK34의 항균능 측정
2. 알칼리 미네랄 비특이 면역물질 (Alkali mineral nonspecific immunostimulator)의 면역 조절에 의한 생산성 향상 효과 확인
3. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimulator)의 면역 조절에 의한 생산성 향상 효과 확인
4. 결론

제 3절 항생제 대체물질의 사료첨가제로의 제조 ----- 161

1. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimulator)과 제 2 물질과의 혼합제제의 면역 증강 효과 확인
2. 항생제 대체물질로서의 후보군 중에서 산업화에 적용 가능한 후보 선택
3. 천연미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제의 상품화
4. 결론

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 필요성

### 1. 연구배경

전 세계적으로 항생제 내성으로 인한 막대한 경제적인 손실이 야기되고 있으며, 항생제 내성 문제는 사람의 건강 및 생명과 직결되는 문제이기 때문에 항생제 내성을 줄이기 위한 새로운 접근 방법이 필요하게 되었다. 특히 축산 농가에서 동물용 항생제의 오·남용으로 초래되는 가장 중요한 문제는 내성균 출현으로 질병에 대한 치료효과를 저하시키는 것, 사람, 환경으로의 내성균 전파 및 축산물 위생에 관한 문제이다. 이러한 내성의 발생 없이 세균을 억제하기 위한 새로운 접근방법으로 대체항생물질의 하나인 박테리오파지 부각되고 있으며, 여러 가지 면역 증강물질을 사료첨가제로 이용하는 것이다.

### 2. 연구목적

바이러스나 세균으로 인한 가축 소모성 질환의 경우, 치료과정에서 2차적으로 발생하는 세균성 감염으로 인한 치료 효과 감소 및 항생제 내성 증가를 염려하지 않을 수 없다. 특히 국내 양돈 산업이 해결해야 할 가장 큰 문제로 대두되고 있는 돼지 소모성 질환과 이에 복합적으로 발생하는 다수의 세균성 질병에 대해 항생제 대신 사용할 수 있는 대체물질 혹은 면역 증강물질의 개발은 질병발생으로 인한 어려움을 호소하는 양돈 농가에 희소식이 아닐 수 없고, 더 나아가 안전한 축산물 생산 기반 구축 및 축산업의 세계시장 경쟁력 확보에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

## 제 2 장 연구개발 내용 및 방법

### 제 1절 국내 양돈 현장의 병원성 세균 및 지표세균의 오염 실태 분석

#### 1. 돼지 분변 및 환경으로부터 샘플 채취

##### - 분리 지역

경기, 경북, 강원 및 충북 등 전국 4개 지역 8곳 농장에서 샘플 채취

##### - 시료 채취

돼지의 분변, 돼지의 비강 및 농장 환경인 퇴비, 농장의 지하수 등에서 무균적으로 검체를 채취하여 목적하는 이외의 균의 오염을 방지하였으며, 채취된 시료는 4°C에 보관하여 실험실로 운반한 후 균의 분리 및 동정을 실시하였음

- 돼지 분변: 사육장 내에 있는 분변 및 동물로부터 직접 샘플을 취함
- 지하수: 2분 정도 흘러보낸 뒤 무균병에 채취

#### 2. 주요 분리 대상 세균 및 확인

##### - *Escherichia coli*

증균을 위하여 검체 25g을 225mL의 buffer peptone water(BPW)에 넣고 120초간 stomaching한 후 durhamn 관이 들어있는 2배의 유당 배지 10mL에 시험액 10mL을 가한 후 37°C에서 24시간 증균 배양함. 가스가 생성된 배양액을 Eosin methylene blue (EMB) agar 에 접종하여 37°C에서 18시간 배양함. 금속광택 또는 자주색 전형적인 콜로니를 선별하여 IMViC test를 수행하고 indole 양성(음성), methyl red 양성, vogus-proskauer 음성, citrate utilization 음성임을 확인한 colony는 16s rRNA를 PCR을 이용하여 확인하고 최종적으로 *E. coli*임을 확인함.

##### - *Enterococcus faecalis / faecium*

검체 25g을 225mL의 Enterococcal broth에 가한 후 37°C, 24시간 증균 배양함. Esculin의 이용여부에 따라 검게 변한 것을 양성으로 보고 증균 배양액을 Bile esculin agar에 희석 도말함. 37°C에서 24시간 배양 후 검은색의 전형적인 콜로니를 선택하여 gram (+), catalase (+), 6.5%NaCl 생육여부를 확인 한 후, Vitek 또는 PCR을 통해 최종 확인함.

##### - *Staphylococcus aureus*

증균을 위하여 검체 25g 을 225mL의 10% NaCl 이 첨가된 Tryptic Soy Broth에 가한 후 37°C, 24시간 증균 배양함. 증균 배양액을 Baird-Parker agar에 도말 하여 37°C, 24시간 배양한 후 검정색이며 opaque halo을 가진 colony을 선정하여, 그람 양성 균임을 확인함. 분리된 균주는 coagulase 양성이며 *nuc* gene을 확인한 균주를 *S. aureus*로 확

정함.

- *Salmonella* spp.

증균을 위하여 검체 25g을 Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (Oxoid) 10 ml에 접종하여 42°C에서 24시간 배양함. 증균 배양액 1 백금이를 취하여 Xylose Lysine Deoxycholate(XLD) agar에 도말하여 37°C, 24시간 배양하고, 생성된 colony 중 전형적인 검정색 집락을 선택하여 확인시험을 수행함. 확인시험은 TSI 사면배지의 사면과 고층부에 접종하고 37°C에서 18~24시간 배양하여 lactose, sucrose 비분해 (사면부 적색), 가스생성 (균열 확인) 양성 및 H<sub>2</sub>S (고층부 검은색) 양성인 균에 대하여 그람음성 간균임을 확인하고 urease 음성, Lysine decarboxylase 양성으로 살모넬라임을 확인함. PCR을 통해 *Salmonella* specific gene을 확인하여 *Salmonella* spp.임을 결정함.

- *Clostridium perfringens* / *difficile*

분변 샘플을 cycloserine cefoxitine fructose agar (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)에 접종하여 48-72시간 혐기성 배양을 시행한다. 의심되는 균주를 분리하여 아포염색(spore stain) 및 Vitek ANA 혐기성세균 동정카드 (bio-Merieux sa, Marcy l' Etoile, France)를 이용하여 동정한다.

- *Streptococcus suis*

분변 샘플을 혈액배지와 MacConkey 배지에서 37°C, 24시간 배양함. gram (+), catalase (+), 6.5%NaCl (-) 생육여부를 확인 한 후, Vitek 또는 PCR을 통해 최종 확진함.



그림 1. 양돈 현장에서의 주요 유해 미생물

- Vitek 및 PCR을 이용한 균주 동정 [7, 9, 10, 14]

축산물로부터 분리된 주요 미생물을 식품공전에 공시되어 있는 미생물 시험법에 따라 다음과 같이 분리하고 Vitek 및 PCR을 이용하여 최종 확인함.

### 3. 분리된 세균에 대한 주요 항생제 내성 프로파일

- 디스크 확산법을 이용한 항생제 내성 프로파일 조사

- ① 감수성시험 대상균주를 Mueller Hinton Broth (MHB)에 35℃, 2-6시간 동안 배양하여 균 농도를 McFarland No. 0.5로 조정한 후, 멸균면봉을 이용하여 Mueller Hinton Agar (MHA)에 도포한다. 균을 희석한 후 15분 이내에 접종하며, 균 접종 시 페트리디쉬를 60° 로 회전하면서 3회 도포.
- ② 평판을 3~5분간 말리고 15분 이내에 항생제 Disc를 dispenser로 접종.
- ③ 35℃에서 16~18시간 배양 후 균 억제대 (inhibition zone)의 크기를 관찰하여 내성 여부를 판정. 다만 Vancomycin, Oxacillin의 경우는 24시간 배양 후 내성여부를 판정.
- ④ CLSI의 기준에 따라 감수성의 범위를 판정 (표 1).
- ⑤ 정도관리(quality control)에는 표준균주 *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 ( $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor), *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 균주를 사용하여 CLSI에서 규정한 표준균주 허용범위와 비교.

표 1. Disk diffusion breakpoint according to CLSI

Antimicrobial agent	Disc potency	Breakpoint (mm)	Antimicrobial agent	Disc potency	Breakpoint (mm)
Amoxicillin/clavulanic acid 2:1(AmC)	20/10	≤13	Cephalothin (CF)	30μg	≤14
Ampicillin (AM)	10	≤13	Chloramphenicol(C)	30μg	≤12
Cefazolin (CZ)	30	≤14	Ciprofloxacin (CIP)	5μg	≤15
Ceftiofur (XNL)	30	≤17	Clindamycin (CC)	2μg	≤14
Cephalothin (CF)	30	≤14	Erythromycin (E)	15μg	≤13
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤15	Gentamicin (GM)	10μg	≤12
Chloramphenicol (C)	30	≤12	Oxacillin (OX)	1μg	≤10
Colistin (CL)	10	≤8	Penicillin (P)	10unit	≤28
Florfenicol (FFC)	30	≤14	Streptomycin (S)	10μg	≤11
Gentamicin (GM)	10	≤12	Tetracycline (TE)	30μg	≤14
Nalidixic Acid (NA)	30	≤13	Trimethoprim/Sulfamethoxazole(SXT)	1.25/ 23.75μg	≤10
Neomycin (N)	30	≤12	Vancomycin (VA)	30μg	≤14
Streptomycin (S)	10	≤11	Trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT)	1.25/23.75	≤10
Tetracycline (TE)	30	≤14	Carbamicillin (CB)	IPM	FOX

### 4. 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자 분석

1) *E.coli*의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자의 조사

○ ESBL 확인

- 항균제 감수성 시험에서 광범위 cephalosporine인 ceftazidime이나 cefotaxime에 중(intermediate) 혹은 내성(resistant)을 보이는 균을 대상으로 실험을 실시.

○ Quinolone 내성 유전자 확인

- Ciprofloxacin MIC  $\geq$  0.25  $\mu$ g/ml 또는 nalidixic acid MIC  $\geq$  16  $\mu$ g/ml 이상인 균주를 대상으로 plasmid 매개성 quinolone 내성 유전자인 qnrA, qnrB, qnrS 및 aac(6')-Ib 유전자형 및 plasmid매개성 efflux pump 유전자인 qepA 유전자의 존재 여부를 PCR로 조사.

- 시험균의 plasmid DNA를 추출하여 PCR의 template로 사용.

○ 주요 병원성 인자 확인 [1]

- 병원성과 관련이 있는 *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA*, *saa* gene에 대한 multiplex PCR을 시행

표 2. Sequence of the PCR primers used for detect of class A and C  $\beta$ -lactamases

Name	Target	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
TEM-F	TEM subtype	TCC GCT CAT GAG ACA ATA ACC	1058
TEM-R		ACG CTC AGT GGA ACG AAA AC	
SHV-F	SHV subtype	CGC CGG GTT ATT CTT ATT TG	1071
SHV-R		CCA CGT TTA TGG CGT TAC CT	
CTX-M1-F	CTX-M-1 cluster	CCG TCA CGC TGT TGT TAG G	782
CTX-M1-R		ACG GCT TTC TGC CTT AGG TT	
CTX-M2-F	CTX-M-2 cluster	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	832
CTX-M2-R		CAG AAA CCG TGG GTT ACG AT	
CTX-M8-F	CTX-M-8 cluster	GGC GCT GGA GAA AAG CAG	601
CTX-M8-R		GGT TTT ATC CCC GAC AAC C	
CTX-M9-F	CTX-M-9 cluster	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	862
CTX-M9-R		CCT TCG GCG ATG ATT CTC	
PER-F	PER subtype	CCT GAC GAT CTG GAA CCT TT	513
PER-R		TGG TCC TGT GGT GGT TTC	
GES-F	GES subtype	GTT AGA CGG GCG TAC AAA GAT AAT	903
GES-R		TGT CCG TGC TCA GGA TGA GT	
VEB-F	VEB subtype	TCG TAA AAA GGA TAT TAT TAG TAT TGT TAA GTT	562
VEB-R		AGT TTG TTC ATC GCT GTT GG	
TLA-F	TLA subtype	CGC GAA AAT TCT GAA ATG AC	992
TLA-R		AGG AAA TTG TAC CGA GAC CCT	
CMY1-F	CMY-1 cluster	GTC AGC GAG CAG ACS CTG TT	860
CMY1-R		TAG TTG CGR TTG GCC AGC	
CMY2-F	CMY-2 cluster	GCA GGC YAT TCC GGG TAT G	915
CMY2-R		GCY ACG TAG CTG CCA AAY CC	
DHA-F	DHA subtype	TGG TGG ACA GCA CCA TTA AA	976
DHA-R		ACA ATC GCC ACC TGT TTT TC	
ACC1-F	ACC-1 type	TAC CTG TCT GGC AGC AAC TG	930
ACC1-R		GTA GCC ACG CTT TTC GTC AT	

표 3. 병원성 유전자 확인을 위한 primer의 염기서열

Target gene	Primers	Oligonucleotide Sequences (5'-3')	Size (bp)
<i>stx1</i>	stx1-F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180
	stx1-R	AGAACGCCCCTGAGATCATC	
<i>stx2</i>	stx2-F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255
	stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
<i>eaeA</i>	eaeA-F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
	eaeA-R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>hlyA</i>	hlyA-F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	hlyA-R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
<i>saa</i>	Saa-F	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119
	Saa-R	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	

2) *Enterococcus* spp. 의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자의 조사 [5, 7, 8, 9, 14, 15]

○ *Enterococcs* spp.의 *van* gene 보유 여부

– VRE 검출을 위해 동물 유래 분리균주를 대상으로 Dutka-Malen 등 (2007)의 방법에 따라 *van* gene에 대한 PCR을 실시하여 *van* gene 보유 여부를 확인하였으며, 사용한 primer는 다음 표 4와 같음.

표 4. *van* gene 보유 여부 확인을 위한 PCR에 사용된 primer

Target	Primer sequence	Product size (bp)
<i>vanA</i>	F-GGGAAAACGACAATTGC	732
	R-GTACAATGCGGCCGTTA	
<i>vanB</i>	F-ATGGGAAGCCGATAGTC	635
	R-GATTTTCGTTCTCGACC	
<i>vanC1</i>	F-GGTATCAAGGAAACCTC	822
	R-CTTCCGCCATCATAGCT	
<i>vanC2</i>	F-CTCCTACGATTCTCTTG	439
	R-CGAGCAAGACCTTTAAG	

○ *Enterococcs* spp.의 *tet*(M), *tet*(L), *ermB* gene 보유 여부 [3, 13]

– 각각의 유전자에 대해 PCR을 실시하여 gene 보유 여부를 확인하였음.

○ *Enterococcs* spp.의 enterocin gene 보유 여부

– 각각의 유전자에 대해 PCR을 실시하여 gene 보유 여부를 확인하였음.

3) *Staphylococcus* spp. 의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자의 조사 [2]

○ *Staphylococcs* spp.의 *mecA* gene 보유 여부

– PCR을 실시하여 *mecA* gene 보유 여부를 확인하였음 (MRSA 확인-genotype).

- *S. aureus* 균주의 Pantone-Valentine Leukocidin (PVL) 및 staphylococcal enterotoxin 검출
  - 전체 *S. aureus* 균주에 대하여 PVL 독소 유무를 PCR을 이용하여 조사.
  - PVL 유전자 검출은 기존에 보고된 PCR 방법을 사용하며, 양성대조 검체로 *S. aureus* ATCC 25923을 사용.
  - staphylococcal enterotoxin 유전자 검출은 기존에 보고된 multiplex PCR기법을 사용하여 실시 (그림 8).

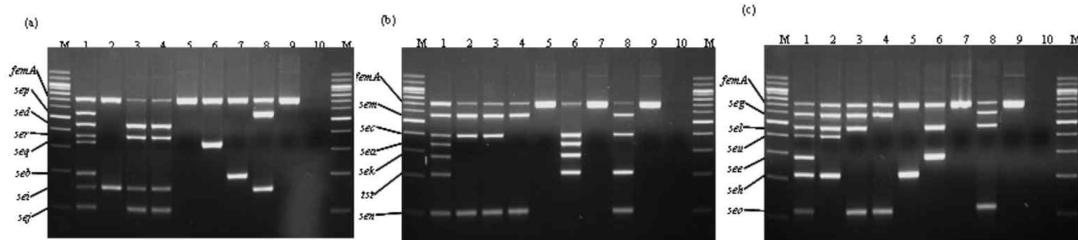


그림 2. 본 연구진이 확립한 SE sepcific multiplex PCR

#### 4) *Salmonella* spp. 의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자의 조사

○ *Salmonella* spp. 의 *blaTEM*, *blaOXA-1*, *blaPSE-1*, *blaCIT*, *tetA*, *tetB*, *tetG*, *aadA1*, *aadA2*, *aphA1*, *cmlA*, *carA1*, *floR*, *sul1*, and *intI1* gene 보유 여부를 각각의 유전자에 대해 PCR을 실시하여 gene 보유 여부를 확인하였음.

○ *Salmonella* spp. 의 *invA*, *spvC*, *pefA*, *rck* gene 보유 여부를 각각의 유전자에 대해 PCR을 실시하여 gene 보유 여부를 확인하였음 (표 6).

표 5. *Salmonella*의 병원성 유전자

Gene		Primer sequences		Size (bp)
<i>invA</i>	Invasion gene	F-(TTGTTACGGCTATTTTGACCA)	R-(CTGACTGCTACCTTGCTGATG)	521
<i>spvC</i>	Salmonella plasmid virulence	F-(CTATGAGCCAAGGTTTTTCAG)	R-(GTCTGACTCAGGACACTGTC)	392
<i>pefA</i>	Plasmid-encoded fimbriae	F-(GCGCCGCTCAGCCGAACCAG)	R-(GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG)	157
<i>rck</i>	Resistance to complement killing	F-(CTGACACCCATTCCGTGT)	R-(GTAACCGACACCAACGTT)	479

○ Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 이용한 유전적 상관성 확인

- *Salmonella* 균주로부터 DNA 분리.
- 10 mM Tris와 0.1 mM EDTA를 이용하여 Chromosomal-grade agarose (Bio-Rad)를 1.2%의 농도가 되도록 하여 *Salmonella* 균주의 DNA plug 제작
- Plug가 고체화된 후 lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0;

1% sarcosine; 1 mg proteinase K)에 16~20시간 동안 55°C에서 반응시킴

- Lysis buffer 제거 후 plug를 실온에서 증류수로 5분간 세척하고 TE (10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)로 5분간 세척
- Plug를 제한효소 *Xba*I (New England Biolabs)과 37°C에서 16~20시간 동안 반응시킴
- PFGE는 CHEF-mapper (Bio-Rad)를 이용하여 수행하였고, 조건은 다음과 같았음
  - Initial switch time: 2.2 s / Final switch time: 63.9 s
  - Gradient: 6.0 V/cm
  - Run time: 22 시간

#### 5) *Clostridium difficile* 의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자의 조사

##### ○ *Clostridium difficile*의 독소 A/B 유전자 검출

- 분변 샘플에서 균이 배양된 경우 독소 A 및 독소 B PCR 검사를 시행.

- 독소 A 유전자 : NK9 (CCA CCA GCT GCA GCC ATA)

NK11 (TGA TGC TAA TAA TGA ATC AAA ATG GTA AC)

1,200 bp 밴드가 관찰시, 독소 A 양성

700 bp 밴드가 관찰시, 독소 A 유전자 변이주

밴드가 관찰되지 않을시, 독소 A 음성으로 판정.

- 독소 B 유전자 : NK104 (GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C)

NK105 (CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC C)

205 bp의 밴드가 관찰시 양성으로 판정.

