

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001469-01

**돼지생식기호흡기증후군(PRRS)
발생 위험도 평가 프로그램 개발
및 바이러스 단백질 기능 저해제
개발 최종보고서**

2016. 12. 12.

주관연구기관 / 전북대학교 산학협력단

위탁연구기관 / 농림축산검역본부

협동연구기관 / (주) 이지팜

협동연구기관 / 계명대학교 산학협력단

협동연구기관 / (주) 동방

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지생식기호흡기증후군(PRRS) 발생 위험도 평가 프로그램 개발 및 바이러스 단백질 기능 저해제 개발”(개발기간 : 2013.08.26 ~ 2016.08.25)과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2016.09.30.

주관연구기관명	: 전북대학교 산학협력단	(대표자) 곽용근 (인)
위탁연구기관	: 농림축산검역본부	(대표자) 박봉균 (인)
협동연구기관	: (주) 이지팜	(대표자) 김영국 (인)
협동연구기관	: 계명대학교 산학협력단	(대표자) 남재열 (인)
협동연구기관	: (주) 동방	(대표자) 이각모 (인)

주관연구책임자	: 김원일
위탁연구기관	: 차상호
협동연구기관	: 박흔동
협동연구기관	: 서영호
협동연구기관	: 이지훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313005-3	해당 단계 연구 기간	2013.08.26. 2016.08.25	단계 구분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	중사업명	기술사업화지원사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명	돼지 생식기 호흡기 증후군(PRRS) 발생 위험도 평가 프로그램 개발 및 바이러스 단백질 기능 저해제 개발			
	세부과제명				
연구책임자	해당단계 참여 연구원 수	총: 39명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 400,000천원 민간: 133,334천원 계: 533,334천원	
	총 연구기간 참여 연구원 수	총: 134명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 1,200,000천원 민간: 400,002천원 계: 1,600,002천원	
연구기관명 및 소속부서명	진북대학교 산학협력단			참여기업명 (주)이지팜 (주)동방	
위탁연구	연구기관명: 농림축산검역본부			연구책임자: 김원일	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집 <ul style="list-style-type: none"> - 전국 542개 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 특성 분석 - PRRSV 110주 분리 및 542주 ORF5 유전자 분석 - 국가동물방역시스템(KAHIS)에 PRRSV 바이러스 및 유전자 बैं킹 시스템 구축 ○ 한국형 PRRS 위험도 평가 프로그램 및 발생지도 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> - PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발 - PRRS 발생 지도 시스템 구축 및 휴대폰앱 개발 ○ PRRS 항바이러스 물질 개발 및 효능과 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 실험실적으로 효능과 안전성이 증명된 후보물질 7종 선발 - 그 중 4종의 물질은 돼지를 이용하여 효능 및 안전성 평가 수행 - 선발 물질들의 용해도 개선법 및 활성 평가법 구축 				보고서 면수 223	