- PCR 결과의 독소 A 혹은 독소 B 하나라도 양성인 균주는 PCR 양성으로 간주하며, 배양 음성인 검체는 *C. difficile* 음성으로 독소 A 및 B 음성으로 간주.

#### 6) *Streptococcus suis* 의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자의 조사

##### ○ *Streptococcus suis* 의 *tet(w)*, *ermB* gene 보유 여부

각각의 유전자에 대해 PCR을 실시하여 gene 보유 여부를 확인하였음.

#### 5. 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석 및 예방 대책을 위한 가이드라인 확립

양돈 사육 농가를 대상으로 병원성 세균 및 지표세균의 오염현황 및 조사를 위한 시료를 채취. 돈사, 분뇨처리장, 사료 급여기, 음수 공급 시설에서 분뇨, 사료, 음용수 등을 채취하여 대상 세균 존재 여부 확인. 지속적인 모니터링을 통해 오염현황을 파악하고, 세균성 질병 제어를 위하여 주요 오염 요소 분석 및 발생 가능한 위해요소를 사전에 차단할 수 있는 사육 구조와 예방 대책을 위한 가이드라인 확립.

## 제 2절 항생제 대체물질의 축산물 유래 세균에 대한 (in vitro) 항균 스펙트럼 및 안정성 평가

### 1. Bacteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS) 물질 NK34의 항균능 측정

○ Spot-on-lawn assay를 이용한 NK34의 항균력 (activity unit; AU) 측정

- Indicator strains: 전국 4개 지역, 8개 양돈 농장에서 분리된 세균 - *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, *Pseudomonas* spp..

- Lactobacilli MRS agar (1.5% agar) 10mL을 페트리 디시에 분주하고, 굳힌 후 indicator 균주인 전국의 양돈 농장에서 분리된 세균을 MRS soft agar (0.8% agar)에 접종하여 overlay 하였다. overlay된 배지에 NK34를 5  $\mu$ L 씩 spot하고, 35°C, 24시간에서 배양하여 억제환을 확인하였다.

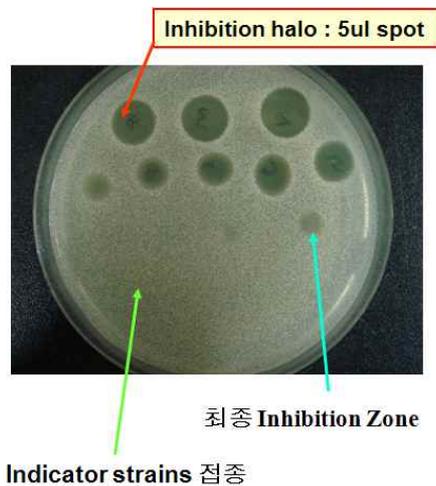


그림 3. Spot-on-lawn assay 예시 사진

### 2. 알칼리 미네랄 비특이 면역물질 (Alkali mineral nonspecific immunostimulator)의 면역 증강 효과 확인

#### 1) 알칼리 미네랄 비특이 면역물질

- 무색, 무취, 무독의 알칼리 용액 (pH 13-14)
- 규소, 칼륨, 나트륨, 유기탄소 화합물 및 은 등 여러 가지 복합 미네랄을 혼합하여 액상 이온화 시킨 물질

표 6. 알칼리 미네랄 비특이 면역물질의 성분

Ingredient	Amount
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	600 g
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	300 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	9 g
C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	q. s.*
AgNO <sub>3</sub>	q. s.
NaCl	q. s.
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	q. s.
H <sub>2</sub> O	1000 ml

\*q.s.: quantum satis

## 2) 실험설계

PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrom virus) 항체가 및 항원 검사를 실시하여 항체 및 항원이 모두 음성으로 나타난 4주령 20두의 이유자돈을 공시하여 8주 동안 실험을 진행하였다. 4주령부터 알칼리 미네랄 비특이 면역물질을 사료에 혼합하여 급이 하였으며(0, 0.0025, 0.05, 0.01 %), 일주일 단위로 임상증상을 체크하였으며, 성장률을 보기 위해 4, 7, 11주령에 체중을 측정하였다. 유세포 검사 (flow cytometry)를 위해 4, 7, 8, 9, 10, 11주령에 채혈을 하였다.

## 3) 임상증상

체온과 임상증상은 주단위로 기록하였다. 호흡기 질병 지수는 0 = 정상; 1 = 스트레스 시 가벼운 호흡곤란 또는 빈호흡; 2 = 가벼운 호흡곤란 또는 빈호흡; 3 = 스트레스시 중증도의 호흡곤란 또는 빈호흡; 4 = 중증도의 호흡곤란 또는 빈호흡; 5 = 스트레스시 심한 호흡곤란 또는 빈호흡; 6 = 심한 호흡곤란 또는 빈호흡으로 분류하여 기록하였으며 (Harbur *et al.* 1995), 스트레스는 채혈과 비강스왑 시 자돈을 보정할 때 보정자가 돼지의 다리를 붙잡는 것을 의미한다. 다른 임상증상(기침, 설사, 식욕부진, 무기력)은 따로 기록하였으며 호흡기 질병 지수에 반영하지 않았다. (Harbur *et al.* 1995. Comparison of the Pathogenicity of Two US Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates with that of the Lelystad Virus. *Vet Pathol* 32: 648-660)

## 4) 성장률

모든 시험돈은 4주령 (실험시작시점), 7주령, 11주령 (실험종료시점)에 개체별 체중을 측정하여 일당 증체량 (ADG, average daily gain)을 계산하였다.

## 5) 유세포 분석

혈액을 원심분리하여 buffy coat 층을 분리한 후, Ficoll(Sigma)에 증충한 후 1,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 혈장과 Ficoll과의 경계면에서 백혈구를 채취하여

PBS에 세척한 후, tryphan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 계수하여 최종  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 로 조절하였다. 백혈구 아집단 분석을 위해 백혈구 세포 표면분자 (Cell surface molecules)에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 분석하였다.

### 3. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimulator) 의 면역 증강 효과 확인

#### 1) 천연미네랄 비특이 면역물질

- 다공성 운모 광물질, 황토 광물
- 칼슘과 마그네슘, 나트륨, 칼륨 등의 무기질을 다량 함유

표 7. 천연 미네랄 비특이 면역물질의 성분

주요성분 (wt.%)		
구성성분	백색	황색
산화규소 $\text{SiO}_2$	66.14	52.01
산화알루미나 $\text{Al}_2\text{O}_3$	23.04	30.5
산화철 $\text{Fe}_2\text{O}_3$	1.31	2.3
티타늄 $\text{TiO}_2$	0.34	0.46
마그네슘 $\text{MgO}$	0.2	0.25
망간 $\text{MnO}$	ND	0.01
칼슘 $\text{CaO}$	0.01	0.01
나트륨 $\text{Na}_2\text{O}$	0.07	0.43
칼륨 $\text{K}_2\text{O}$	5.92	7.26
인산 $\text{P}_2\text{O}_5$	0.03	0.02
한계산소농도 L. O. I	3.02	4.49
Total	100.09	97.76

#### 2) 실험설계

항생제 대체물질로서 천연 미네랄 비특이 면역물질의 면역조절효과를 확인하였다. 4주령 28 두의 이유자돈을 공시하여 8주 동안 실험을 진행하였다 (Table 6). 2가지 종류의 사료를 사용하였고, 4주령부터 천연 미네랄 비특이 면역물질을 사료에 혼합하여 급여 하였다. 면역 증강제 급여일로부터 시험 종료일까지 성장률을 보기 위해 4주령 (급여 전), 5주령 (1주차), 7주령 (3주차), 9주령 (5주차)과 11주령 (7주차)에 체중을 측정하였고, 유세포 검사 (flow cytometry)를 위해 4주령, 5주령, 7주령, 9주령, 11주령에 채혈을 하였다.

표 8. 천연 미네랄 비특이 면역물질 실험 그룹

Group			No. of pig	Concentration of natural mineral (%)
천연미네랄	A	P 사료	7	1
무첨가	B	H 사료	7	1
천연미네랄	C	P 사료	7	1
첨가	D	H 사료	7	1

3) 성장률

모든 시험돈은 4주령 (실험시작시점), 7주령, 11주령 (실험종료시점)에 개체별 체중을 측정하였다.

4) 유세포 분석

혈액을 원심분리하여 buffy coat 층을 분리한 후, Ficoll(Sigma)에 중층한 후 1,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 혈장과 Ficoll과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS에 세척한 후, trypan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 계수하여 최종  $1 \times 10^7$ /ml로 조절하였다. 백혈구 아집단 분석을 위해 백혈구 세포 표면분자 (Cell surface molecules)에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 분석하였다.

### 제 3절 항생제 대체물질의 사료첨가제로의 제조

#### 1. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimuliator)과 제 2 물질과의 혼합제제의 면역 증강 효과 확인

1) 제 2 물질

- 유독성분을 제거 (법제)한 천연 광물질로서 순도 99.7%

2) 실험설계

항생제 대체물질로서 천연 미네랄 비특이 면역물질과 제 2 물질과의 혼합제제의 면역조절효과를 확인하였다. 4주령 12두의 이유자돈을 공시하여 8주 동안 실험을 진행하였다 (Table 6). 1가지 종류의 사료를 사용하였고, 4주령부터 천연 미네랄 비특이 면역물질을 사료에 혼합하여 급여 하였다. 면역 증강제 급여일로부터 시험 종료일까지 성장률을 보기 위해 4주령 (급여 전), 5주령 (1주차), 7주령 (3주차), 9주령 (5주차)과 11주령 (7주차)에 체중을 측정하였고, 유세포 검사 (flow cytometry)를 위해 4주령, 5주령, 7주령, 9주령, 11주령에 채혈을 하였다.

표 9. 천연미네랄 혼합제제 실험 그룹

Group	No. of pig	천연미네랄 (%)	제 2 물질 (%)
천연미네랄 혼합제제 비급여군	6	1	1
천연미네랄 혼합제제 급여군	6	1	1

### 3) 성장률

모든 시험돈은 4주령 (실험시작시점), 7주령, 11주령 (실험종료시점)에 개체별 체중을 측정하였다.

### 4) 유세포 분석 [4, 6, 11, 12]

혈액을 원심분리하여 buffy coat 층을 분리한 후, Ficoll(Sigma)에 중층한 후 1,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 혈장과 Ficoll과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS에 세척한 후, tryphan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 계수하여 최종  $1 \times 10^7$ /ml로 조절하였다. 백혈구 아집단 분석을 위해 백혈구 세포 표면분자 (Cell surface molecules)에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 분석하였다.

### 제 3 장 연구개발결과

#### 제 1절 국내 양돈 현장의 병원성 세균 및 지표세균의 오염 실태 분석

1. 돼지 분변 및 환경에서 주요 병원성 세균 및 지표세균 오염 현황

- 전국 4개 지역, 8개 농장에서 총 644개의 세균 분리
- *E. coli*와 *Enterococcus* spp.의 분리율이 각각 80%, 75%로 가장 높았다 (그림 4).

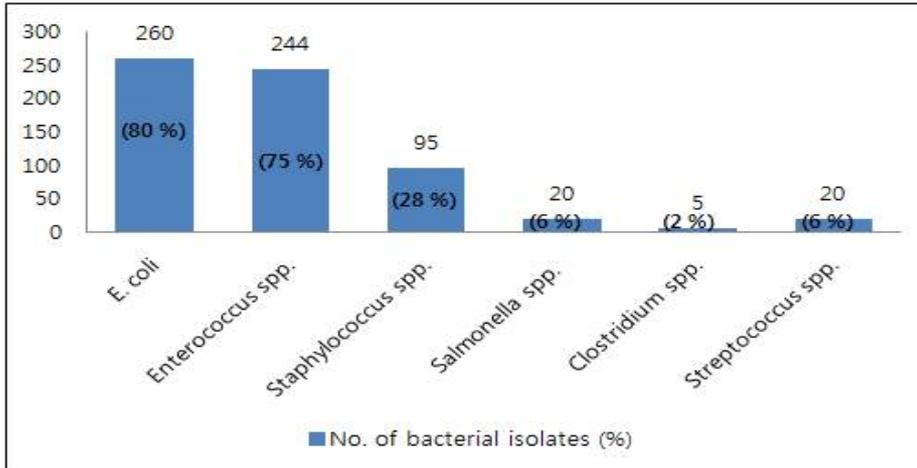


그림 4. 양돈현장에서의 세균 분리율

2. 분리된 세균에 대한 주요 항생제 내성 프로파일

1) *E. coli*

- *E. coli*는 ampicillin, carbenicillin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin 등에 비교적 높은 내성율을 보였다.
- amikacin과 imipenem에는 100% 감수성을 보였다 (그림 5).

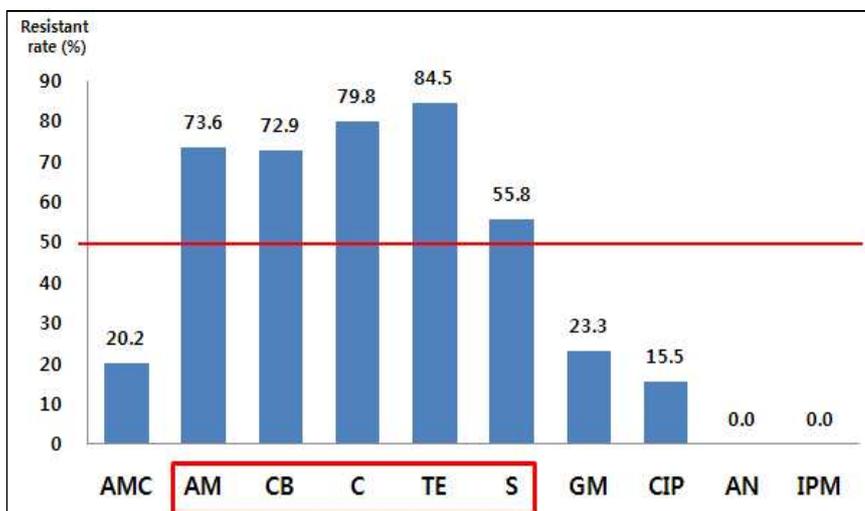


그림 5. *E. coli*의 항생제 내성률

2) *Enterococcus* spp.

- *Enterococcus* spp.는 tetracycline, quinupristin/dalfopristin (SYN)에 비교적 높은 내성율을 보이며, erythromycin과 고농도 streptomycin에 대한 내성률 또한 무시할 수 없는 수준이었다.
- *B*-lactam 계열인 Amoxicillin/clavulanic acid 에는 100 % 감수성을 보였으며, ampicillin과 penicillin에도 99 % 감수성을 보였다 (그림 6).
- VRE (vancomycin resistant enterococci)는 검출되지 않았다.

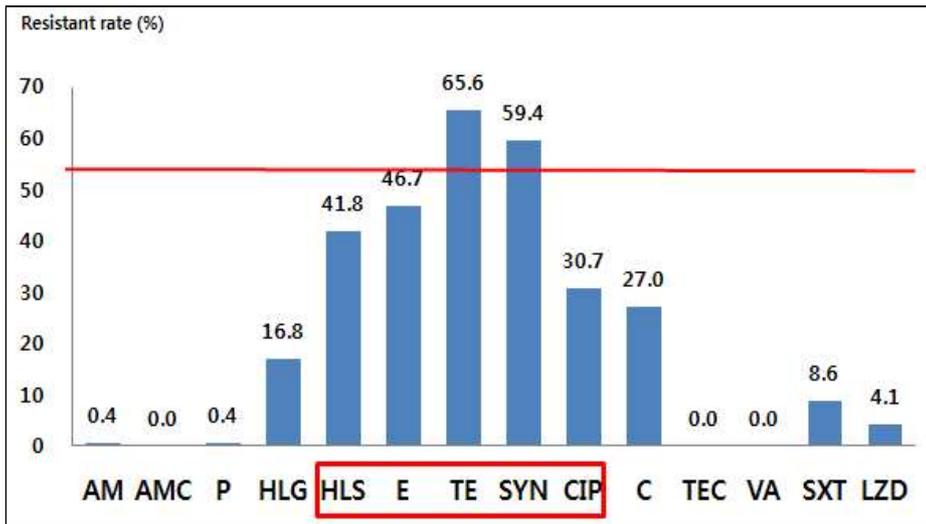


그림 6. *Enterococcus* spp.의 항생제 내성률

3) *Staphylococcus* spp.

- *Staphylococcus* spp.는 erythromycin과 clindamycin에 대한 내성률이 비교적 높은 편이었다 (그림 7).

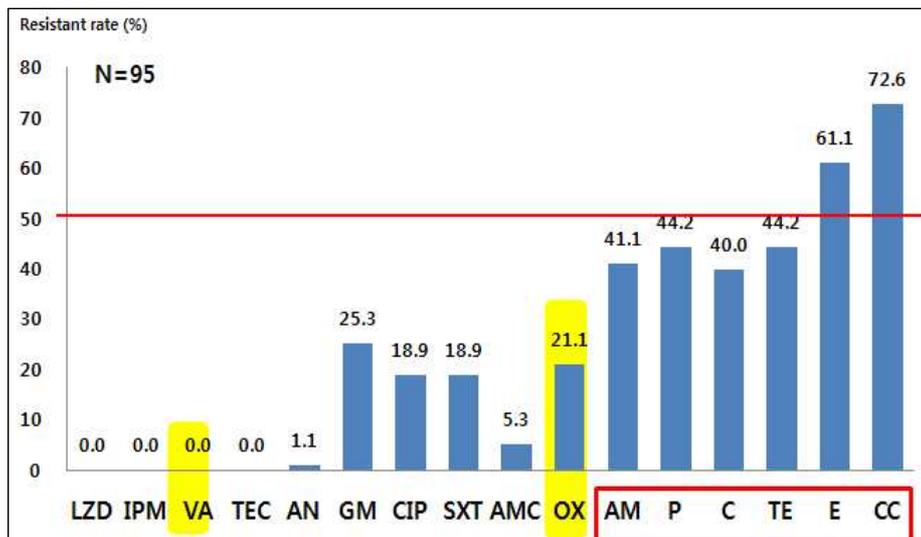


그림 7. *Staphylococcus* spp.의 항생제 내성률

- 항생제 디스크 검사 결과 Oxacillin에 내성인 균주가 21.1% 였다.

- Vancomycin에 내성인 *Staphylococcus spp.*는 없었음 (VRSA).

4) *Staphylococcus aureus*

- *Staphylococcus aureus*는 clindamycin, ampicillin, penicillin에 대한 내성률이 매우 높았으며, gentamicin, ciprofloxacin을 포함한 5종의 항생제에 대해 전체 *Staphylococcus spp.* 비해 (그림 7) 내성률이 확연히 높았다 (그림 8).