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한국형 양돈장 PRRS 발생 위험도 평가 웹기반 프로그램 개발 및 효용성 검증 ○ PRRS 발병지도 구축 ○ 면역지표 분석을 통한 국내 PRRSV의 면역학 및 병리학적 특성 분석 ○ 국내 PRRSV의 신규 치료 물질 2종 이상 개발 및 효능 평가 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집 <ul style="list-style-type: none"> - 전국 541개 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 PRRSV 발생 양돈장의 특성을 분석 - PRRSV 110주 분리 및 542주 ORF5 유전자 분석 - PRRSV의 면역학적 병리학적 특성 분석 방법 구축 - 국가동물방역시스템(KAHIS)에 PRRSV 바이러스 및 유전자 बैं킹 시스템의 구축 - NGS를 이용한 효과적인 PRRSV 전체염기서열 분석 시스템 구축 - PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 개발을 위한 농장 평가 설문서 개발 - 양돈장 방문조사를 통한 PRRS 위험도 평가 관련 역학정보 수집 ○ 한국형 PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 및 PRRS 발생 지도 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발 - 프로그램의 유용성 확보를 위한 양돈장 PRRS 조사용 설문서 입출력 관리 시스템 개발 - 웹 평가시스템 디자인 개선 및 조사대상 양돈장에 대한 정보제공 시스템 확립 - 평가모형의 타당성 검증을 위한 양돈장 대상 실증 연구 - PRRS 위험도 평가분항 중요도 분석 (로지스틱 회귀 단변량, 다변량 분석) - PRRS 위험도 평가 프로그램과 양돈생산관리프로그램 연계 사업화 - 양돈장 현지조사를 통하여 PRRS 위험수준 평가 DB 기반의 위험평가 prototype 모델 개발과 국내 PRRS 발생지도 작성 및 클러스터링 분석 - PRRS 발생 지도 시스템 구축 및 실시간 확인이 가능한 휴대폰앱 개발 - PRRS 발생 지도 휴대폰앱의 전북대학교 동물질병진단센터에서 자체 사업화 ○ PRRS 억제 항바이러스 물질 개발 및 효능과 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 후보물질의 항바이러스 효능 및 안전성 평가를 위한 실험실 및 동물실험 평가기법 확립 - 항바이러스 물질의 약리학적 특성 분석 및 체내 잔류 평가기법 확립 - 세포를 이용한 실험실적인 평가법에서 효능과 안전성이 인정된 후보물질들을 7종을 선발하였고 이중 4종의 물질은 목표동물인 돼지를 이용하여 항바이러스 효능 및 안전성에 대한 평가를 수행함 - 선발물질 중 용해도에 문제가 있는 물질들에 용해도 개선법 및 활성 평가법 구축 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연간 최소 100개 국내 양돈장의 PRRS 감염 상황 및 유행 바이러스의 유전형 및 병원성 자료 확보를 통해 방역 및 백신 개발 전략 수립에 유용하게 활용될 것으로 기대됨 ○ 국내 유행 PRRSV의 분리와 बैं킹시스템 구축에 의한 향후 기초연구와 바이러스 제어 기술 개발에 활용 ○ 개발된 PRRSV 발병지도와 질병 발생 위험도 평가 프로그램의 사업화를 통한 국내 PRRSV의 변이와 양돈장의 사육환경 변화에 대한 분석의 지속화 ○ PRRSV의 실험실적 면역지표 분석법의 개발을 통한 향후 바이러스 감염 억제 기술 개발에 활용 ○ PRRSV 신규 치료 물질 선별을 통한 향후 PRRSV 치료제 개발의 사업화 추진 					
중심어 (5개 이내)	돼지생식기호흡기 증후군	발병지도	질병 발생 위험도 분석	치료 물질	청정화	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development and evaluation of a Korean version of PRRS outbreak risk assessment program ○ Development of PRRS outbreak mapping system ○ Immunopathological characterization of Korean PRRSV isolates by analyzing immunological parameters ○ Development and selection of antiviral materials against PRRSV based on cell cultures and animal evaluation system 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Monitoring and analysis of swine farms with PRRS outbreak in Korea <ul style="list-style-type: none"> - Characterization of 541 PRRS-positive swine farms to assess outbreak patterns and information - Isolation of 110 PRRSV isolates and completion of ORF5 sequencing on 542 PRRSV-positive clinical samples - Construction of PRRSV isolate and PRRSV genetic information banking systems - Development of questionnaires to construct PRRS outbreak risk assessment program - Data collection for PRRS outbreak risk assessment by farm visiting ○ Development and evaluation of a Korean version of PRRS outbreak risk assessment program and PRRS outbreak mapping system <ul style="list-style-type: none"> - Development of a Korean version of PRRS outbreak risk assessment program - Evaluation of the credibility of the assessment system based on farm application - Analysis on the importance of each question in the questionnaire - Commercialization of the risk assessment program by connecting with farm production management program - Development of PRRS outbreak mapping system and a smartphone application - Commercialization of the PRRS outbreak mapping system ○ Development and selection of antiviral materials against PRRSV <ul style="list-style-type: none"> - Development of cell cultures and animal evaluation system - Selection of 7 antiviral materials based on cell cultures evaluation system - Selection of 4 antiviral materials based on animal evaluation system - Enhancement of solubility and activity of the selected materials 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Enhancement of biosecurity and vaccine development strategies ○ Application of PRRS isolate and genetic information banking system for future research on virus control ○ Conjugation of assessment and evaluation systems to develop virus control techniques ○ Commercialization of the selected antiviral materials to treat and prevent PRRSV infection 				
Keywords	PRRS	Outbreak map	PRRS outbreak risk assessment system	Antivirals	Eradication

< Contents >

Chapter 1. Project introduction	1
1. Purpose of project	1
2. Rationale of project	1
3. Scope of project	6
Chapter 2. Domestic and international research environment	
1. Present research, patent, and market	7
Chapter 3. Research results	13
1. Monitoring of PRRS outbreak in korean and construction of PRRSV isolate and genetic information banking systems	13
2. Development of PRRS outbreak mapping system and PRRS outbreak risk assessment program	40
3. Development and selction of antiviral materials against PRRSV	146
4. Discussion and conclusion	191
Chapter 4. Achievement and contribution of research results	199
1. Achievement	199
2. Contribution to respective research area	200
Chapter 5. Application plan of research results	205
Chapter 6. Information collected during project performance	207
Chapter 7. Security levels of the project	211
Chapter 8. Research facilities constructed during project performance	213
Chapter 9. Safety assurance plan	215
Chapter 10. Representative research achievement	217
Chapter 11. Miscellanies	219
Chapter 12. References	221