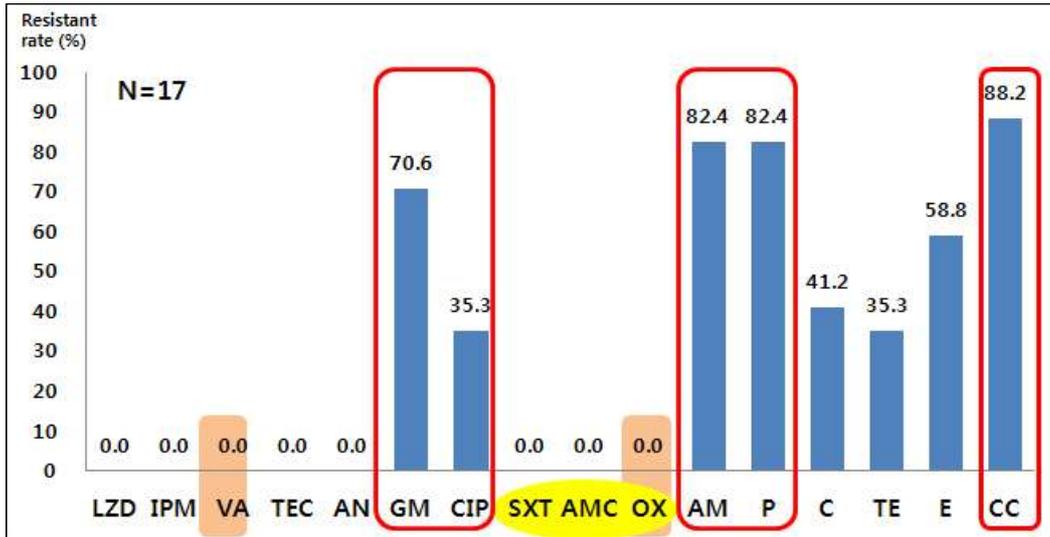


그림 8. *Staphylococcus aureus*의 항생제 내성률

- Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 는 나오지 않았다 (Oxacillin screening).
- Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) 역시 나오지 않았다.

5) *Salmonella spp.*

- *S. Typhymurium* 7주, *S. Paratyphi B* 6주, *S. Schwarzngrund* 6주, *S. Pomona* 6 주의 총 25주의 *Salmonella spp.*가 분리되었다.

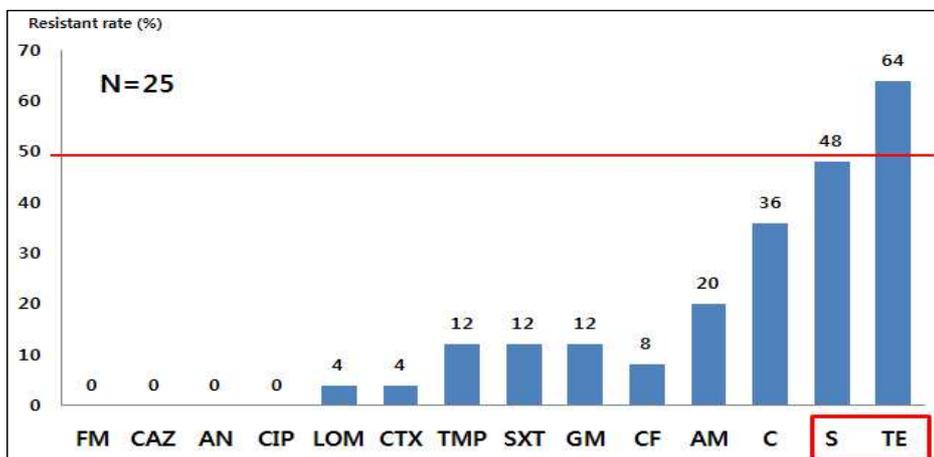


그림 9. *Salmonella spp.*의 항생제 내성률

- *Salmonella* spp.는 tetracycline 에 대한 내성률이 비교적 높았으며, streptomycin에 대한 내성도 무시할 수 없는 수준이다 (그림 9).

6) *Clostridium difficile*

- *Cl.difficile* (5주)은 Erythromycin과 Clindamycin 내성률이 높았다 (5/5).
  - 나머지 내성은 모두 이 균의 자연 내성이다 (그림 10).
- (자연내성이 높은 균이라서 문제가 되는 것임)

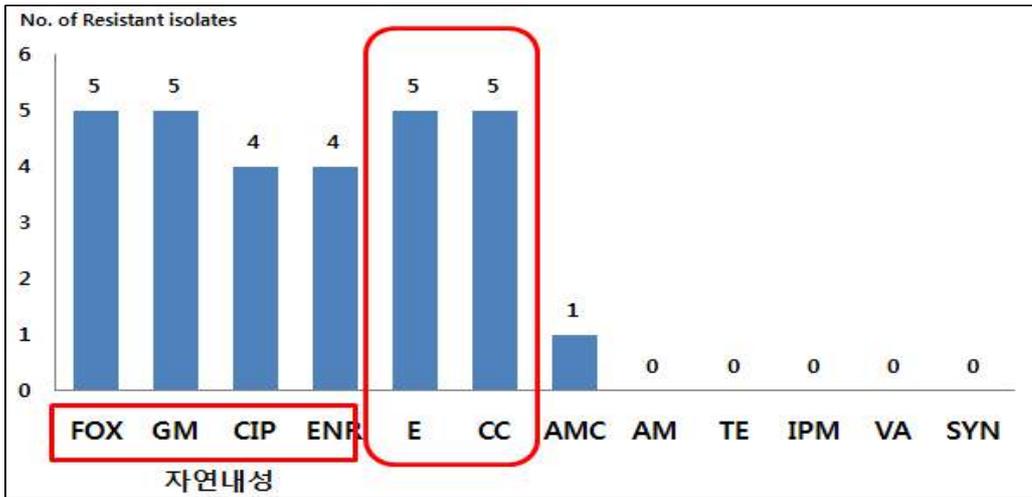


그림 10. *Clostridium difficile* 의 항생제 내성률

7) *Streptococcus suis*

- 20주의 *S. suis*가 분리되었다.

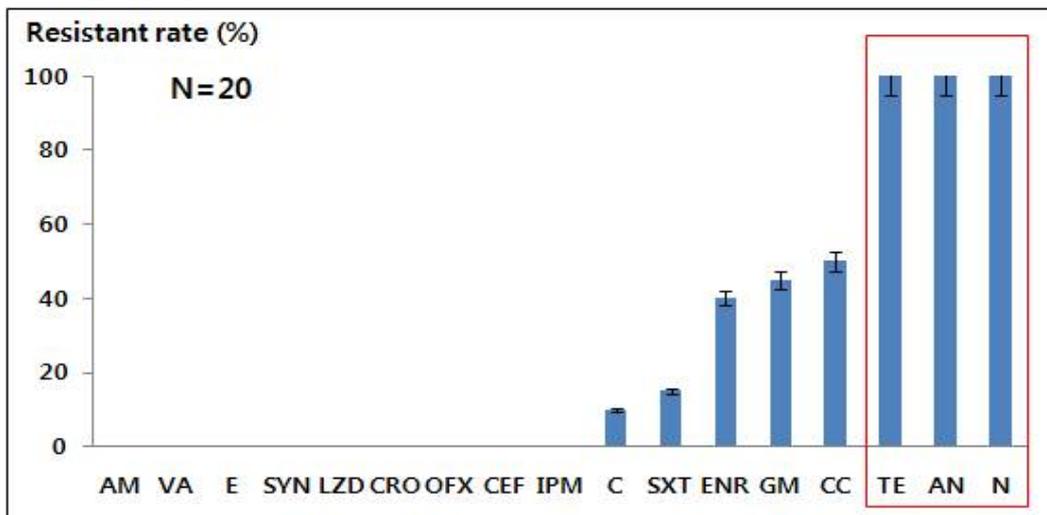


그림 11. *Streptococcus suis* 의 항생제 내성률

- *S.suis*의 경우 Tetracycline, Amikacin, Neomycin에 100% 내성을 보였고, Clindamycin에는 50%는 내성을 보였다 (그림 11).

### 3. 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자 분석

#### 1) *E.coli*

- ESBL은 검출 되지 않았다.
- Tetracycline내성률 (phenotype)이 84.5 %임에도, 내성 유전자 (genotype)는 검출 되지 않았다.
- Quinolone 내성 유전자의 검출되지 않았다.
- 병원성 유전자 (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA*, *Saa*) 역시 검출되지 않았다.

#### 2) *Enterococcus* spp.

- VRE는 검출되지 않았다.
- Tetracycline 내성률 (phenotype)이 65.6 % 였고, 내성 유전자 *tet(M)*, *tet(L)* gene genotype)를 보유한 세균이 각각 61.9 %, 51.6 % 였다 (그림 6, 그림 12).
- Erythromycin 내성률 (phenotype)이 46.7 % 였고, 내성 유전자 *ermB* gene genotype)을 보유한 세균이 46.7 % 였다 (그림 12).

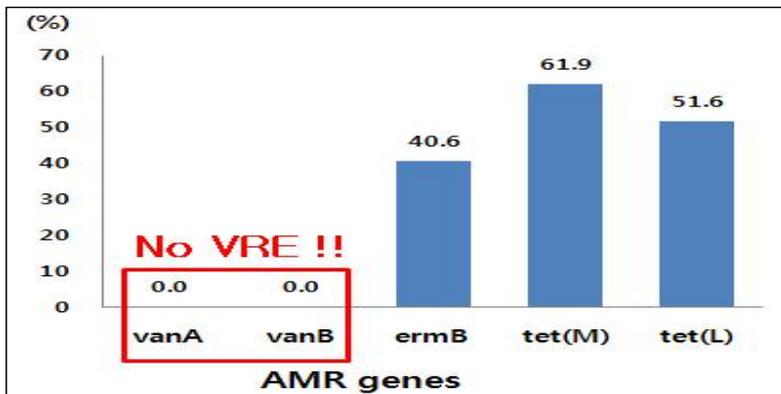


그림 12. *Enterococcus* spp.의 내성 유전자 보유 현황

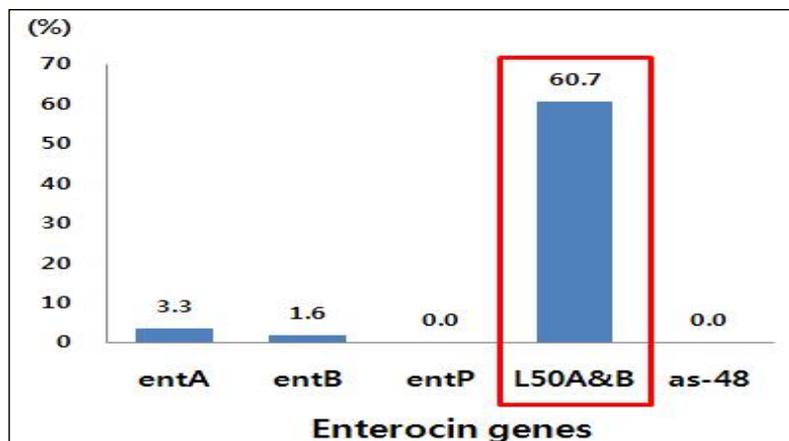


그림 13. *Enterococcus* spp.의 enterocin gene 보유 현황

- *Enterococcus* spp. 의 경우 분비되는 박테리오신을 엔테로신이라 하는데 엔테로신 관련 유전자를 탐색한 결과 L50A&B를 제외하고는 관련 유전자를 가지지 않았다. (그림13).

3) *Staphylococcus* spp.

- *mecA* gene을 보유한 균주가 9균주 (9.5 %) 검출되었다.

4) *Salmonella* spp.

- *blaTEM*, *aadA1*, *aphA1*, *cmlA* gene을 각각 20 %, 20 %, 4 %, 12 %의 분리율로 검출되었다.
- 병원성 유전자인 *invA*, *spvC*, *pefA*, *rck* gene을 보유한 균주는 검출되지 않았다.
- PFGE 결과는 serotype별로나 항생제 내성 패턴에 따라서도 큰 유전적 상관성을 보이지는 않았다 (*Salmonella* Pomona의 경우 모든 항생제에 감수성을 보이면서 PFGE pattern 역시 유사함을 알 수 있다).

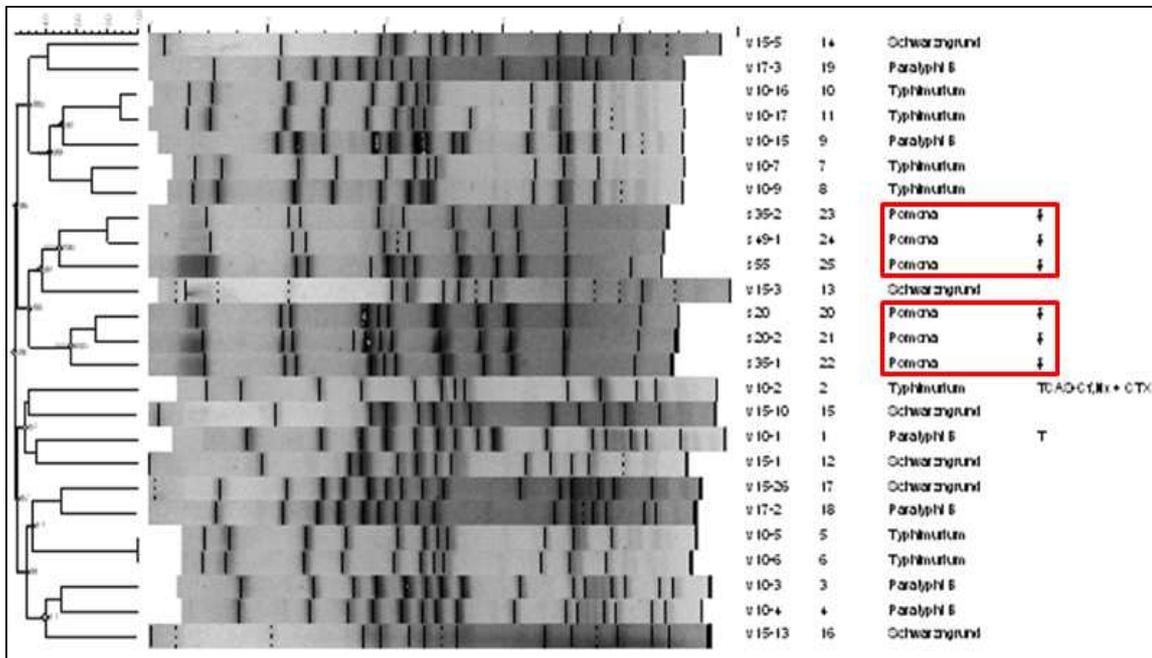


그림 14. *Salmonella* spp. 분리주의 PFGE pattern

5) *Clostridium difficile*

- 총 5개 균주 중 1균주를 제외하고 A, B toxin을 모두 갖고 있었으며, 5주 중 4주는 CDT positive였다.

6) *Streptococcus suis*

*Streptococcus suis* 의 *tet(w)*, *ermB* gene 보유 여부를 확인하였으나 검출되지 않다.

#### 4. 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석 및 예방 대책을 위한 가이드라인 확립

세균성 질병 제어를 위해 크게 성장 단계를 중심으로 각 단계마다 행해지는 작업공정과 노출되는 환경적 요소를 분석한 결과 모든의 면역력 증강 및 스트레스 완화가 곧 자돈에 전해질 면역력을 증가시키는 계기가 되어 세균 감염에 확률을 줄일 수 있으며, 환경적으로 사양관리가 잘 이루어져야 세균성 질병으로부터 멀어질 것으로 사료된다.

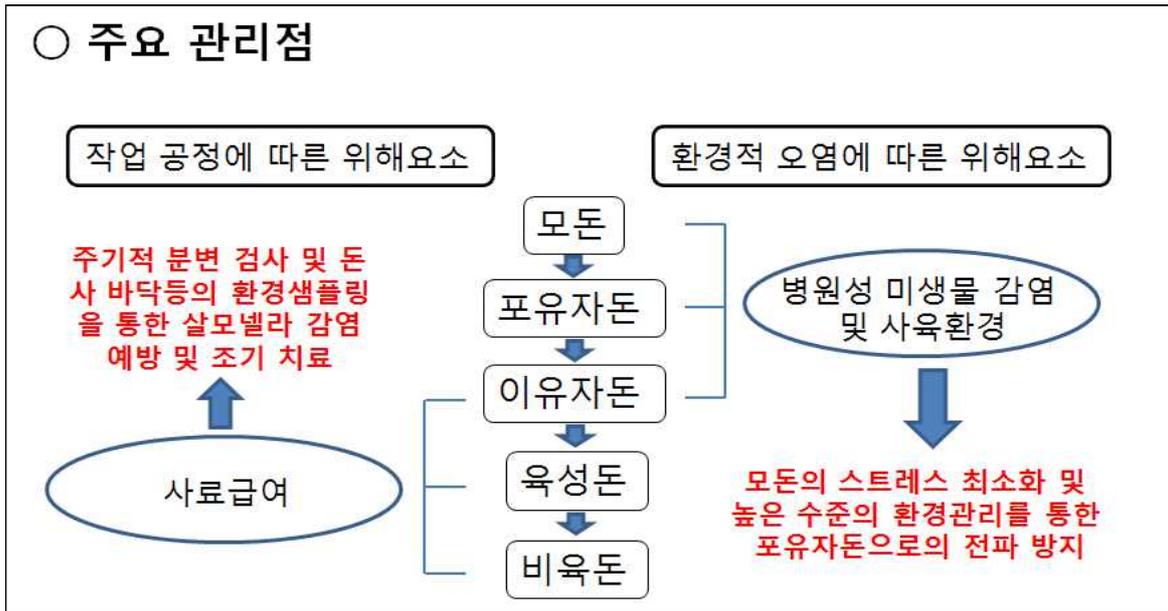


그림 15. 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석

#### 4. 결론

전국의 4개 지역의 8개 양돈 농장에서 총 644주의 세균이 분리되었고, *E. coli* 와 *Enterococcus* spp. 의 분리율이 80 %와 75 %로 가장 높은 비율을 차지하였다. 항생제 내성의 경우, 세균에 따라 차이가 있지만 전반적으로 b-lactam 계열 항생제와 Tetracycline, Streptomycin에 대한 내성이 높은 것으로 나타났다. 항생제 감수성 검사 결과와 유전자형에 있어서 유사한 경향을 나타내는 결과도 있었으나, 항상 일치 하는 것은 아니었다. 세균성 질병 제어를 위해서는 모든의 면역력 증강 및 스트레스 완화가 곧 자돈에 전해질 면역력을 증가시키는 계기가 되어 세균 감염에 확률을 줄일 수 있으며, 환경적으로 사양관리가 잘 이루어져야 세균성 질병으로부터 멀어질 것으로 사료된다.

### 제 2절 항생제 대체물질의 축산물 유래 세균에 대한 (in vitro) 항균 스펙트럼 및 안정성 평가

#### 1. Bacteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS) 물질 NK34의 항균능 측정

- NK 34의 항균력을 조사하기 위하여 돼지에서 분리된 원인균을 대상으로 항균력 테스트를 수행하였다. 표 10 에서 보는 것과 같이 그람 양성 균 중 *Staphylococcus aureus* 3주에서 항균력을 보였다 (17.7%). *Staphylococcus aureus*를 제외한 *Staphylococcus* spp. 에서는 25.6%의 항균력을 보였으며, 이 중에는 *mecA* gene을 갖는 methicillin resistance *Staphylococcus* spp. (MRS) 3주가 포함되며, MRS의 경우도 NK34에 저해됨을 확인할 수 있었다. 그러나 *Enterococcus* spp. 혹은 *Streptococcus* spp. 에서는 항균력을 보이지 않았다. 그람 음성 세균에 대한 항균력은 표 11에 나타난 것과 같이 항균력을 보이지 않았다.

표 10. 그람 양성 균주에 대한 NK34의 항균력

번호	그람 양성 균주	억제한 보인 균주/전체균주
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	3/17 (17.7%)
2	<i>Staphylococcus</i> spp.	20/78 (25.6%)
3	<i>Enterococcus</i> spp.	0/210 (0%)
4	<i>Streptococcus</i> spp.	0/20 (0%)

표 11. 그람 음성 균주에 대한 NK34의 항균력

번호	그람 음성 균주	억제한 보인 균주/전체균주
1	<i>Escherichia coli</i>	0/190
2	<i>Salmonella</i> spp.	0/25
3	<i>Clostridium difficile</i>	0/5
4	<i>Pseudomonas</i> spp.	0/5

- 이번 실험을 통해 NK34는 양돈 현장에서 분리된 세균 8종에 대해 주목할 만한 항균력을 보이지 않는 것으로 확인되었다. 그람 양성균에서는 항균효과를 확인할 수 있었고, 그 중에서는 일부 항생제 내성 유전자를 보유한 세균에서도 항균력을 보이는 것을 확인할 수 있었으나, 그 비율이 30%를 넘지 않았고, 또한 그람 음성균에서는 항균력을 보이지 않았다. 성장촉진을 위한 사료첨가용 항생제의 사용이 금지 되고 있는 양돈 현장에서 항생제 대신 사용할 수 있는 항생제 대체물질의 개발이 시급한 상황에서 NK34의 활용·적용 가능성이 낮은 것으로 사료된다.

## 2. 알칼리 미네랄 비특이 면역물질 (Alkali mineral nonspecific immunostimulator)의 면역 조절에 의한 생산성 향상 효과 확인

### 1) 임상증상

- 실험돈들은 PRRSV를 공격접종 한 7주령부터 호흡기 증상이 발생하였으며 8주령까지 호흡기 증상이 심해지다가 9주령부터 감소하였다. 7주령과 8주령에서 알칼리 미네랄 급여군들이 비급여군보다 호흡기 증상이 가볍게 나타났으며, 9주령, 10주령, 11주령에서 실험군간 호흡기 증상은 큰 차이가 없었다. 실험기간동안 발열, 부종, 발적과 청색증 등의 임상 증상은 관찰되지 않았다 (표 12, 그림 16).

표 12. PRRSV 공격 접종 후 그룹 별 호흡기 지수

Group		호흡기 지수 평균				
		7w	8w	9w	10w	11w
A	0 %	2±0.7	2.4±1.1	1.2±0.8	0.6±0.5	0.4±0.5
B	0.0025 %	1.4±0.5	1.6±1.3	0.8±1.3	0.4±0.5	0.2±0.4
C	0.005 %	1±0.7	1.4±1.1	1±1.2	0.4±0.5	0.2±0.4
D	0.01 %	1.2±0.8	1.2±1.1	0.8±0.8	0.4±0.5	0.4±0.5

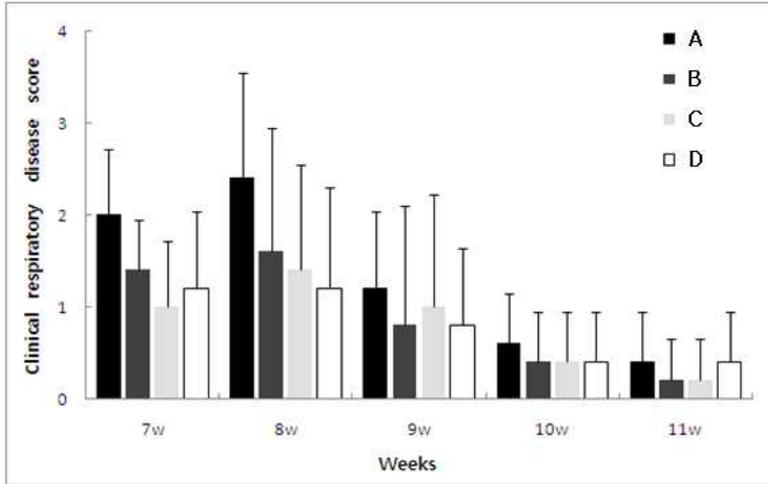


그림 16. PRRSV 공격 접종 후 그룹 별 호흡기 지수

2) 성장률

모든 시험돈은 4주령 (실험 시작 시점), 7주령 (공격접종 시점), 11주령 (실험 종료 시점)에 개체별 체중을 측정하여 일당증체량 (ADG, average daily gain)을 계산하였다 (표 13, 그림 17).

표 13. 공격접종 전 후 그룹별 일당 증체량

Group	ADG (kg/day)	
	4-7w	7-11w
A (0 %)	0.497±0.062	0.196±0.032 <sup>b</sup>
B (0.0025 %)	0.438±0.026	0.228±0.057 <sup>ab</sup>
C (0.005 %)	0.471±0.042	0.275±0.032 <sup>a</sup>
D (0.01 %)	0.429±0.040	0.262±0.039 <sup>a</sup>

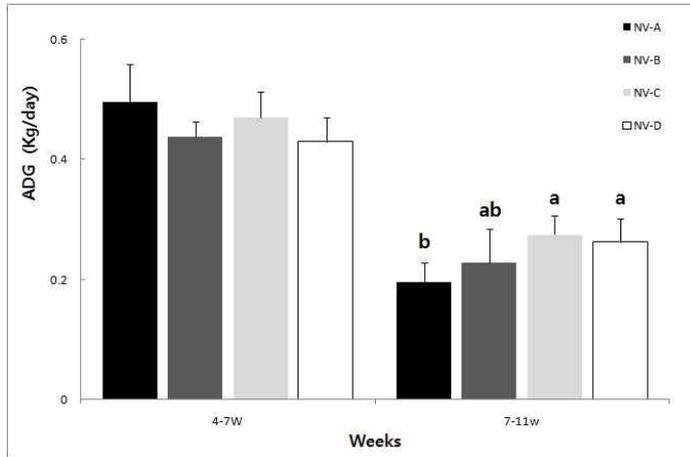


그림 17. PRRSV 공격 집중 전 후 그룹 별 일당 증체량

### 3) 유세포 분석

혈액을 원심분리하여 buffy coat 층을 분리한 후, Ficoll(Sigma)에 중층한 후 1500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 혈장과 Ficoll과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS에 세척한 후, trypan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 계수하여 최종  $1 \times 10^7$ /ml로 조절하였다. 백혈구 아집단 분석을 위해 백혈구 세포 표면분자 (Cell surface molecules)에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 분석하였다.

- 알칼리 미네랄 급여 여부와 관계 없이 4주령에서 9주령 사이에 cytotoxic T lymphocyte의 점진적인 증가 추세가 관찰 되었다. 시험 기간 중 실험군과 대조군 사이의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (그림 18).

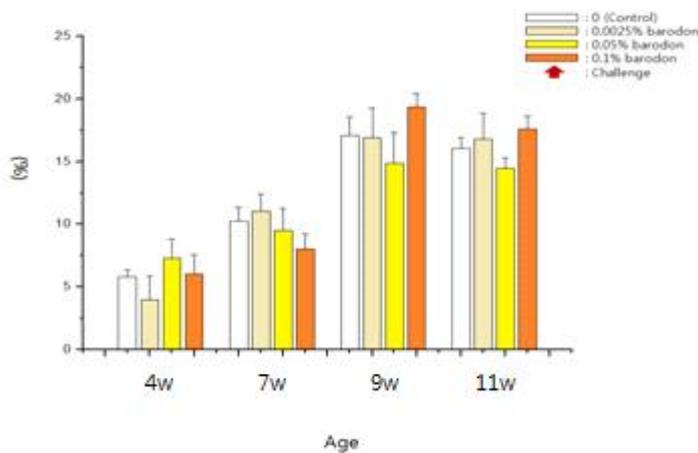


그림 18. Cytotoxic T lymphocyte (CD3+CD4-CD8+)

- 알칼리미네랄 급여와 관계 없이 4주령에서 11주령에 이르기까지 점진적인 증가 추세가 관찰 되었다. 시험 기간 중 실험군과 대조군 사이의 유의적인 차이는 관찰되지 않았으나 11주령에 알칼리미네랄 급여군의 memory T helper cell 비율이 대조군보

다 상대적으로 높은 경향을 관찰할 수 있었다 (그림 19)

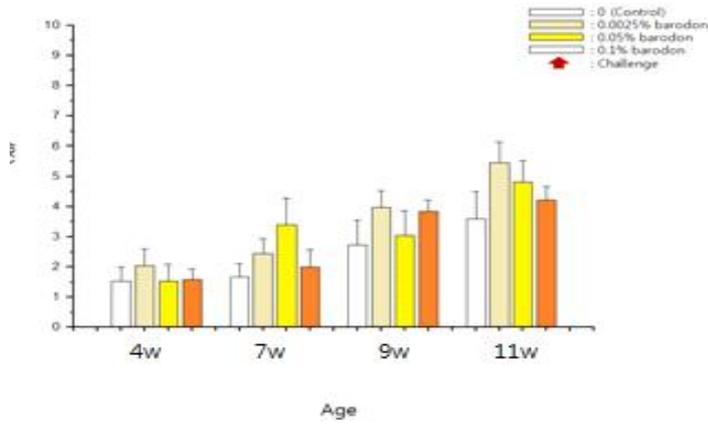


그림 19. Memory T helper cell (CD3+CD4+CD8+)

- 모든 군에서 3주령에서 8주령에 이르기까지 점차 감소하다가 11주령에 증가하는 추세가 관찰 되었다. 알칼리미네랄 0.05%와 0.1% 급여군에서 7주령에 naive T helper cell 비율이 유의적으로 높은 것을 관찰할 수 있었다 (그림 20)

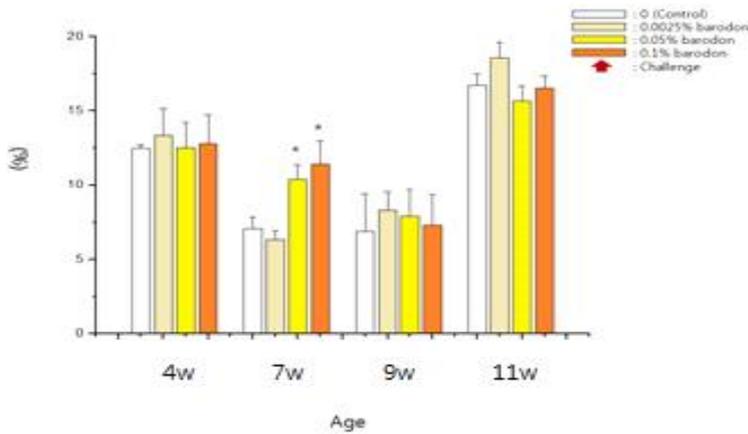


그림 20. Naive T helper cell (CD3+CD4+CD8-)

- 알칼리미네랄 0.05%와 0.1% 급여군에서 7주령에 B cell 비율이 유의적으로 높은 것을 관찰할 수 있었다 (그림 21).

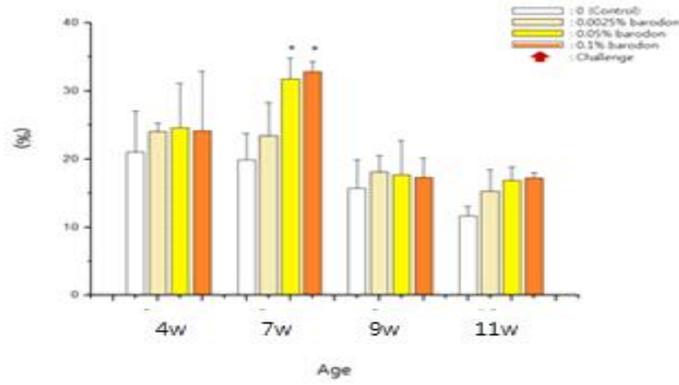


그림 21. B cell (CD3-CD21+)

-  $\gamma\delta$  T lymphocyte (CD3+ $\gamma\delta$ +CD8-)는 돼지에서 non-peptide antigen response와 일부 memory 기능이 있을 것으로 예상되는 백혈구로서, 백신 접종 4주 후인 11주령에서 알칼리미네랄 0.05% 급여군의 비율이 대조군을 포함한 다른 군에 비해 유의적으로 높은 것을 관찰할 수 있었다 (그림 22).

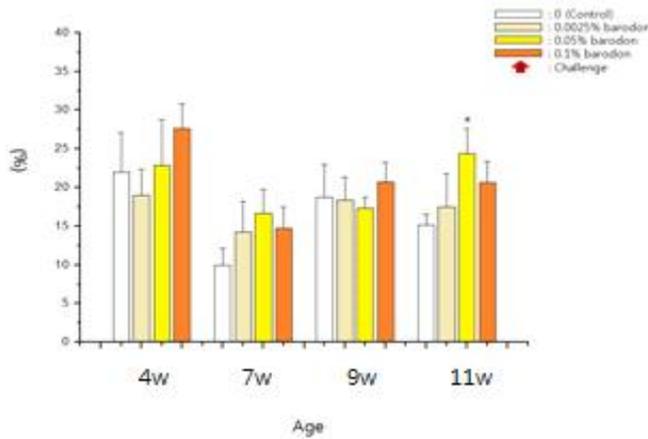


그림 22.  $\gamma\delta$  T lymphocyte (CD3+ $\gamma\delta$ +CD8-)

- 7주령과 9주령에서 각각 알칼리미네랄 0.05%와 0.1% 급여군의 비율이 대조군을 포함한 다른 군에 비해 유의적으로 낮은 것을 관찰할 수 있었다 (그림 23).

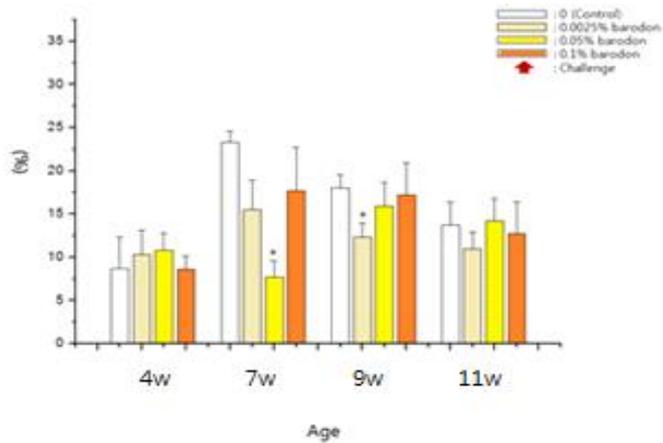


그림 23. NK cell (CD3-CD4-CD8+)

### 3. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimuli)의 면역 조절에 의한 생산성 향상 효과 확인

#### 1) 성장률

모든 시험돈은 4주령 (실험 시작 시점, 천연 미네랄 급여 전), 5주령 (천연 미네랄 급여 후 1주차), 7주령 (천연 미네랄 급여 후 3주차), 9주령 (천연 미네랄 급여 후 5주차)과 11주령 (천연 미네랄 급여 후 7주차)에 개체별 체중을 측정하였다 (표 14).

표 14. 그룹별 평균 체중

급여시기		A (P사료)	B (H사료)	C (P사료+ 첨가제)	D (H사료+ 첨가제)
급여전	0주차	9.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	9.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	9.6 ± 0.8 <sup>a</sup>
	1주차	10.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	11.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	11.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	11.7 ± 1.6 <sup>a</sup>
급여후	3주차	16.6 ± 2.1 <sup>a</sup>	19.1 ± 2.6 <sup>b</sup>	19.1 ± 2.6 <sup>a</sup>	18.5 ± 1.8 <sup>a</sup>
	5주차	23.9 ± 2.6 <sup>b</sup>	28.1 ± 3.5 <sup>b</sup>	28.1 ± 3.5 <sup>ab</sup>	29.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
	7주차	34.2 ± 2.5 <sup>b</sup>	37.5 ± 3.8 <sup>b</sup>	37.5 ± 3.8 <sup>ab</sup>	39.4 ± 1.3 <sup>a</sup>
Total		18.82 ± 9.6	21.12 ± 10.9	21.12 ± 10.9	21.66 ± 11.4

위첨자 <sup>a, b</sup>: P < 0.05

급여 전후로 모든 그룹에서 체중 증가량을 비교하였다. P사료의 경우 급여 전과 급여 후 5주차와 7주차 사이에 유의적인 체중 증가가 있었고, H사료의 경우 급여 전과 급여 후 3주차, 5주차와 7주차 사이에 유의적인 체중 증가가 있었다. 그러나 P사료와 H사료에 사료첨가제인 천연미네랄을 함께 급여한 경우, 급여하지 않은 경우보다 체중 증가폭이 높지만 각 그룹간의 유의적인 차이는 없었다.

- P사료와 P사료+천연미네랄 급여 후 1주차에서 3주차 사이에 체중의 증가가 관찰

되었다. 시험 기간 중 실험군과 대조군 사이의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (그림 24).

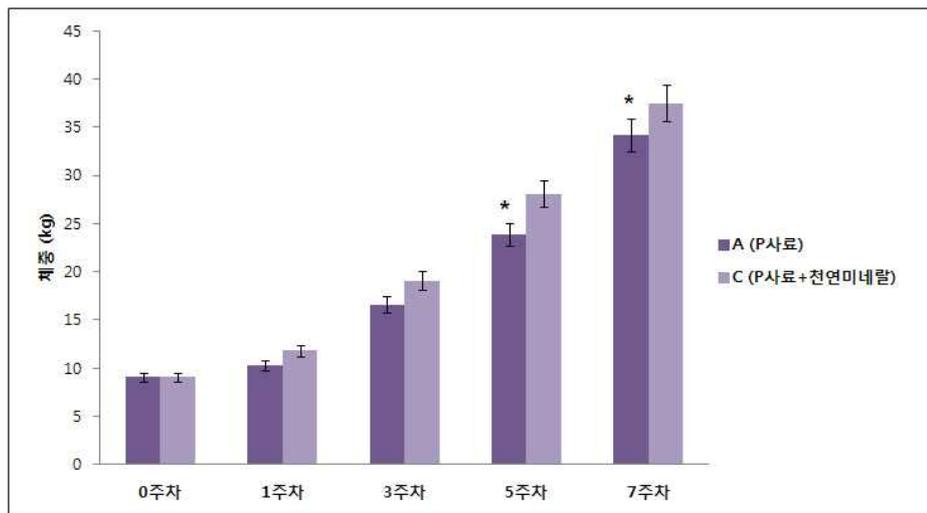


그림 24. 천연미네랄 급여 전후 그룹별 체중 비교 (P사료)

- H사료와 H사료+천연미네랄 급여 후 1주차에서 3주차 사이에 체중의 증가가 관찰되었다. 시험 기간 중 실험군과 대조군 사이의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (그림 25).

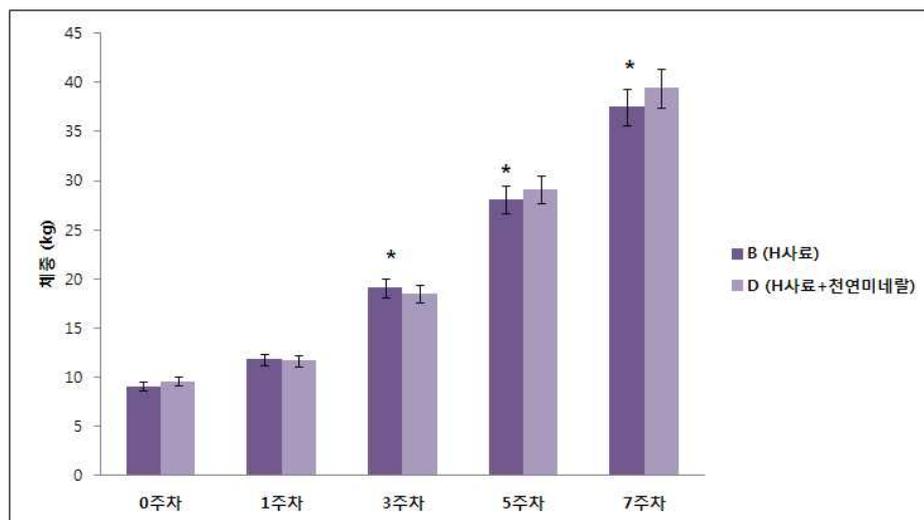


그림 25. 천연미네랄 급여 전후 그룹별 체중 비교 (H사료)

## 2) 유세포 분석

혈액을 원심분리하여 buffy coat 층을 분리한 후, Ficoll(Sigma)에 중층한 후 1500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 혈장과 Ficoll과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS에 세척한 후, trypan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 계수하여

최종  $1 \times 10^7/\text{ml}$ 로 조절하였다. 백혈구 아집단 분석을 위해 백혈구 세포 표면분자 (Cell surface molecules)에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 분석하였다.