< 목 차 >

제 1장. 연구개발과제의개요	1
제 1절. 연구개발 목적	1
제 2절. 연구개발의 필요성	1
제 3절. 연구개발 범위	6
제 2장. 국내외 기술개발 현황	7
제 1절. 논문, 특허, 시장 분석을 통한 국내외 기술 및 시장 현황	7
제 3장. 연구수행 내용 및 결과	13
제 1절. 국내 PRRSV의 특성 분석과 유전자 및 바이러스 बैं킹 시스템의 구축	13
제 2절. PRRS 발병지도 작성을 위한 국내 양돈장의 사육환경 평가와 한국형 질병발생 위험도 평가 프로그램 개발	40
제 3절. PRRSV 감염 억제 천연물 유도체 및 합성물질 개발 및 평가와 현장 적용법 개발	146
제 4절. 3년간 연구수행 내용 및 연구성과 종합평가	191
제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	199
제 1절. 목표달성도	199
제 2절. 관련분야 기여도	200
제 5장. 연구결과의 활용계획 등	205
제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	207
제 7장. 연구개발성과의 보안등급	211
제 8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	213
제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	215
제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	217
제 11장. 기타사항	219
제 12장. 참고문헌	221

<별첨> 자체평가의견서

제 1장. 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제 1절. 연구개발 목적

1. 병원성 및 유전자 정보를 포함한 발병지도 작성
2. 작성된 지도를 토대로 한국형 양돈장 질병발생 위험도 평가 웹기반 소프트웨어 프로그램 개발 및 효용성 검증
3. 면역지표 분석을 통한 PRRSV의 감염 억제기술 개발
4. 국내 PRRSV의 신규 치료 물질 2종 이상 개발 및 효능 평가

제 2절. 연구개발의 필요성

1. 연구과제 개요

가. 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: PRRS)은 돼지에서 유산, 생식기능 저하, 호흡기 증상에 의한 비육저하 및 폐사를 일으키는 질병으로, 우리나라를 포함한 전 세계 양돈 산업에 엄청난 경제적인 피해를 주고 있으며 현재 가장 중요한 바이러스 질병중의 하나로 간주되고 있다. 이 같은 질병의 중요성 때문에 PRRS의 원인체인 PRRS 바이러스를 발견한 이후 약 20년 동안 이 바이러스에 대한 예방법을 개발하기 위하여 많은 노력이 투자되었음에도 아직까지 효과적인 예방법 및 관리법이 개발되어지지 않은 실정이다. PRRS 바이러스의 제어가 힘든 가장 주된 이유는 1) 유전적으로 다양한 PRRS 바이러스가 바이러스들 간의 교차면역의 부재로 지속적인 재감염이 일어나고 있으며; 2) PRRS 바이러스의 면역반응과 병원성이 유전형에 따라 다양하며; 3) 시판되고 있는 약독화 백신이 빠르게 강독의 야외주 바이러스로 회귀하는 것이다. 따라서 이러한 문제점으로 인한 효과적인 방어법의 부재와 국내에 유행하는 바이러스의 정확한 정보의 부재 및 국내 양돈장의 PRRS 유입 위험도의 분석 및 예상이 어렵다는 점이 PRRS의 청정화로 가는 길에 큰 걸림돌이 되고 있다.

나. 본 연구과제에서는 PRRS 청정화를 이루기 위한 이러한 문제점들을 해결하기 위해 크게 네 가지의 최종 목표를 가지고 진행될 예정이다. 즉, 1)국내에 발생하는 PRRSV의 유전형과 병원성 및 면역학적인 특성을 파악하고 전국 양돈장의 PRRS 감염실태 및 사육환경을 평가하여 국내의 PRRS 발병지도를 구축하고 PRRS 감염에 대한 방역 및 예방법 개발에 근간을 구축하고자 한다. 또한 이러한 바이러스의 특성과 양돈장의 사육환경에 대한 자료를 바탕으로 2)한국형 질병 발생 위험도 평가 프로그램을 개발하여 국내 양돈장의 PRRS 감염에 대한 대응 전략(청정화 또는 안정화 추진 결정)을 수립하는 데 도움을 주고자 한다. 모든 및 자돈에서의 PRRS 감염 제어기술 개발과 관련하여 본 과제에서는 장차 백신과 예방법 개발에 필수적인 3)실험실적인 면역지표 분석법을 개발하여 본 과제 수행을 통해 분리된 국내 바이러스들을 이용하여 효용성을 증명할 것이며, 변이가 적은 PRRS 바이러스의 필수 단백질의 기능을 억제할 수 있는 4)신규 치료물질을 개발하고 효능을 검증하고자 한다.



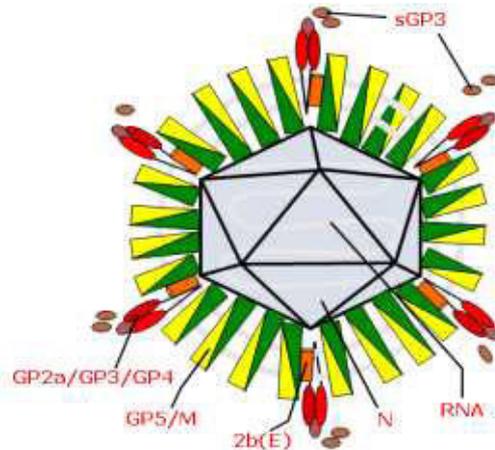
<PRRS 청정화를 위한 본 연구과제의 개발 목표>

2. 국내외 연구현황과 문제점

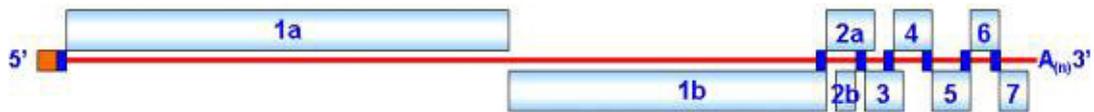
가. PRRS 바이러스의 분류 : PRRS 바이러스는 말의 Equine arteritis virus (EAV)와 영장류의 Simian hemorrhagic fever virus (SHFV) 등과 같은 Arteriviridae family에 속하며 Coronaviridae와 같이 Nidovirales order로 분류된다. PRRS 바이러스는 대략 15 kb의 positive, single-strand RNA 유전자를 가진 envelope 바이러스로 유전적으로 30% 이상 차이를 보이는 North American PRRS 바이러스 (북미주, type II)와 European PRRS 바이러스 (유럽주, type I)로 구분되며 두 type은 항원적으로 또한 매우 다른 것으로 알려져 있다.

나. PRRS 바이러스의 구성 : PRRS 바이러스는 최소 10개의 open reading frame (ORF)를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. ORF 1a와 1b는 바이러스의 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 nsp (비구조단백질, nonstructural protein) 1a와 1b 및 2-12 등의 13개의 비구조단백질을 생산하며 ORF 2-7는 구조단백질을 생산한다. 이들 구조단백질 유전자 중 ORF 2a, 3와 4는 각각 GP2a, GP3와 GP 같은 minor envelope 단백질을 생산하며 이들 세 단백질들은 바이러스 envelope 상에서 heterotrimer (GP2a/GP3/GP4) 구조를 이루고 있다. 나머지 minor envelope 단백질은 GP2b 또는 E 단백질은 ORF2a에 포함된 ORF2b에 의해 생산되며 ion channel의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. ORF 5와 6는 각각 major envelope (GP5) 단백질과 membrane (M) 단백질을 생산하며 이 두 단백질은 heterodimer (GP5/M) 구조로 envelope 상에 존재한다. 이들 envelope 위의 heterotrimer와 heterodimer 구조들은 바이러스와 세포 간의 결합에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 바이러스 중화항체 생성과 바이러스 독력에 밀접하게 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 마치

따라서 ORF7은 바이러스의 nucleocapsid (N) 단백질을 생산한다. 바이러스 감염 초기에 N 단백질에 대하여 높은 수준의 항체가 생산되지만 이들 초기 항체들은 바이러스의 중화 작용이 없는 항체들이다.



<PRRS 바이러스 입자의 구조>



<PRRS 바이러스 유전자의 구성>

다. PRRS 바이러스의 다양한 유전형 : PRRS 바이러스는 미국에서 1987년에 처음으로 발견되었고, 그 후 몇 년 뒤인 1991년에 네델란드에서 확연히 다른 type의 PRRS 바이러스가 발견되었다. 이 후에 미국에서 발견된 type은 북미주 (North American 또는 type II)로 유럽에서 발견된 type은 유럽주 (European 또는 type I)로 분류가 되었다. 이들 PRRS 바이러스들은 유전적으로 매우 다양해서 North American type과 European type의 바이러스들은 유전적으로 30% 이상의 차이를 보이는 것은 물론이고, 같은 type의 PRRS 바이러스들도 일반적으로 5-20%의 유전적 차이를 보인다. 이와 같이 유전적으로 다른 두 바이러스들 간에는 효과적인 교차방어가 성립되지 않으므로 이 전에 PRRS 바이러스에 감염이 되었다하더라도 다른 유전형의 PRRS 바이러스에 의해 재감염이 빈번히 일어난다. 따라서 현재 시판되고 있는 약독화 백신들 (Ingelvac® PRRS MLV와 Ingelvac® PRRS ATP)은 유전적으로 다른 PRRS 바이러스들의 감염을 효과적으로 방어할 수가 없는 것으로 알려져 있다. 최근에 본 연구진은 다양한 PRRS 바이러스들 간의 교차면역에 대한 reverse genetics을 이용한 연구를 통하여 ORF 2-6의 구조단백질 유전자들이 다양한 PRRS 바이러스들 간의 교차중화항체 생성에 중요한 역할을 하고 있으며, 특히 ORF3, ORF5, 및 ORF6가 교차면역반응을 유도하는데 중요하다는 것을 밝혀내었다.