- CD2의 경우 천연 미네랄 급여 전후 그리고 사료의 종류에 관계없이 증감의 경향이 관찰 되지 않았다. (그림 26).

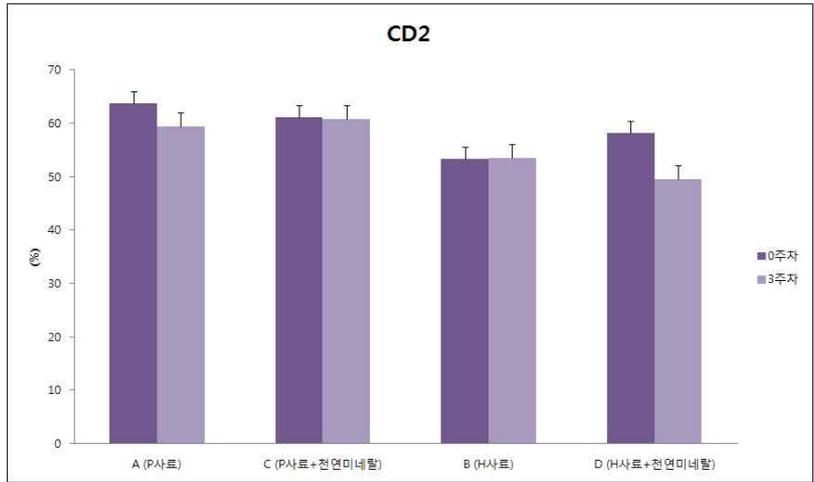


그림 26. CD2

- 천연 미네랄의 급여 여부와 관계 없이 0주차에 비해 3주차에서 B cell이 유의적으로 높은 것을 알 수 있었다. (그림 27).

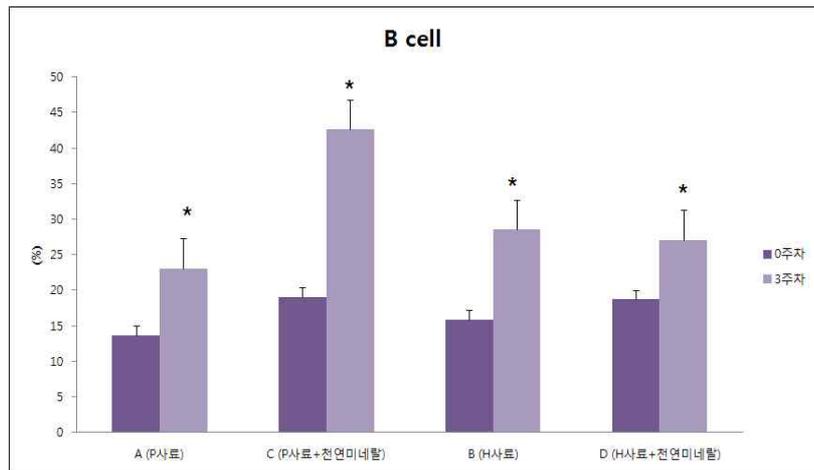
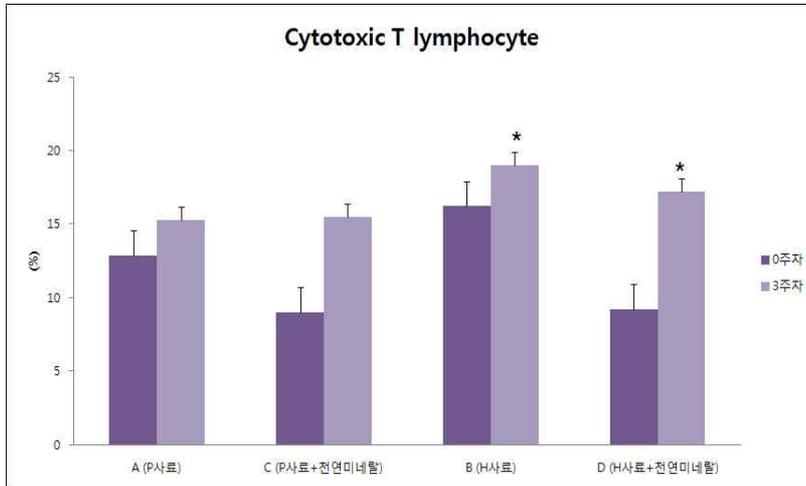


그림 27. B cell (CD3-CD21+)

- Cytotoxic T lymphocyte의 경우 H사료와 함께 천연 미네랄을 급여한 군에서 비급여군에 비해 유의적으로 증가함을 관찰할 수 있었다. (그림 28).

그림 28. Cytotoxic T lymphocyte (CD3+CD4-CD8+)

- CD4의 경우 천연 미네랄 급여 전후 그리고 사료의 종류에 관계없이 증감의 경향이



관찰 되지 않았다. (그림 29).

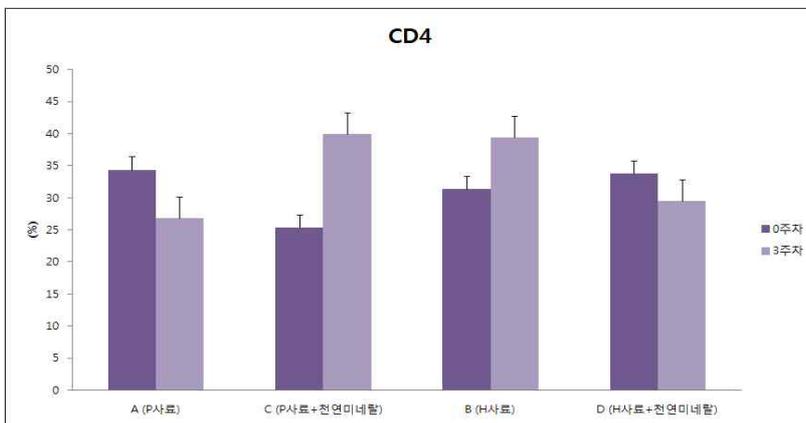


그림 29. CD4

- Naive T helper cell의 경우 천연 미네랄 급여 전후 그리고 사료의 종류에 관계없이 증감의 경향이 관찰 되지 않았다. (그림 30).

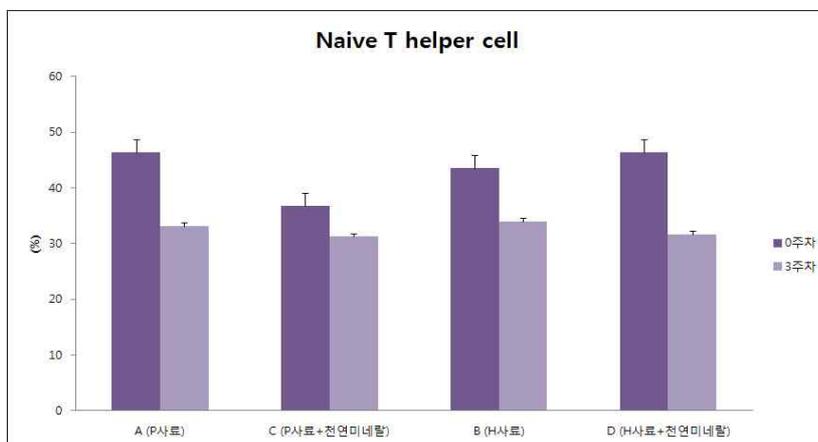


그림 30. Naive T helper cell (CD3+CD4+CD8-)

- Memory T helper cell의 경우 천연 미네랄 급여 전후 그리고 사료의 종류에 관계없이 증감의 경향이 관찰 되지 않았다. (그림 31).

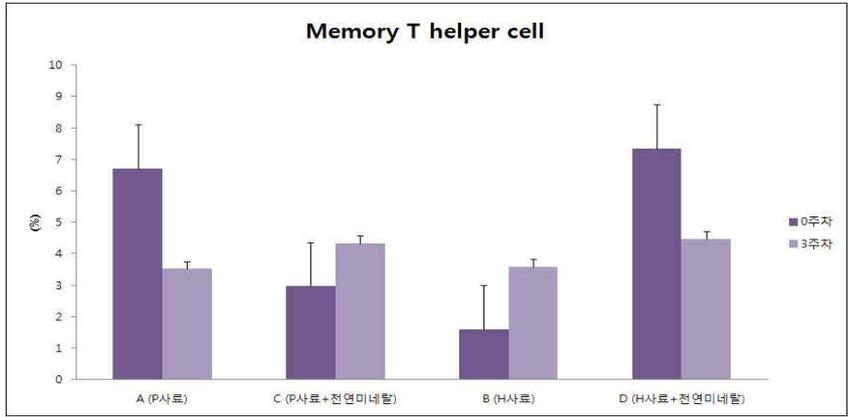


그림 31. Memory T helper cell (CD3+CD4+CD8+)

#### 4. 결론

이번 실험을 통해 Bacteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS) 물질 NK34는 양돈 현장에서 분리된 세균 8종에 대해 주목할 만한 항균력을 보이지 않는 것으로 확인되었다. 그람 양성균에서는 항균효과를 확인할 수 있었지만, 그 비율이 30%를 넘지 않았고, 또한 그람 음성균에서는 항균력을 보이지 않았다. 성장촉진을 위한 사료첨가용 항생제의 사용이 금지 되고 있는 양돈 현장에서 항생제 대신 사용할 수 있는 항생제 대체물질의 개발이 시급한 상황에서 NK34의 활용·적용 가능성이 낮은 것으로 사료된다.

알칼리 미네랄 비특이 면역물질의 경우, 성장률에는 PRRSV 공격접종 전후에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일부 생체 방어에 주요한 면역세포의 경우 유의적인 차이를 보이기는 하였으나, 현재 특정 동물에서 이미 사료첨가제로 이용 중인 관계로 본 연구에서는 후보물질로서 적합하지 못함을 확인 하였다.

천연 미네랄 비특이 면역물질의 경우, 실험기간 동안 급여군이 비급여군에 비해 체중 증가폭이 높았지만, 각 그룹간의 유의적인 차이는 없었다. 면역세포의 경우, 급여 후 7주차 까지 실험이 진행되었으나, 면역세포를 분석하는 기기 고장으로 5주차와 7주차의 실험을 진행하지 못해 면역증강능을 확인하지 못하였다.

### 제 3절 항생제 대체물질의 사료첨가제로의 제조

#### 1. 천연 미네랄 비특이 면역물질 (Natural mineral nonspecific immunostimulator)과 제 2 물질과의 혼합제제의 면역 증강 효과 확인

##### 1) 성장률

모든 시험돈은 4주령 (실험 시작 시점, 천연 미네랄 급여 전), 5주령 (천연 미네랄 급여 후 1주차), 7주령 (천연 미네랄 급여 후 3주차), 9주령 (천연 미네랄 급여 후 5주차)과 11주령 (천연 미네랄 급여 후 7주차)에 개체별 체중을 측정하였다 (표 15, 그림 32).

표 15. 그룹별 평균 체중

급여시기		천연미네랄 혼합제제 비급여군	천연미네랄 혼합제제 투여군
급여전	0주차	7.8±0.3 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.8 <sup>a</sup>
	1주차	12.1±1.2 <sup>ab</sup>	11.3 ± 1.3 <sup>a</sup>
	3주차	19±2.4 <sup>bc</sup>	19.5 ± 1.5 <sup>a</sup>
	5주차	28±3.4 <sup>c</sup>	29.3 ± 2.2 <sup>a</sup>
	7주차	37.8±4.1 <sup>cd</sup>	40 ± 2.8 <sup>b</sup>
Total		20.9 ± 2.1	21.6 ± 1.6

위첨자 <sup>a, b, c, d</sup>: P < 0.05

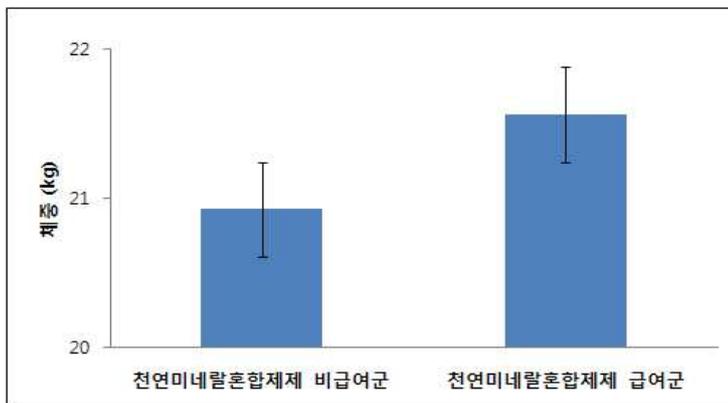


그림 32. 천연미네랄 혼합제제 급여군과 비급여군의 체중 비교

## 2) 유세포 분석

혈액을 원심분리하여 buffy coat 층을 분리한 후, Ficoll(Sigma)에 중층한 후 1500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 혈장과 Ficoll과의 경계면에서 백혈구를 채취하여 PBS에 세척한 후, trypan blue exclusion technique에 의해 생존세포수를 계수하여 최종  $1 \times 10^7$ /ml로 조절하였다. 백혈구 아집단 분석을 위해 백혈구 세포 표면분자 (Cell surface molecules)에 특이적인 단클론 항체를 이용하여 분석하였다.

- MHC I의 경우 천연 미네랄 혼합제제 급여와 관계없이 3주차까지 감소하다 5주차에 증가하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다 (그림 33).

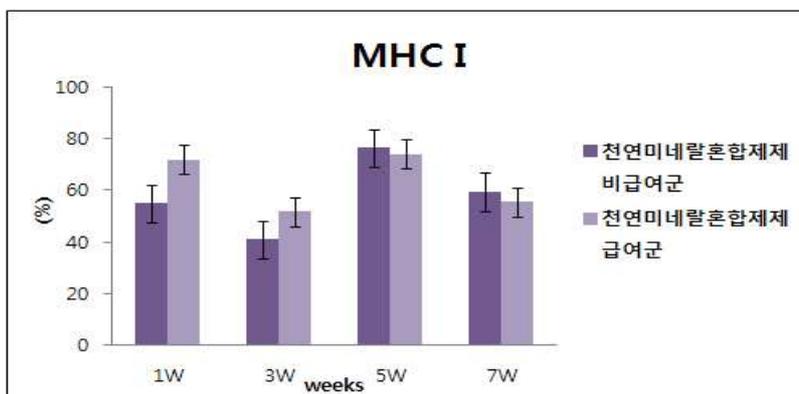


그림 33. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 MHC I

- MHC II의 경우 천연 미네랄 혼합제제 급여군이 비급여군에 비해 훨씬 높은 것을 알 수 있으며, 3주차의 경우 급여군에서 유의적인 차이를 보였다 (그림 34).

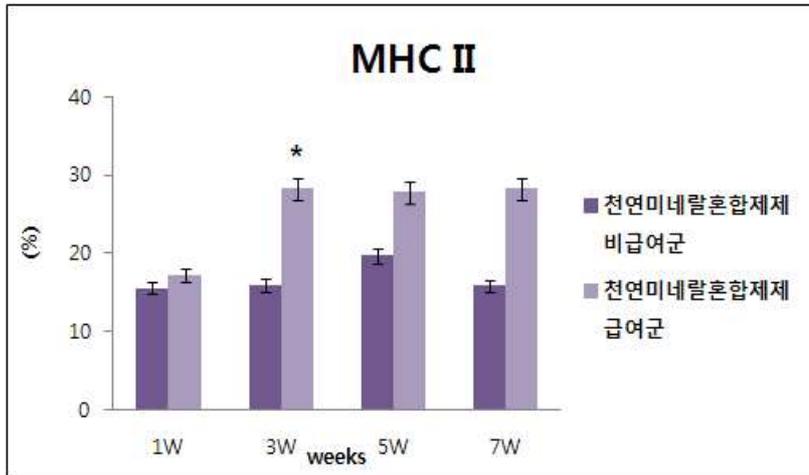


그림 34. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 MHC II

- CD2림프구의 경우 3주차에 감소하다 5주차가 되면서 급여전 보다 증가하는 것을 볼 수 있다. 천연 미네랄 혼합제제 급여군이 비급여군에 비해 높은 것을 알 수 있으나 유의적인 차이는 보이지 않았다 (그림 35).

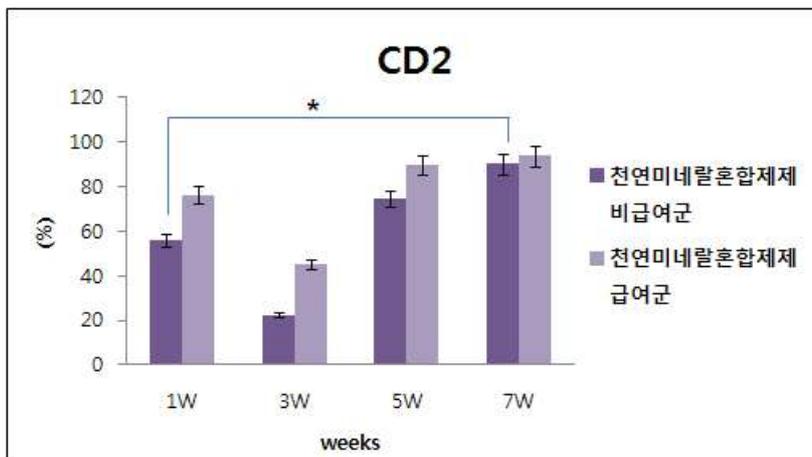


그림 35. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 CD2

- T 림프구 중에서 다른 T 림프구의 helper와 activation역할을 하며 숙주 방어기전의 중심적 역할을 하는 CD4림프구의 경우, 급여초에 비해 7주차의 경우 천연 미네랄 혼합제제 급여에 관계없이 유의적으로 증가하였다. 또한 급여군에서 3주차, 5주차, 7주차에 유의적인 증가추세를 보임을 알 수 있었다. 5주차를 제외하고 급여군에서 비급여군에서보다 높은 값을 보이지만 유의하지는 않았다 (그림 36).

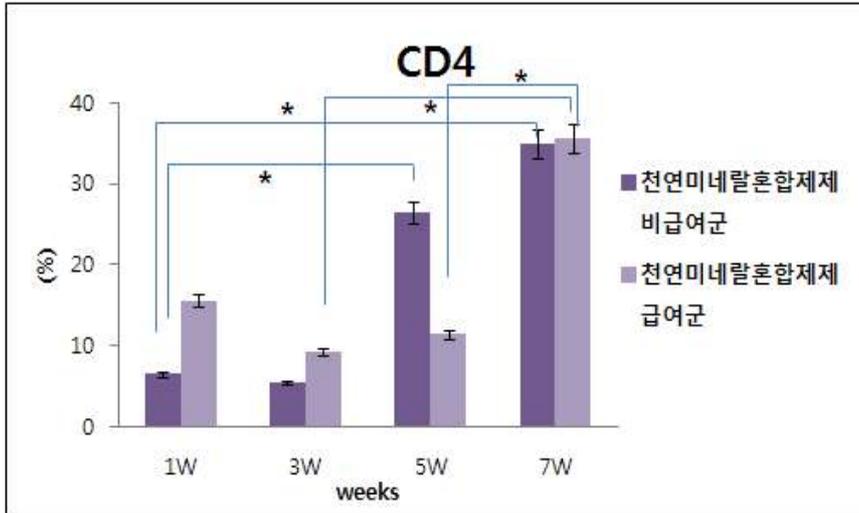


그림 36. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 CD4

- CD8의 경우 5주차까지 감소하다 7주차에 증가하였지만 천연 미네랄 혼합제제 급여에 관계없이 유의하지는 않았다 (그림 37).