라. PRRS 바이러스의 다양한 면역반응과 병원성 : PRRS 바이러스에 대한 방어에는 중화항체와 interferon-gamma를 분비하는 T cell의 작용이 모두 중요한 것으로 알려져 있다. 하지만, 다양한 유전형의 PRRS 바이러스들은 동물에 감염 시에 다양한 수준의 면역반응을 일으킨다. 즉, 많은 PRRS 바이러스들이 감염 후에도 inflammatory cytokines과 type I interferon을 생산하지 않고 이 후에도 높은 중화항체거나 interferon-gamma를 분비하는 T cell를 생산하지도 않는 반면, 어떤 PRRS 바이러스들은 높은 수준의 중화항체와 interferon-gamma를 생산하여 높은 방어면역을 일으키기도 한다. 최근의 일련의 연구들에 의해 PRRS 바이러스의 nsp1 β 가 inflammatory cytokines과 type I interferon의 분비와 관계가 있음이 밝혀졌지만 이러한 바이러스 간의 차이를 설명할 수 있는 정확한 유전자의 위치는 아직 알려지지 않았다. 또한 PRRS 바이러스들은 유전형에 따라 다양한 병원성을 보이는 것으로 보고가 되어있지만 병원성에 따른 바이러스의 체계적인 분류법이 개발되어 있지 않고 이러한 다양한 병원성의 기전은 아직 밝혀지지 않았다.

마. PRRS 바이러스 백신과 예방법 : 능동적으로 증식하지 않는 불활화 백신 또는 ORF5 단백질 등의 일부 바이러스 단백질을 이용한 recombinant 백신은 효과적인 방어면역을 유도하지 못함으로 약독화 백신이 많이 사용되고 있다. 하지만, 시판되는 약독 백신들은 매우 빠르게 강독의 야외주 바이러스로 회귀해 버려 백신을 사용한 농장에 전파되어 또 다른 문제를 야기하기도 한다. 본 연구진은 이러한 약독 백신들의 야외주 바이러스의 회귀에 대한 연구를 바탕으로 PRRS 바이러스의 독력을 결정하는 유전자를 찾아내었고, 이 들 유전자를 PRRS 바이러스 infectious cDNA clone에 도입하여 백신 platform을 개발하였다. 하지만, 안정성이 높은 백신을 생산하기 위하여서는 약독화 백신의 강독 바이러스로의 변이를 막아내는 방법에 대한 연구가 시급하다. 또 다른 PRRS 바이러스에 대한 예방법으로, 시판되는 약독 백신들이 다양한 PRRS 바이러스들의 감염을 효과적으로 방어하지 못 하기 때문에 바이러스에 감염된 돼지의 혈청을 같은 농장의 돼지에 접종하여 바이러스에 노출시키는 serum therapy도 많이 이용되고 있다. 하지만, 이 방법은 강독의 야외주 바이러스를 그대로 씌므로 높은 위험이 따르고 다른 유전형의 유입을 빨리 알 수 있고 관리할 수 있는 시스템이 잘 갖추어진 농장에서 제한적으로 사용되어야 한다. PRRS 바이러스 단백질을 adenovirus 등에 도입하여 생산된 백신들도 마우스에 접종하였을 때 PRRS 바이러스 특이 면역을 일으키는 데는 성공하였으나 돼지를 이용한 동물실험에서는 괄목할 만한 성과를 얻지는 못하였다. PRRS 바이러스 유전자를 이용한 DNA 백신 또한 마우스 등을 이용한 실험에서 바이러스 특이 면역을 유도하는 데는 성공하였으나 실제로 돼지에서 상용화하기에는 현실적으로는 어려운 수준이다.

바. PRRS 국내 발생 양상 : PRRSV가 국내에 유입된 이후 급속히 확산되어 현재는 전국적으로 발생하고 있으며, 농장마다 다양한 변이주들이 동시에 감염되어 있는 경우가 대부분이다. 또한 농장 상황에 따라 다른 질병의 동시감염과 사양관리상의 스트레스 요인이 질병의 발병양상이 다양하게 나타나고 있다. 돼지호흡기생식기증후군(PRRS)은 단일질병으로 양돈업에 미치는 경제적 피해가 가장 큰 질병 중의 하나로 대부분의 국가에서 상재성으로 발생하고 있으며 한국은 약 1000억원의 직접적인 손실을 입고 있다.

사. 최근의 국내 양돈장의 PRRS 발생양상을 분석하면 다음과 같은 특징을 나타내고 있다.