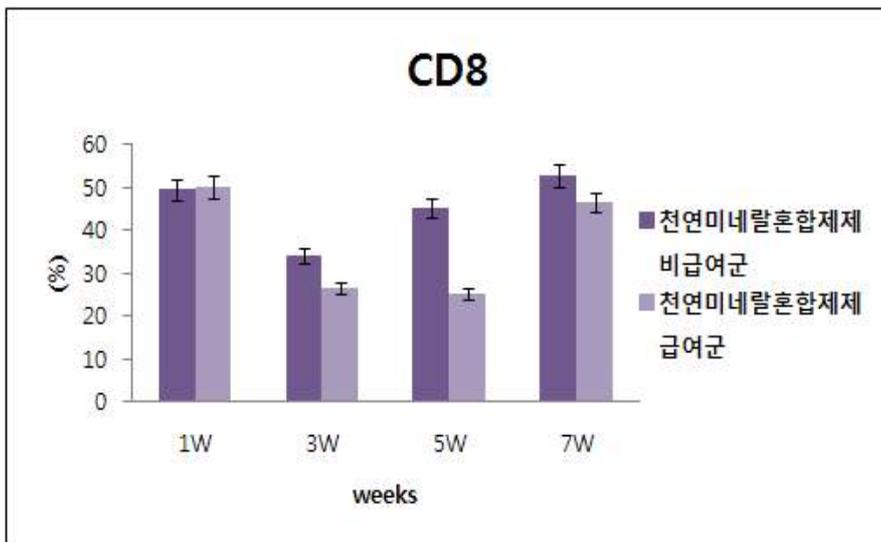


그림 37. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 CD8

- B cell (CD3-CD21+)의 경우 5주차까지 증가 추세였으며, 천연 미네랄 혼합제제 급여군이 비급여군에 비해 높은 값을 보였지만, 유의적이지는 않았다. (그림 38).

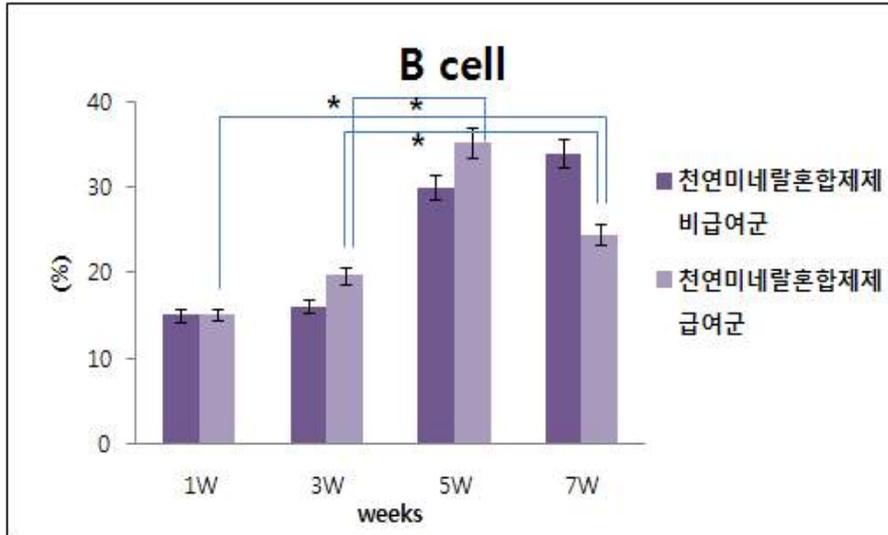


그림 38. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 B cell

- Neutrophil의 경우 급여 초부터 7주차까지 천연 미네랄 혼합제제 급여에 관계없이 유의적으로 증가하였다. 또한 급여군에서 1주차에 비해 3주차, 5주차, 7주차에 유의적인 증가 추세를 보임을 알 수 있었다. (그림 39).

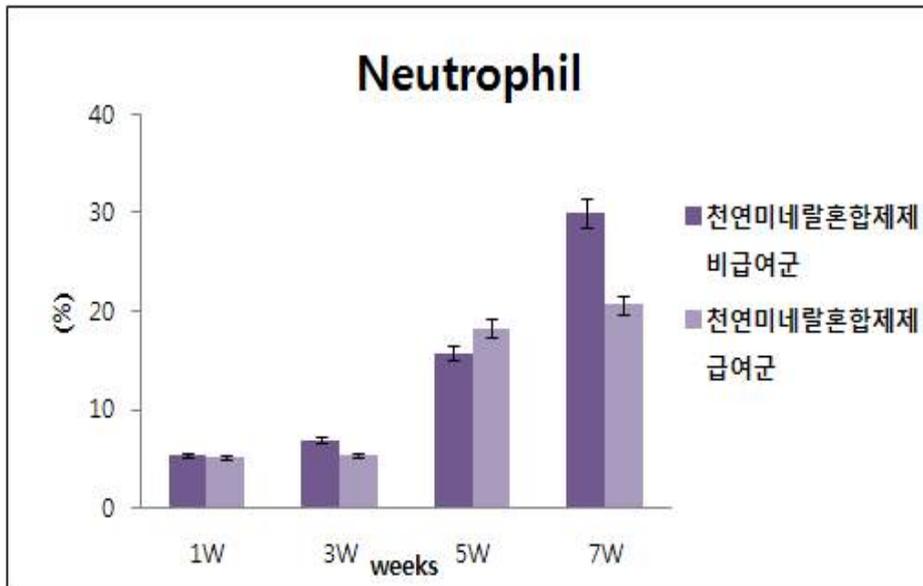


그림 39. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 Neutrophil

- Granulocyte와 monocyte의 경우 급여 후 감소하는 경향을 보였다. (그림 40).

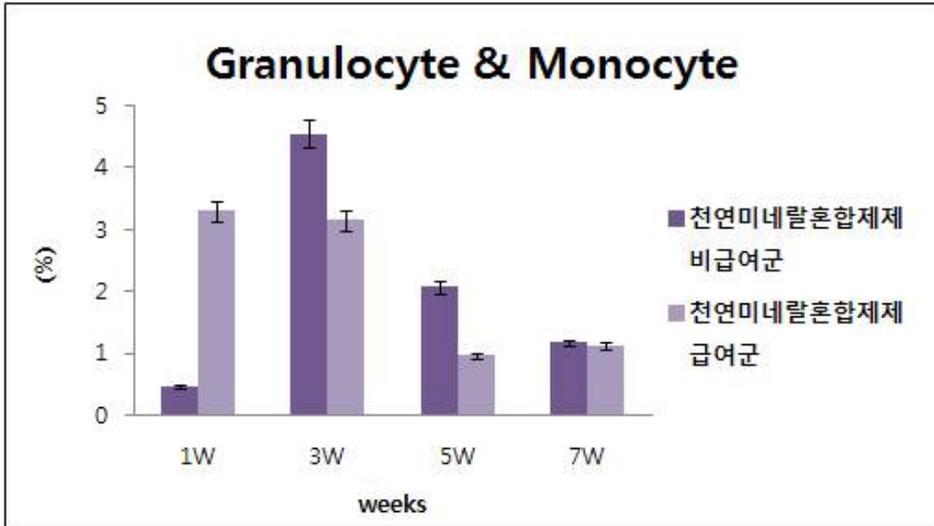


그림 40. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 Granulocyte & Monocyte

- 주로 2차 방어 지건에 참여하는 CD3림프구의 경우, 급여 초에 비해 급여 후 5, 7 주 차에 큰 증가폭을 보였지만 유의적이지는 않았다 (그림 41).

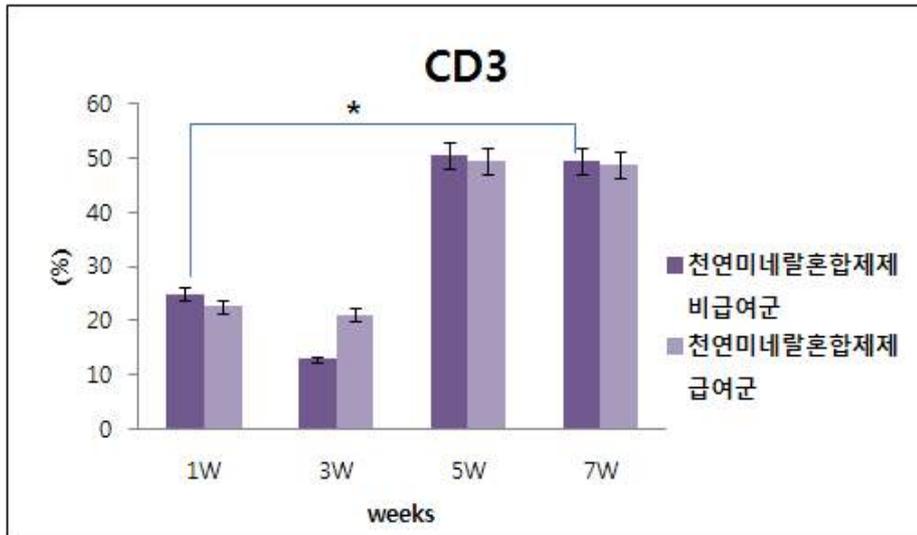


그림 41. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 CD3

- Naive T helper cell (CD3+CD4+CD8-)의 경우 천연미네랄 혼합제제 급여군이 비 급여군에 비해 높은 비율을 보였으나 유의적이지는 않았다 (그림 42).

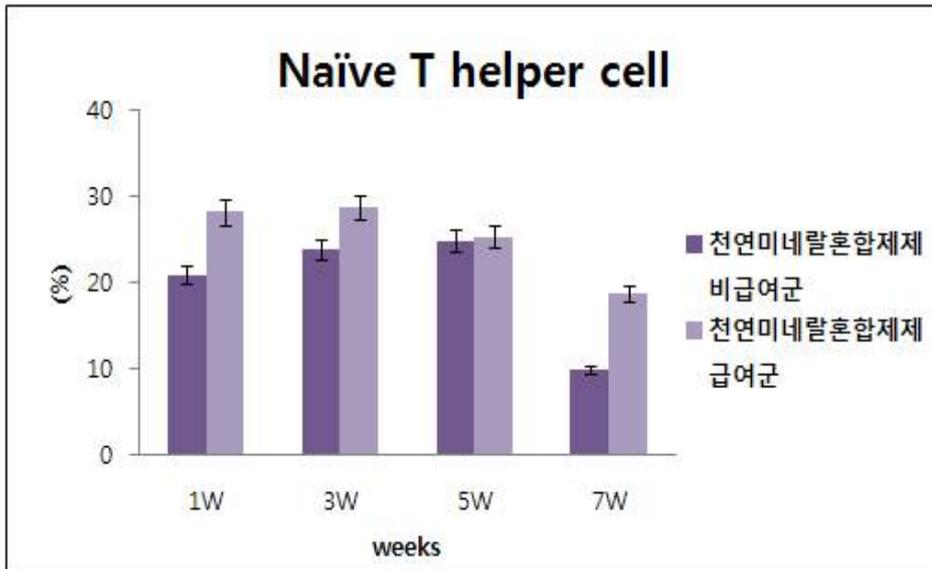


그림 42. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 Naive T helper cell

- Cytotoxic T lymphocyte (CD3+CD4-CD8+)의 경우 급여 초에 비해 급여 후 감소 하였다 (그림 43).

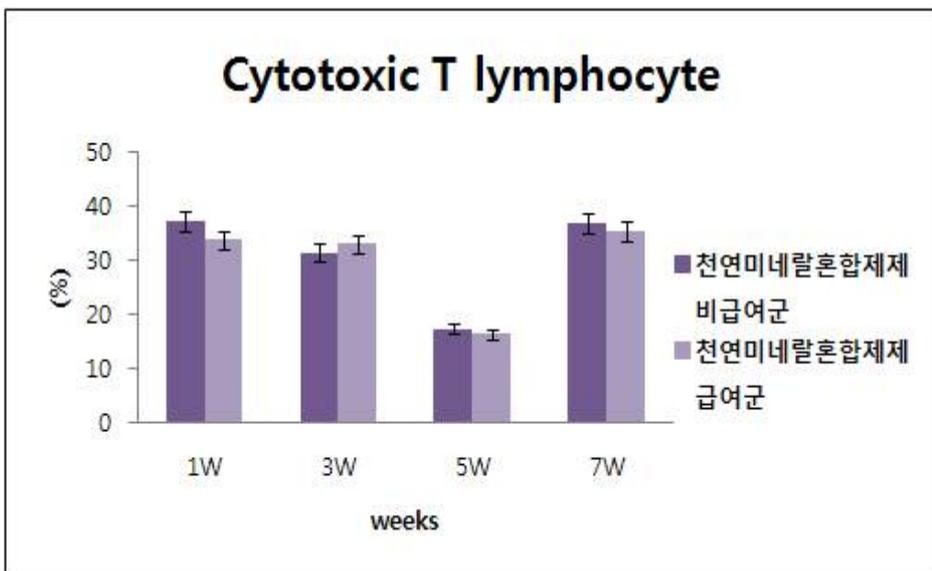


그림 43. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 Cytotoxic T lymphocyte

- Memory T helper cell (CD3+CD4+CD8+)의 경우 급여 초에 비해 급여 후 감소 하였다 (그림 44).

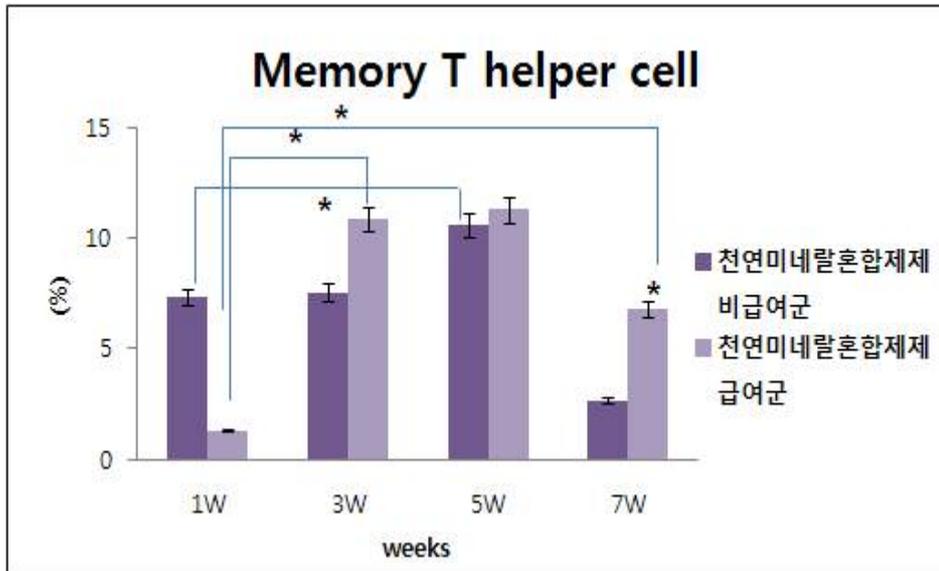


그림 44. 천연미네랄 혼합제제 급여 후 Memory T helper cell

## 2. 항생제 대체물질로서의 후보군 중에서 산업화에 적용 가능한 후보 선택

본 연구에서는 항생제 대체물질로서 1) Bacteriocin-like-inhibitory-substance (BLIS) 물질 NK34, 2) 알칼리 미네랄 비특이 면역물질, 3) 천연미네랄 비특이 면역물질, 4) 천연미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제를 후보물질로 하여 돼지에 급여한 후, 면역 증강 능력을 확인하고자 하였다.

첫째 후보물질인 BLIS 물질인 NK34의 경우, 소모성 질환에 감염되었을 때 항생제 대체물질로 사용하기에는 매우 제한적임을 알 수 있었다. 즉, 소모성질환에 복합적으로 감염되는 세균성 질환 중 그람음성세균에 효과적으로 작용하지 않는다는 점을 실험을 통해 확인하였고, 후보물질로서 적합하지 못함을 확인하였다.

둘째 후보물질인 알칼리 미네랄 비특이 면역물질의 경우, 성장률에는 PRRSV 공격접종 전후에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일부 생체 방어에 주요한 면역세포의 경우 유의적인 차이를 보이는 하였으나, 현재 특정 동물에서는 이미 사료첨가제로 이용 중인 관계로 본 연구에서는 후보물질로서 적합하지 못함을 확인하였다.

셋째 후보물질인 천연미네랄 비특이 면역물질의 경우, 실험기간 동안 급여군이 비급여군에 비해 체중 증가폭이 높지만, 각 그룹간의 유의적인 차이는 없었다. 면역세포의 경우, 급여 후 7주차 까지 실험이 진행되었으나, 면역세포를 분석하는 기기 고장으로 5주차와 7주차의 실험을 진행하지 못해 면역증강능을 확인하지 못하였다.

마지막 후보물질인 천연미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제를 후보물질로 하여 돼지에 급여하였다. 성장률의 경우 실험기간동안 비급여군에 비해 급여군의 체중 증가폭이 높았고, 급여군 7주차의 경우 급여전과 비교하여 체중이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 면역세포의 경우, 숙주 면역기전 및 질병 방어기전에 중요한 역할을 하는 MHC Class II의 항원 발현 세포가 비급여군에 비해 급여군 에서 유의적으로 높게 발현되었고, Memory T helper Cell이 급여군 에서 유의적으로 높았다. 또한 생체 방어기전에 핵심역할을 수행하는 CD4림프구가 천연미네랄 혼합제제 급

여 후 7주후 크게 증가하였다.

이로써 본 연구에서는 돼지 소모성 질환에 복합적으로 발생하는 세균성 질환에 대해 이용 가능한 항생제 대체물질로 천연미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제를 최종 물질로 선정하여 상품화를 시도하였다.

### 3. 천연미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제의 상품화

#### 1) 천연미네랄의 제조 공정

천연 미네랄은 다공성 운모 광물질로서 국내에서는 충북 영동의 광맥에서 그림 20과 같은 과정으로 제조된다.

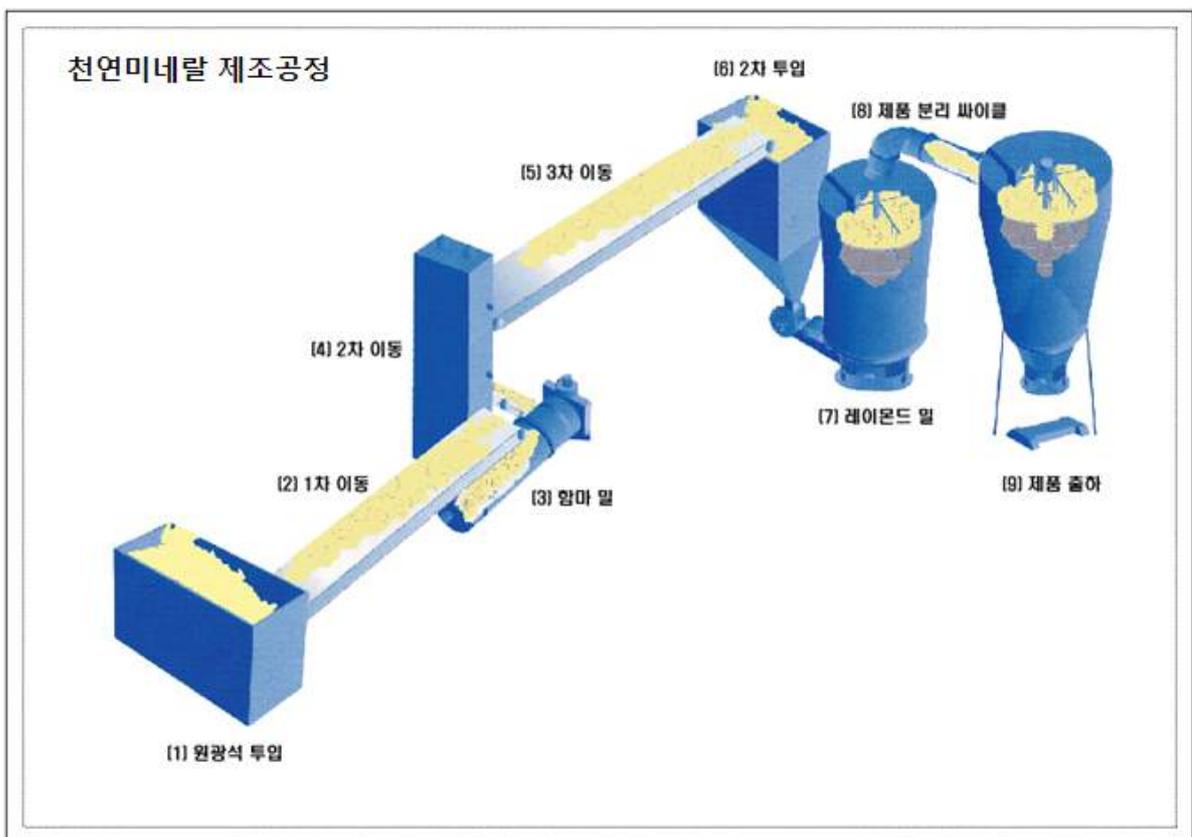


그림 45. 천연미네랄 제조 공정 사진

#### 2) 제 2 물질의 제조 공정

제 2물질은 광물질로서 열성이 매우 강하며, 독성이 있으므로 법제과정(法製過程)이 선행되지 않고서는 내복할 수 없음은 물론 법제하지 않은 물질을 가축이나 가금류에 급여하는 경우 사율이 거의 100% 이다. 본과제의 총괄기관인 메텍스(주)는 수년간의 연구개발로 본 광물질에서 유독성분(독성을 제거)을 제거하는 데 성공하여 생산라인의 구축으로 상당한 원가를 절감할 수 있도록 설계하였으며, 본 물질의 산업화가 가능 하도록 준비 완료되어 경쟁력을 확보한 상태이다.

3) 천연미네랄과 제 2 물질 (유황)의 혼합제제 제조 공정

본 물질은 사료 첨가제 즉 사료 보조제로서 시판되는 사료와 함께 쉽게 사용할 수 있도록 모두 가루제형으로 되어 있고, 농가에서 직접 사료대비 1%씩 섞어 사용한다.



그림 46. 시제품 제조 사진



그림 47. 시제품 사진

#### 4. 결론

천연 미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제를 돼지에 급여하였을 때, 성장률의 경우 실험기간동안 비급여군에 비해 급여군의 체중 증가폭이 높았고, 급여군 7주차의 경우 급여전과 비교하여 체중이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 면역세포의 경우, 숙주 면역기전 및 질병 방어 기전에 중요한 역할을 하는 MHC Class II의 항원 발현 세포가 비급여군에 비해 급여군 에서 유의적으로 높게 발현되었고, Memory T helper Cell이 급여군 에서 유의적으로 높았다. 또한 생체 방어기전에 핵심역할을 수행하는 CD4림프구가 천연 미네랄 혼합제제 급여 후 7주후 크게 증가하였다.

이로써 돼지 소모성 질환에 복합적으로 발생하는 세균성 질환에 대해 이용 가능한 항생제 대체물질로 천연미네랄 비특이 면역물질 + 제 2 물질의 혼합제제를 최종 물질로 선정하여 상품화를 시도 하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

<제1세부> 국내 소 바이러스성 설사병 근절 프로그램 개발 및 BVDV 키트 개발

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	기여 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011.8 - 2012.8)	<제1세 부>	○ BVD 감염 현황 모니터링	100	100	1) BVDV 세미나등을 통해 농가의 자발적 BVDV 프로그램 참여 유도 2) BVDV감염현황모니터링 BVDV 항원검사 : 4,600두 (목장 4,446두, 신생우 154두) 3) BVDV 항체검사 : 4,260두 1) mouse 면역 및 항혈청 역가확인 2) myeloma cell과 spleen fusion 3) Cloning and screening 4) 복수생산 및 정제 5) 단클론 항체 특성 확인 6) 키트적용을 통한 항체 pair 확인
		○ BVDV 항체 개발 시작	100	100	
2차 년도 (2012.8 - 2013.8)	<제1세 부>	○ BVD 감염 현황 모니터링	100	100	1) BVDV 프로그램 참여농가의 BVDV 감염현황모니터링검사 및 농가 지도 2) BVDV감염현황모니터링 : 항체검사(3,510두) : 항원검사(4,593두 : 항원미검사우, 신생우 및 입식우 1,500두 포함) 3) 검사결과에 대한 분석 및 BVDV프로그램 참가농가에 대한 BVDV 컨설팅 4) BVDV 항체 및 항원검사 분석결과서 작성 1. 항체개발 1) 재조합 단백질 항원준비 - MBP-Erns 클로닝 - His-NS3 클로닝 2) 마우스 면역 및 역가확인 3) Fusion, 스크리닝 및 cloning 4) Ascites 생산 및 정제 2. BVDV 항원 진단키트 개발 1) 40nm Colloidal gold 제조 2) antibody-gold conjugation 조건 확립 3) Sample pad 전처리 조건 확립 4) conjugate pad 전처리 조건 확립 5) Nitrocellulose membrane coating 최적화
		○ BVDV항원현장검사키트 개발조건 확립	100	100	
3차 년도 (2013.8 - 2014.8)	<제1세 부>	○ BVD 감염 현황 모니터링	100	100	1) BVDV 항원검사 : 4,248두 2) BVDV 항체검사 : 3,500두
		○ BVDV 현장 적용 프로그램 개발	100	100	1) 프로그램(1종) 개발
		○ BVDV항원현장검사키트 키트 개발완료 및 현장 적용	100	100	1) BVDV 키트 개발 : 필드샘프(음성 30개 이상 & 양성샘프(30개이상)에 적용하여 키트 평가 : 민감도(100%) 특이도(100%) 재현성(100%)
		○ 항생제 대체물질 첨가 사료의 제조 (제2협동 협조)	100	100	2) 항생제 대체물질 첨가 사료의 시제품 제조

<제1협동 제1과제> 국내 소 유산의 원인 분석 및 근절을 위한 대책마련 기술 개발

구분 (연도)	세부과 제명	세부연구목표	달성 도 (%)	기여 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011.8 - 2012.8)	<제1협 동> 제1 과제	○ 소의 유산질 질병 발생 원 인 분석	100	100	1) 소 유산관련 질병 진단법구축 2) 유산 발생농가 시료를 이용한 유 산 원인 분석 3) BVDV 항원정제 및 Mab 작성 4) 3개 이상의 Mab 확보 - 최근 아까바네바이러스 확보
		○ BVDV MAB 작성 및 확 보	100	100	
2차 년도 (2012.8 - 2013.8)	<제1협 동> 제1 과제	○ 소 유산증 진단법 개선 및 아까바네 백신 개량 연구	100	100	1) 소 유산관련 질병원인 정보확보 2) 소 파라인플루엔자5형바이러스 분리 및 특성분석 3) BVDV 특이항체 3개 이상 작성 4) 최근 아까바네바이러스 확보 및 개량된 아까바네백신 생산기법확 립 5) 소모성 질환을 일으키는 바이러스 에 대한 ribavirin의 증식억제능
		○ 소 유산에 관련된 세균 및 바이러스 질병의 진단법 개선	100	100	
		○ 아까바네 백신 개량 연구	100	100	
3차 년도 (2013.8 - 2014.8)	<제1협 동> 제1 과제	○ 개량된 Akabane 백신 안 전성 및 효능 평가	100	100	1) 아까바네 M1 및 N 유전자 재조 합배칼로바이러스 작성 2) 아까바네 및 유행열 불활화혼합 백신의 시험백신 제작 3) 마우스, 기니픽, 돼지 및 소에서 아까바네 및 유행열불활화혼합백 신의 안전성 및 면역원성 확인

<제1협동 제2과제> 돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장 적용

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	기여 도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011.8 - 2012.8)	<제1협 동> 제2과 제	○ 돼지소모성질환 농장단 위 질병발생 모니터링 ○ 농장단위 질병발생 위험 지도 작성	100 100	100 100	1) 돼지 소모성질환 농장단위 질병 모니터링 및 질병발생 동향 파악 (질병피해양돈장 6개소 지정, 주 요 질병 10종 검사) 3) 주요 소모성질환 분리주 확보 및 특성조사 4) 주요 소모성질환별 주요 감염구 간 및 집중관리 시기 도출 5) 소모성질환 저감을 위한 제제의 구성 및 개발방향 설정 6) 질병발생 위험지도 작성 및 방역관리 요령 매뉴얼 작성
2차 년도 (2012.8 - 2013.8)	<제1협 동> 제2과 제	○ 돼지소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 초유대 용제 및 사육단계별 면역 증강제 개발	100	100	1) 돼지소모성질환 제어용 난황항체 제제 및 초유대용제 개발 및 시제 품 생산 2) 기초제형을 토대로 한 사육단계 별 적합 제제 개발 및 효능 평가 3) 면역증강제 적용에 따른 소모성 질환 피해 개선효과 분석
3차 년도 (2013.8 - 2014.8)	<제1협 동> 제2과 제	○ 개발제형 산업화 및 국내 양돈장 적용 면역증강 사양 관리 프로그램 개발 및 보 급	100	100	1) 돼지소모성질환 제어용 난황항체 제제 및 초유대용제 개발제형 등 록 및 제품 생산 2) 돼지 소모성질환 제어를 위한 면 역증강 사양관리 프로그램 개발 및 보급

<제2협동> 안전축산물 확보를 위한 유해미생물 제어기술 개발

구분 (연도)	세부과 제명	세부연구목표	달성도 (%)	기여도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011.8 - 2012.8)	<제2협 동>	○ 샘플 채취 및 분석	100	100	1) 병원성균 오염 양상 파악 2) 지표균 오염 양상 파악
		○ 분리된 세균에 대한 항생제 감수성 검사	100	100	1) CLSI 가이드라인에 따른 디스크 확산법을 통한 항생제 감수성 검사
		○ 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자 분석	100	100	1) 분리된 세균에 대한 각각의 항생제 내성 유전자 및 병원성 유전자를 PCR을 통해 검출
		○ 세균성 질병 제어를 위한 주요 오염 요소 분석 및 예방 대책을 위한 가이드라인 확립	100	100	1) 돼지 사육농가 대상 지속적인 모니터링을 통한 오염현황 파악 2) 발생가능한 위해요소 파악
2차 년도 (2012.8 - 2013.8)	<제2협 동>	○ NK34의 항균능 측정	100	100	1) 분리된 세균 배양 2) spot-on-lawn assay 3) 세균억제대 측정 및 항균능 확인
		○ 알칼리 미네랄 비특이 면역물질의 면역 조절에 의한 생산성 향상 효과 확인	100	100	1) 돼지 사육 농가 섭외 2) 급여균과 비급여균의 임상증상, 체중 측정 및 채혈 3) 혈액을 통한 면역세포 분석
3차 년도 (2013.8 - 2014.8)	<제2협 동>	○ 천연 미네랄 비특이 면역물질의 면역 조절에 의한 생산성 향상 효과 확인	100	100	1) 돼지 사육 농가 섭외 2) 급여균과 비급여균의 체중 측정 및 채혈 3) 혈액을 통한 면역세포 분석
		○ 천연 미네랄 비특이 면역물질과 제 2물질과의 혼합제제 급여에 따른 면역 증강효과 확인	100	100	1) 돼지 사육 농가 섭외 2) 급여균과 비급여균의 체중 측정 및 채혈 3) 혈액을 통한 면역세포 분석
3차 년도 (2013.8 - 2014.8)	<제2협 동>	○ 산업화 적용 가능한 후보군 선택	100	100	1) 항생제 대체물질로서의 후보군 효능 분석 2) 산업화에 적용 가능한 후보 선택
		○ 항생제 대체물질 첨가 사료의 제조	100	100	1) 선택된 물질의 시제품 생산

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구성과목표

구분		(예시) 특허		(예시) 신제품			(예시) 유전자 원 등록	(예시) 논문		기타	
		출원	등록	품중명칭 등록	품중생 산 수입 판 매 신고	품중보호		SCI	비SCI		
						출원					등록
1차 년도	목표	1							2		
	달성	1					7		1		
2차 년도	목표	1	1				1	2	2		
	달성	1	1				4	1	2		
3차 년도	목표	1	1				2	2	2		
	달성	1(예정)	1(진행중)					4(3진행중)	3(2진행중)		
4차 년도	목표										
	달성										
5차 년도	목표										
	달성										
계	목표	3	2				3	4	6		
	달성	3(1진행중)	2(1진행중)				11	5(3진행중)	7(2진행중)		

#### 1. 특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연 도	특허명	등록 인	등록국	등록번 호
2012	돼지 소모성질병 치료 및 예방용 젖소 초유면역항체 조성물 및 제조법	이경기 외 11명	대한민국	10-201 2-0154 111	2014	돼지 소모성 질병의 치료 또는 예방을 위한 젖소 초유 항체 조성물	농림 축산 검역 본부, (주)삼 양애 니팜	대한민 국	10-141 1995
2013	돼지췌코바이러스 2형(PCV2)의	이경기 외 10명	대한민국	10-201 3-0060					

	ORF2 재조합 유전자, 전달 벡터, 재조합 배칼로바이러스, 돼지췌코바이러스 2형(PCV2) 재조합 캡시드 단백질 및 그의 제조방법			248					
2014	면역크로마토그래피 방법을 이용한 BVDV 항원 진단 키트	*** 등	대한민국	진행 중					

## 2. 유전자원 등록

번호	학 명	질병명(한글/영문)	분리일자	비고
1	Escherichiacoli(KEFS0277)	대장균/E.coli	2011. 4	분
2	Escherichiacoli(KEFS0285)	대장균/E.coli	2011. 4	
3	Escherichiacoli(KEFS0294)	대장균/E.coli	2011. 4	
4	Escherichiacoli(KEFS0316)	대장균/E.coli	2011. 4	
5	Escherichiacoli(KEFS0317)	대장균/E.coli	2011. 4	
6	Bovine parainfluenza virus type 5 (QIA-B1201 strain)	소파라인플루엔자5형	2012. 1	
7	Bovine parainfluenza virus type 5 (QIA-B1204 strain)	소파라인플루엔자5형	2012. 1	
8	SalmonellaTyphimurium	살모넬라/S.Typhimurium	2013. 3	
9	SalmonellaTyphimurium	살모넬라/S.Typhimurium	2013. 3	
10	SalmonellaTyphimurium	살모넬라/S.Typhimurium	2013. 5	
11	recombinantbovineGMCSFbaculovirus	소GMCSF재조합배칼로바이러스	2013. 8.	

3. 논문

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Evaluation of Akabane vaccine strains based on the molecular characterization	양동균	양동균	김하현 나진주 최성숙 석금옥 김선영 김재조 송재영	한국수의공중보건학회지	36(4)	국내	비SCI
2013	Immunity induced by recombinant adenovirus expressing capsid protein of porcine circovirus 2	이경기	이경기	박최규 현방훈 김성희 엄재구 배채운 이명현	한국수의공중보건학회지	투고중	국내	비SCI
2013	Expression of the capsid protein of porcine circovirus 2 with codon optimization	이경기	이경기	박최규 김성희 배채운 엄재구 김연희 이명현	veterinary microbiology	투고중	국외	SCI
2013	Effect of bovine colostrum to protect against porcine diarrhea diseases	이경기	이경기	전용수 박최규 김성희 배채운 엄재구 김연희 이명현	한국수의공중보건학회지	투고중	국내	비SCI
2013	Prevalence for persistently infected cattle with bovine viral diarrhea virus in Korea	조종숙	조종숙	조종숙 김경동 박홍제 임연수 홍성희 서창원 류희정 신령자	한국가축위생학회지	36(2)	국내	비SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Dissimilarity of ccrAB gene sequences between methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis and methicillin-resistant S. aureus among bovine isolates in Korea	박영경	박용호	백영환 황선영	Journal of veterinary science	14(3)	국내	SCIE
2013	Molecular identification of the vaccine strain from the inactivated bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccines	양동균	양동균	김하현 조수동 최성숙 김재조 송재영	한국가축위생학회지	36(1)	국내	비SCI
2013	The follow up study after massive outbreak of Akabane and bovine ephemeral fever viruses in Korea	양동균	양동균	김선영, 김하현 강미선 나진주 최성숙 석금옥 조종숙 송재영	한국가축위생학회지	36(2)	국내	비SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Characterisation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> related to bovine mastitis	박혜림	김재홍	홍민기, 황선영, 박영경, 권가희, 윤장원, 박용호	Acta Vet Hung.	62(1)	국외	SCI
2014	Increased protection activity and enhanced vaccination effect of BARODON, alkali mineral complex-immunostimulator against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	박영경	박용호	황선영, 송재원, 정연수, 한승재, 권창훈, 정재윤, 이한규, 김정현, 김태규, 이보균, 최수일, 최현석, 유명우, 한정희	Vet Microbiol.	투고중	국외	SCI
2014	Isolation of novel bovine parainfluenza virus type 5 and its incidence in Korean cattle	양동균	양동균	나진주 김하현 최성숙 배유찬 박중원 송재영	Korean J Vet Res	54(2)	국내	비SCI

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Inactivated Akabane Virus and Ephemeral Fever Virus Vaccine Induced High Neutralizing Antibodies in Several Animals	양동군	양동군	양동군 김하현 조현테 최성숙 송재영	예정	예정	예정	SCI

## 제2절. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	3	7	2	3	3
	달성	3 15. 6월 중 완료예정	7 1-출시 6-예정	2 '14. 11월중 완료예정	8	10

### 1. 기술실시(이전)

번호	기술실시(이전)	기관	비고
1	BVDV Mab제작기술이전	농림축산검역본부	예정 '14. 12월
2	돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강제제 제작기술 이전	농림축산검역본부	예정' 14. 12월
3	항생제 대체물질 첨가 사료의 제조기술이전	서울대학교	예정' 15. 6월

### 2. 상품화

번호	상 품	업체명	비 고
1	BVDV generic antigen detection kit(추진 중)	(주)메덱스	'16. 6월
2	BVDV type 1 antigen detection kit(추진 중)	(주)메덱스	'16. 6월
3	BVDV type 2 antigen detection kit(추진 중)	(주)메덱스	'16. 6월
4	BVDV Antibody test kit(추진 중)	(주)메덱스	'16. 6월
5	신생자돈 면역제제: 아이지피그-F1산, 신고번호: 010-A024, 신고일자: '13. 02. 12	(주)삼양애니팜	상품화
6	포유자돈 면역제제: 아이지 피-디산, 신고번호: 010-A0028, 신고일자: '14. 09. 03,	(주)삼양애니팜	'15. 6월
7	항생제 대체물질 첨가 사료 (해피피그), (추진 중)	(주)메덱스	'16. 6월

### 3. 정책자료

번호	정책	비고
1	국내 소 바이러스성 설사증 근절 프로그램의 현장실증을 통하여 효과적인 소 바이러스성 설사 증 근절 프로그램을 제안	'14.11완료예정
2	소 바이러스 설사증 항원을 현장에서 편리하고 신속하게 사용할 수 있는 BVDV 항원현장검사키트의 활용 제안	'14.11완료예정