- (1) 임상증상이 뚜렷하지 않은 준임상형 PRRS의 출현: 국내 유입초기에는 발생농장에 폭발적인 유사산과 자돈의 호흡기질병 악화로 인한 폐사율의 증가 등 뚜렷한 임상 증상을 유발하던 전형적인 급성형의 생식기 호흡기형이 많았다. 그러나 현재는 임상 증상이 뚜렷하지 않고 피해 정도도 명확하게 눈에 띄지 않는 준임상형으로 그 양상이 많이 바뀌어 졌다. 이에 따라 양돈업계 전반에 PRRS 질병에 대한 경각심이 저하되었고, 별다른 방역대책 없이 돼지를 사육하거나 판매, 이동하게 됨으로써 농장 내의 지속감염이나 타 농장으로의 질병 확산을 가속화하는 결과를 낳게 되었다.
- (2) 단독감염에서 복합, 만성형으로 변화: 호흡기질병이 만연해 있는 국내 양돈 상황에서 PRRS가 다른 세균성 또는 바이러스성 호흡기질병 원인체와 혼합감염되는 호흡기질병복합감염증(porcine respiratory disease complex, PRDC) 형태로 질병양상이 변화하고 있다. PRDC는 PRRS, 인플루엔자, 돼지췌코바이러스 및 마이코플라즈마가 주로 원발인자가 되며, 기타 세균성 호흡기질병이 혼합감염되어 복합적인 호흡기질병을 유발하는 것으로 외국에서도 많은 피해사례가 보고되고 있으며, 우리나라에서도 많은 농장에서 이러한 PRDC로 인한 피해를 호소하고 있는 실정이다. 또 일부 농장에서는 살모넬라병이 복합감염되어 40% 이상의 높은 육성돈 폐사로 인해 막대한 피해를 입고 있으며, 이 경우 부검소견이 돼지지열병과 유사하게 나타나기 때문에 당황하게 된다. 이러한 다양한 PRRS의 복합감염상황에서 적절한 피해 방지대책을 세우기 위해서는 무엇보다 정확한 진단이 우선되어야 하므로 가축질병 진단기관과 상의하여 정확한 진단을 받아야 한다. 최근에는 돼지췌코바이러스와 인플루엔자 바이러스의 발생동향이 심상치 않아 이들 질병까지 가세하고 있는 것으로 판단된다. 따라서 앞으로의 PRRS 및 호흡기질병의 방제를 위해서는 단일 원인체의 방어를 목표로 할 것이 아니라 PRDC의 방제차원에서 종합적인 호흡기질병 방제대책을 수립, 적용해야 PRRS 및 호흡기질병의 피해를 경감시킬 수 있다.
- (3) 북미형과 유럽형 그리고 다양한 변이주의 출현: 변이를 병원성의 각도에서 보면 2가지 방향 즉, 앞서 언급한대로 준임상형의 출현 등 병원성이 약한 쪽으로도 진행이 되지만, 90년대 후반 들어 미국에서 모든의 심한 폐사를 동반한 급성 PRRS(Acute PRRS, 또는 Atypical PRRS)의 예와 같이 병원성이 강한 쪽으로도 변이가 이루어질 수 있다는 사실을 주목해야 한다. 특히 최근 우리나라에서도 기존의 북미형 바이러스와 함께 유럽형의 바이러스가 동일농장에 감염되어 있는 경우가 많이 검색된다. 이러한 다양한 변이주의 출현은 향후 PRRS 질병에 대한 진단과 예방 등 방역대책을 수립, 추진하는데 큰 장애요인이 될 것이므로 이 부분에 대한 정부 및 학계의 지속적인 연구가 뒤따라야 될 것으로 판단된다.