#### 4. 교육지도

번호	교육명	교육기관
1	돼지 주요 수모성질환 등 주요질병 개요 및 질병예방관리를 위한 차단 방역교육 ( '12. 3. 14 : 200명)	농림축산검역본부
2	한우육종농가교육 :한우 BVD 발생현황 및 농가관리요( '12. 7. 18일 : 79농가)	한우개량사업소
3	2013 축산컨설팅트 핵심과정(1)교육( ' 13. 6. 5 :43명)	한우개량사업소
4	2013 한우육종농가 상반기교육( '13. 7. 8 : 92명)	한우개량사업소
5	돼지설사병 진단 및 방역관리( '13. 6. 12 : 40명)	농림축산검역본부
6	2013년 제주 축산글로벌경영대학 전문화과정( '13.7. 26 :42명)	한우개량사업소
7	젖소에서 소바이러스설사병 지속감염우(PI)예방	농림축산검역본부
8	돼지소모성질환 지도지원사업 실무교육( '14. 5. 28 : 89명)	농림축산검역본부

#### 5. 언론홍보

번호	상 품	비 고
1	국내 PRRS발생동향 분석 '11. 11. 07	월간잡지 (현대양돈)
2	BVDV 발생현황 및 농가관리수칙 '12. 8. 1	중앙전문지 (방역위생)
3	신생자돈에 치명적...발병돈 조기도태를(돼지유행성설사병의 특성과 관리 '12.10. 12	중앙전문지 (축산신문)
4	피해 크지만 인식 저조...백신접종을 높여야(돼지 세균성호흡기질병) '12.10.24	중앙전문지 (축산신문)
5	출하전 항생제 사용 주의..예방활동 힘써야(육성, 비육돈 설사병과 예방대책) '12. 10. 31	중앙전문지 (축산신문)
6	예방 가장 어려워 양돈장 최대 골칫거리(국내 PRRS 발생동향) '12. 11. 05	중앙전문지 (축산신문)
7	포유자돈 설사의 사각지대, 클로스트리디움 디피실 감염증 '13. 1. 22	월간잡지 (피그엔포크)
8	돼지 대장균 설사병의 진단 '13. 2. 22	'월간잡지 (피그엔포크)
9	PRRS 안정화(청정화)를 위한 관리요령 '13. 5. 23	월간잡지 (피그엔포크)
10	PED 발생시 돈사 관리 요령 '14. 1. 27	중앙전문지 (축산신문)

#### 6. 기타

<2012년 춘계수의학회에서 2건의 포스터 발표>

1. Molecular identification of vaccine strain from the inactivated bovine diarrhea virus

2. Genetic analysis of Akabane vaccine strains in Korea

<2012년 추계수의학회에서 3건의 포스터 발표>

3. Seroprevalence of Akabane virus and Bovine ephemeral fever virus in Korea

김선영, 양동군, 김하현, 조종숙, 석금옥, 정가교, 최성숙, 송재영

4. Effect on ribavirin in bovine related viruses in vitro

김선영, 양동군, 김하현, 석금옥, 정가교, 송재영

5. Isolation and Identification of parainfluenza virus type 5 (PIV-5) from bovine brain samples

양동군, 김하현, 김선영, 석금옥, 최성숙, 조수동, 송재영

<2013년 춘계수의학회에서 1건 포스터 발표>

6. Molecular Characterization of Commercial Live Attenuated Bovine Ephemeral Fever Virus Vaccine Strain Based on the Nucleoprotein and Glycoprotein Genes

양동군, 나진주, 김하현, 김서현, 조재성, 최성숙, 김재조, 송재영

<2013년 제16차 세계 수의진단학회(WAVLD) 포스터 발표(1건)>

7. Comparative evaluation of three diagnostic methods to detect genes of porcine epidemic diarrhea virus

이경기, 김성희, 엄재구, 김연희, 이명현

<2014년 추계수의학회에서 1건 포스터 발표>

8. Inactivated Akabane Virus and Ephemeral Fever Virus Vaccine Induced High Neutralizing Antibodies in Several Animals

양동군, 김하현, 조현례, 최성숙, 송재영

### 제3절 기타

#### 1. 추가연구 및 타연구에 활용 계획

가. BVDV 항원현장검사키트 제조기술은 동물질병원인체 진단개발을 위한 필수기술이고 또한 산업화를 위해 활용되는 기술임. 동물질병원인체 검출 기술을 확보함으로써 다양한 질병에 대한 항원 또는 항체검사키트 연구 및 제조 가능.

나. 소 아까바네에 대한 백신 개선 기술을 획득함으로써 다양한 질병원인체에 대한 백신 제조 연구 및 제조 가능

다. 신생자돈 및 포유자돈에 대한 돼지 소모성질환 유발 핵심 병원체 제어용 초유대용제 개발의 기술을 확보함으로써 돼지 사육단계별 및 타축종 면역제제 연구 및 제조 가능

라. 천연미네랄을 이용한 사료첨가제 제조 기술을 통하여 국내 양돈 현장 내 유해미생물 제어를 위한 항생제 대체물질의 사료첨가제의 기술을 확보함으로써 천연물질의 연구 및 제조 가능

#### 2. 경제적·산업적 파급효과

가. BVDV 항원현장검사키트 제조기술은 BVDV 근절프로그램 등이 국내에서 적용시 현재 사용

되고 있는 BVD 항원검출을 위해 사용되는 외국 BVDV Antigen ELISA 및 RT PCR kit 의 대체가 가능하며, BVDV 근절사업이 진행되고 있는 해외 국가에 수출가능

나. 분자생물학적기술을 이용한 개선된 소 아까바네병 백신은 1993년도 분리주를 이용한 현재의 아까바네병 백신을 대체가능하며 아시아지역 수출가능

다. 면역복합제제 및 천연미네랄을 이용한 사료첨가제는 돼지 소모성 질환의 경제적 손실을 20~30% 감소시킬 것으로 기대되며, 돼지 면역복합제제 산업화를 통한 양돈농가 질병피해 감소 및 소득 증대, 배합사료 첨가용 항생제 사용금지에 따른 양돈농가 불안감 해소 및 무항생제 안전축산물 생산 기반 조성으로 안정적 수입원 창출, 항생제 대체 물질의 산업화를 통한 축산 농가 질병피해 감소 및 소득 증대

3. 관련 소비자 측면 파급 효과

가. 소 바이러스성 설사증 프로그램 및 BVDV 항원현장검사키트에 의한 파급 효과

- 소 바이러스성 설사증 프로그램 및 BVDV 항원현장검사키트 적용으로 인해 BVD로 인한 피해금액(1260~3440억원/년)\*을 방지함으로써 축산농가의 소득안정화

\* 산출근거 :  $1260 \sim 3440\text{억원} = 3\text{백만}^1) \times (\$15\sim\$41^2) \times 2.8\text{배}^3) \times 1,000\text{원}^4)/1\text{두당}$

1) 국내 소 사육두수 : 약 3,000,000두

2) 1두당 피해액

\$US Percow	Author	Date	Publication	Country	Cattle Type
\$15.33~20.16 per cow	Larson et al. Bovine Practitioner.	2002	Bov Pract	US	Beef cow-calf
41.17 per cow	Hessman	2006	BVD Control Conference	US	Beef

3) 2012년도 한국소 vs 미국소 가격비교 = 2.8 배

- (미국) 미국육류수출협회, USMeat, 격월, FOB OMAHA 기준
- (한국) 농협, 유통일보, 축산물가격동향, <https://farminfo.nonghyup.com/nafa/index.html>, 한우 기준

\* 미국의 경우 해당년도 매매기준율(외환은행)을 기준으로 천원/600kg으로 환산한 값

4) 환율 \$1 = 1,000원

나. 소 유사산, 돼지 소모성질환 및 위해미생물로 인한 경제적 피해 금액(약1.2조/년:농촌경제연구원, 2006)을 감소시킴으로써 축산농가의 소득안정화

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제1절. 특허

#### 1) *Immuno chromatographic assay*

개발기술명		<i>Immuno chromatographic assay</i>
핵심특허 및 관련성	특허명	Capillary Immunoassay and device therefor comprising mobilizable particulate labelled reagents
	보유국	네덜란드(Unilever Patent Holdings B.V)
	등록 년도	1997. 4. 22
	요약	1. US patent 5622871호는 hollow casing과 그 내부에 들어있는 test strip을 포함하는 analytical test device에 관하여 청구하고 있음. 2. test strip은 labelled reagent를 포함하는 test result zone과 control zone을 포함(청구항8)하는 nitrocellulose 재질(청구항5)의 dry porous carrier를 포함하고 있음.

#### 2) *bovine colostrum and pig & IgY and Pig*

개발기술명		<i>bovine colostrum and pig &amp; IgY and Pig</i>
핵심특허 및 관련성	특허명	돼지질병의 항원 제조방법 및 면역 난황항체 생산과 전해질을 첨가한 돼지질병 방제용 조성물
	보유국	한국
	등록 년도	2010
	요약	난황항체 생산을 위한 항원제조 대상 질병이 다수 일치(돼지전염성위장염, 돼지유행성설사병, 돼지로타바이러스, 돼지췌코바이러스, 대장균 및 살모넬라균)

#### 3) *항생제 대체를 위한 천연물질*

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
핵심특허 및 관련성	특허명	락토바실러스속 유산균 복합 균주를 포함하는 사료첨가제 (A feed additive containig novel Lactobacillus spp. complex)	박테리오신을 생산하는 유산균주 및 이를 함유하는 가축용 복합 생균제 조성물 (Novel bacteriocin-producing lactic acid bacteria and mixed microbial composition using it for livestocks)
	보유국	대한민국	대한민국
	등록	2009	2006

	년도		
	요약	유산균 복합 균주를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제에 관한 것	전통발효식품인 김치로부터 분리된 항균물질 (페디오코커스 펜토사시우스 K23-2)을 이용하여 가축용 복합 생균제 개발

## 제2절. 논문

### (1) *BVDV eradication & rapid kit for BVDV Ag detection*

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
핵심논문 및 관련성	논문명	Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe	Development of an immunochromatographic test kit for rapid detection of bovine viral diarrhea virus antigen
	학술지명	J Vet Diagn Invest	J Viral Methods
	저자	H.Houe 등	Kameyama K 등
	게재년도	2006	2006
	요약	BVDV 근절방안으로서 PI을 검색하여 전파원을 농장에서 제거	BVDV에 대한 monoclonal antibody을 사용한 BVDV 항원 간이 진단 키트 개발

### (2) *bovine colostrum and pig & IgY and Pig*

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
핵심논문 및 관련성	논문명	Effects of oral supplementation with bovine colostrum on the immune system of weaned piglets	Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing Escherichia coli infections
	학술지명	Research in Veterinary Science	FEMS immunology & Medical microbiology
	저자	Boudry C 등	Girard F 등
	게재년도	2007	2006
	요약	이유자돈에게 소 초유를 투여한 다음, 면역체계에 이로운 영향을 줌을 보고	대장균의 병원인자에 대한 난황항체가 항생제 대체제로서 유용함을 보고

(3) Antibacterial material and NK34 & Bacteriocin-like inhibitory substance

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
핵심논문 및 관련성	논문명	In vitro antimicrobial effect and in vivo preventive and therapeutic effects of partially purified lantibiotic lacticin NK34 against infection by Staphylococcus species isolated from bovine mastitis.	Inhibition of vancomycin and high-level aminoglycoside-resistant enterococci strains and Listeria monocytogenes by bacteriocin-like substance produced by Enterococcus faecium E86.
	학술지명	Journal of dairy science	Current microbiology
	저자	Park YH 등	Lemos Miguel MA 등
	게재년도	2010	2008
	요약	lantibiotic lacticin NK34를 이용하여 유방염 젖소에서 분리된 staphylococcal species에 대한 항균능을 분석	<i>Enterococcus faecium</i> E86 산생 Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS)를 이용하여 항생제 내성이 있는 Enterococci를 억제 시키고 <i>Listeria monocitogenes</i> 에 대한 항균능을 분석

## 제 7 장 참고문헌

제1세부: 국내 소 바이러스성 설사병 근절 프로그램 개발 및 BVDV 항원형정검사 키트 개발

1. Baker JC. 1995. The clinical manifestation of bovine viral diarrhea infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 425-445.
2. Bachofen C, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Stalder H, Peterhans E. 2010. Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol* 141: 258-267.
3. Barker IK, Dreumel AAV, Palmer N. 1993. Bovine virus diarrhea. pp. 149-159. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N(ed.). *Pathology of domestic animals*. Vol. 2. 4th ed. Academic Press, San Diego.
4. Bielefeldt Ohmann H. 1988. BVD virus antigens in tissues of persistently viraemic, clinically normal cattle: implication for the pathogenesis of clinically fatal disease. *Acta Vet Scand* 29: 77-84.
5. Braun U, Schlnmann M, Ehrensperger F, Hilbe M, Brunner D, Stlrk KD, Giger T. 1998. Epidemiology of bovine virus diarrhoea in cattle on communal alpine pastures in Switzerland. *Zentralbl Veterinarmed A* 45: 445-452.
6. Brodersen BW. 2004. Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 20: 85-93.
7. Fulton RW, Hessman B, Joh`nson BJ, Ridpath JF, Saliki JT, Burge LJ, Sjeklocha D, Confer AW, Funk RA, Payton ME. 2006. Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtype 1a, 1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *J Am Vet Med Assoc* 228: 578-584.
8. Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ, Ridpath JF, Kapil S, Burge LJ, Cook BJ, Confer AW. 2009. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. *Can J Vet Res* 73: 283-291.
9. Hessman B. Effects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) persistently infected (PI) calves in the feedyard and management of PI calves after initial identification. *Proceedings from: BVDV Control: The Future is Now Conference; January 31, 2006; Denver, Colorado.*
10. Houe H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*. 31: 137-143.
11. Houe H. 1999. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol* 64: 89-107.
12. Houe H, Lindberg A, Moennig V. 2006. Test strategies in bovine viral diarrhea virus control and eradication campaigns in Europe. *J Vet Diagn Invest* 18:

427–436.

13. Stahl K, Alenius S. 2012. BVDV control and eradication in Europe. *Japanese Journal of Veterinary Research* 60(Supplement): S31–S39
14. Larson RL, Pierce VL, Grotelueschen DM, Wittum TE. 2002 Economic evaluation of beef cowherd screening for cattle persistently–infected with bovine viral diarrhea virus. *Bov Pract.* 36(2):106–112.
15. Presi P, Struchen R, Knight JTones, Scholl S, Heim D. 2011 Bovine viral diarrhea (BVD) eradication in Switzerland—Experiences of the first two years Preventive. *Veterinary Medicine PREVET*–2916;10
16. Taylor LF, Van Donkersgoed J, Dubovi EJ, Harland RJ, van den Hurk JV, Ribble CS, Janzen ED. 1995. The prevalence of bovine viral diarrhea virus infection in a population of feedlot calves in western Canada. *Can J Vet Res* 59: 87–93.

제1협동 제2과제 : 돼지소모성질환 제어를 위한 면역증강 사양관리기법 개발 및 농장 적용

1. Belak S. The molecular diagnosis of porcine viral diseases, *Acta Vet Hung.* 2005;53(1):113-24.
2. Boklund A, Dahl J, Alban L. Assessment of confidence in freedom from Aujeszky's disease and classical swine fever in Danish pigs based on serological sampling—Effect of reducing the number of samples. *Prev Vet Med.* 2012 Dec 28.
3. Ely ER, Nicholson RE, Snow LC, Strugnell BW, Williamson SM, Milnes AS, Watson EN, Hoinville LJ. Evaluation of methods for measuring coverage and representativeness of an early-warning diseasesurveillance system. *Vet Rec.* 2012 Oct 27;171(17):423.
4. del Rocio Amezcua M, Pearl DL, Friendship RM, McNab WB. Evaluation of a veterinary-based syndromic surveillance system implemented for swine *Can J Vet Res.* 2010 October; 74(4): 241-251.
5. Wernike K, Hoffmann B, Beer M. Single tube multiplexed molecular detection of endemic porcine viruses in combination with a background screening for transboundary diseases. *J Clin Microbiol.* 2013 Jan 9.
6. Willeberg P, Nielsen LR, Salman M. Designing and evaluating risk-based surveillance systems: potential unwarranted effects of applying adjusted risk estimates. *Prev Vet Med.* 2012 Jul 1;105(3):185-94.
7. Meriardi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S, Pozzi P, Spaggiari B, Martelli P. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Vet J.* 2012 Jul;193(1):234-9.
8. Maria del Rocio Amezcua, David L. Pearl, Robert M. Friendship, and W. Bruce McNab Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Vet J.* 2012 Jul;193(1):234-9.
9. Seddon YM, Guy JH, Edwards SA. Optimising oral fluid collection from groups of pigs: effect of housing system and provision of ropes. *Vet J.* 2012 Jul;193(1):180-4.
10. Sanchez-Vazquez MJ, Strachan WD, Armstrong D, Nielen M, Gunn GJ. The British pig health schemes: integrated systems for large-scale pig abattoir lesion monitoring. *Vet Rec.* 2011 Oct 15;169(16):413.
11. Schemann AK, Hernandez-Jover M, Hall W, Holyoake PK, Toribio JA. Assessment of current diseasesurveillance activities for pigs post-farmgate in New South Wales. *Aust Vet J.* 2010 Mar;88(3):75-83.
12. Stlrk KD, Nevel A. Strengths, weaknesses, opportunities and threats of the pig health monitoring systems used in England. *Vet Rec.* 2009 Oct 17;165(16):461-5.

1. Adrienne W. Paton and James C. Paton. 1998. Detection and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):598.
2. Ambrose L Cheung, Arnold S Bayer, Gongyi Zhang, Hattie Gresham, and Yan-Qiong Xiong. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 40:1-9.
3. Anja Hummel, Wilhelm H. Holzappel, Charles M.A.P. Franz. 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology.* 30:1-7.
4. Armin Saalmüller, Matthias J. Reddehase, Hans-Jörg Böhring, Stipan Jonjić, Ulrich H. Koszinowski. 1987. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *European Journal of Immunology.* 17:1297-1301.
5. Charlene R. Jackson, Paula J. Fedorka-Cray and John B. Barrett. 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 42(8):3558.
6. Creemers PC. 1987. Determination of co-expression of activation antigens on proliferating CD4+, CD4+CD8+ and CD8+ lymphocyte subsets by dual parameter flow cytometry. *J. Immunol.* 97:165-171.
7. Danbing Ke, François J. Picard, Francis Martineau, Christian Monard, Paul H. Roy, Marc Ouellette and Michel G. Bergeron. 1999. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 3497-3503.
8. Diego Cariolato, Christian Andrighetto, Angiolella Lombardi. 2008. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control.* 19(9)886-892.
9. Garner W, Tobias Kasser, Saalmüller A. 2009. Porcine T lymphocytes and NK cells - An update. *Dev. Comp. Immunol.* 33:310-320.
10. H. Y. Tsen, C. K. Lin, and W. R. Chi. 1998. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primers for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *Journal of Applied Microbiology.* 85:554-560.
11. Higgs DA. 1981. Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Vet Bull.* 51:926-963.
12. M. P. Rodríguez-Carreño, L. López-Fuertes, C. Revilla, A. Ezquerro, F. Alonso, J. Domínguez. 2002. Phenotypic characterization of porcine IFN- $\gamma$ -producing lymphocytes by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* 259:171-179.
13. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. 2001 Multiplex PCR for the detection of

tetracycline resistant genes. *MolCellProbes*.15(4):209–215.

14. P. Poeta, D. Costa, Y. Slenz, N. Klibi, F. Ruiz-Larrea, J. Rodrigues and C. Torres. 2005. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal *J. Vet. Med.* 52:396-402.
15. Vanessa Vankerckhoven, Tim Van Autgaerden, Carl Vael, Christine Lammens, Sabine Chapelle, Rosaria Rossi, Daniela Jabes and Herman Goossens. 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 42(10):4473.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.