제 3절. 연구개발 범위

1. 전국 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 사육 환경 평가

가. 연간 최소 100개 양돈장에서 가검물을 접수하여 PRRS 감염 상황 및 바이러스의 유전형 및 병원성 분석

나. 가검물 접수 양돈장의 위치, 사양 및 방역 환경 등의 정보 수집 및 평가

2. PRRSV의 발병지도 작성 및 바이러스 बैं킹 시스템의 구축

가. 전국 양돈장의 PRRS 감염 정보 및 바이러스 분석 자료를 바탕으로 PRRS 발병지도 작성

나. PRRSV 양성 가검물에서 바이러스를 분리하여 바이러스 बैं킹 시스템 구축

3. 한국형 양돈장 PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 개발 및 효용성 검증

가. 작성된 발병지도와 전국 양돈장의 사육 환경 평가 자료를 바탕으로 한국형 양돈장 질병 발생 위험도 평가 웹기반 소프트웨어 프로그램 개발

나. 최소 전국 100개 양돈장을 대상으로 개발 프로그램의 효용성 검증

4. PRRSV에 대한 실험실적 면역지표 분석 방법의 개발을 통한 감염 억제기술의 개발

가. PRRSV의 면역원성 및 교차방어면역 유도를 평가할 수 있는 실험실적 평가 방법 개발

나. 야외 가검물에서 분리된 바이러스들의 면역원성 및 교차방어 유도능 평가 및 분류

다. 국내 PRRSV를 이용한 면역지표 분석 방법의 효용성 검증

5. PRRSV의 신규 치료 물질 개발 및 효능평가

가. 변이가 잘 일어나지 않는 PRRSV의 필수 단백질들의 기능을 억제하는 치료 물질의 화학적 합성

나. 실험실적 방법을 이용한 생산 물질의 항바이러스성 효능 평가

다. 선발된 2종 이상 물질의 동물실험을 이용한 PRRSV에 대한 치료 및 방어 효능 평가

제 2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호 D-04

제 1절. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	질병 발생지도 및 위험도 평가 프로그램 개발	PRRS 치료 물질 개발 및 평가
Keyword	PRRS, outbreak, risk, assessment	PRRS, antiviral, drug
검색건수	31	166
유효특허건수	1	2
핵심특허 및 관련성	특허명	SYSTEM AND METHOD FOR DETECTING, COLLECTING, ANALYZING, AND COMMUNICATING EVENT-RELATED INFORMATION
	보유국	미국
	등록년도	2012
	관련성(%)	40
	유사점	질병을 포함한 다양한 사회문제에 대한 정보를 확인, 확보, 분석 및 소통하는 체계에 대한 특허
차이점	본 제안 과제에서 개발하고자 하는 프로그램은 PRRS 라는 질병에 대한 발생 및 발생 위험에 대한 평가 프로그램으로 목적과 적용에 많은 차이가 있음	
핵심특허 및 관련성	특허명	NUCLEIC ACIDS ENCODING VACCINES AGAINST THE PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV)
	보유국	미국
	등록년도	2010
	관련성(%)	40
	유사점	TGE 바이러스의 replicase 유전자를 이용한 PRRS 백신 개발에 대한 특허
	차이점	본 제안 과제에서 개발하고자 하는 신물질은 PRRSV의 증식에 중요한 단백질들의 기능을 저해하는 물질에 대한 것으로 목적과 적용에 많은 차이가 있음

제 2절. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		질병 발생지도 및 위험도 평가 프로그램 개발	PRRS 치료 물질 개발 및 평가
Keyword		PRRS, outbreak, risk, assessment	PRRS, antiviral, drug
검색건수		3	53
유효논문건수		3	12
핵심논문 및 관련성	논문명	Identifying questions in the American Association of Swine Veterinarian's PRRS risk assessment survey that are important for retrospectively classifying swine herds according to whether they reported clinical PRRS outbreaks in the previous 3 years.	Sulfated modification can enhance antiviral activities of Achyranthes bidentata polysaccharide against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in vitro.
	학술지명	Prev. Vet. Med.	Int. J. Biol. Macromol.
	저 자	Holtkamp DJ, Lin H, Wang C, O'Connor AM	Liu C, Chen H, Chen K, Gao Y, Gao S, Liu X, Li J
	게재년도	2012	2013
	관련성(%)	80%	60%
	유사점	질병 발생 위험도 평가 프로그램(PADRAP)을 운영한 지난 3년간의 양돈 수의사들의 프로그램에 대한 평가와 개선에 대한 내용을 출판	황화 Achyranthes bidentata polysaccharide (ABPS)의 세포에서의 PRRSV 증식 억제에 대한 논문
차이점	본 과제에서는 한국형 질병 발생 위험도 평가 프로그램 개발에 대한 내용으로 한국과 산업구조가 많이 다른 미국의 시스템과는 실제 개발 내용에서 많은 차이가 있음	본 제안 과제에서 개발하고자하는 신물질은 PRRSV의 증식에 중요한 단백질들의 기능을 저해하는 물질에 대한 합성 및 평가에 관한 것으로 개발하고자 하는 물질의 종류가 전혀 상이함	
핵심논문 및 관련성	논문명	Probability of freedom from disease after the first detection and eradication of PRRS in Sweden: scenario-tree modelling of the surveillance system	Antiviral activity of phage display selected peptides against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro.
	학술지명	Prev. Vet. Med.	Virology
	저 자	Frossling J, Agren EC, Eliasson-Selling L, Lewerin SS	Liu K, Feng X, Ma Z, Luo C, Zhou B, Cao R, Huang L, Miao D, Pang R, He D, Lian X, Chen P
	게재년도	2009	2012
	관련성(%)	40%	60%
	유사점	스웨덴 양돈장에서 PRRSV가 처음 발견된 후 감염을 근절하여 지속적으로 PRRS 음성을 유지할 수 있는 확률에 관한 논문	PRRSV의 polymerase와 helicase에 결합할 수 있는 펩타이드의 세포에서 PRRSV의 증식 억제에 관한 논문
차이점	본 과제에서는 한국형 질병 발생 위험도 평가 프로그램 개발에 대한 내용으로 한국과 산업구조가 많이	본 제안 과제에서 개발하고자하는 신물질은 PRRSV의 증식에 중요한 단백질들의 기능을 저해하는 물질에 대한 합성 및 평가에 관한 것으로	

		다른 스웨덴의 시스템과는 실제 개발 내용에서 많은 차이가 있음	개발하고자 하는 물질의 종류가 전혀 상이함
핵심논문 및 관련성	논문명	Analysis of the risk of introduction and spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through importation of raw pigmeat into New Zealand.	Natural compounds inhibiting the replication of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
	학술지명	N. Z. Vet. J	Antiviral Res.
	저자	Neumann EJ, Morris RS, Sujau M	Karuppannan AK, Wu KX, Qiang J, Chu JJ, Kwang J
	게재년도	2007	2012
	관련성(%)	20%	60%
	유사점	PRRSV가 돼지고기 수입에 의해 뉴질랜드로 유입될 위험도 분석에 대한 논문	12-deoxyphorbol 13-phenylacetate 20-acetate, ouabain, bufalin, valinomycin 등 네가지의 천연물의 세포에서 PRRSV의 증식 억제에 관한 논문
차이점	본 과제에서는 한국형 질병 발생 위험도 평가 프로그램 개발에 대한 내용으로 PRRSV의 발생이 없는 뉴질랜드의 시스템과는 실제 개발 내용에서 많은 차이가 있음	본 제안 과제에서 개발하고자하는 신물질은 PRRSV의 증식에 중요한 단백질들의 기능을 저해하는 물질에 대한 합성 및 평가에 관한 것으로 개발하고자 하는 물질의 종류가 전혀 상이함	

제 3절. 제품 및 시장 분석

1. 생산 및 시장 현황

가. 국내 제품 생산 및 시장 현황

(1) 질병 발병지도 및 위험도 평가 프로그램

- (가) 국내에는 PRRS 발병지도 및 위험도 평가 프로그램 상용화 서비스가 개발·서비스 되지 않고 있다.
- (나) 관련 시장으로는 제1협동 과제를 담당하고 있는 이지팜에서 웹 기반 양돈 생산관리 솔루션인 Pigplan을 상용화하여 서비스 하고 있으며 830개소의 양돈농가가 월 5만 5천원의 사용료를 지불하고 있다.

회사명	제품명	연간판매금액(천원)			비고
		2010년	2011년	2012년	
이지팜	Pigplan	19,800	400,000	547,800	국내제품

(출처 : 이지팜 내부자료)

(2) PRRS 백신 및 치료제

- (가) PRRS에 대해서는 현재 뚜렷한 치료제가 없어 백신에 의존하고 있는 실정이며, 국내에서 생산하는 PRRS 백신은 중앙백신연구소의 '수이샷 피알알에스' 한 개의 제품이다. 그러나 이 백신제품의 판매금액은 아래의 표에서 보는바와 같이 외국 백신제품에 밀려 최근 3년간 매년 감소하는 경향을 보이고 있다. 2011년 기준으로

PRRS 백신 시장 규모는 약 50억원이며, 이 중 외국 제품의 판매금액이 47억원으로 약 95%의 시장점유율을 보이고 있으며, 국내 제품의 23배 이상의 판매금액을 보이고 있는 실정이다. 따라서 PRRS 바이러스에 유효한 신규 치료물질 개발이 매우 시급하다. 우리나라 돼지는 약 1천만두로 연간 2회 정도 백신을 접종한다고 하면 2천만두분 정도가 총 시장규모로 볼 수 있다. 2011년 기준으로 2백8십만두분의 백신이 판매되었으므로 전체시장의 약 14% 정도이다. 따라서 PRRS 백신 시장의 총 규모는 연간 약 357억원 정도로 볼 수 있다.

회 사 명	제 품 명(백신)	연간판매금액(천원)			비 고
		2009년	2010년	2011년	
중앙백신연구소	수이샷 피알알에스	459,591	290,655	199,531	국내제품
베링거인겔하임 동물약품(주)	인겔백 피알알에스 생독	3,262,187	3,888,494	4,709,927	국외제품

(출처 : 사단법인 동물약품협회)

(나) 백신 이외의 제품으로 PRRS에 대한 면역증강제로는 ㈜동방의 ‘피닉스’ 주사제가 있는데, 이 제품은 2011년에 출시되었으며, 2011년 판매금액은 306,000천원(출처:사단법인 동물약품협회)이다. 출시 초반부터 관심을 많이 받았고, 국내 PRRS백신 제품보다 판매금액이 더 많았으며, 이는 시장에서 백신이외의 치료제를 원하고 있다는 것을 알 수 있다. 그러나 현재 시장에는 효능이 입증되지 않은 백신을 비롯한 많은 제품들이 난립하고 있어서 혼란스러운데, 효과가 확실하고 제대로 된 치료제 개발이 시급하다.

(다) 현재까지 PRRSV의 감염에 효과적인 제품이 개발되어 있지 않으므로 본 과제를 통한 새로운 물질의 선발은 국내의 축산업에서 PRRSV의 효과적인 관리와 예방에 큰 도움이 될 것이다.

나. 국외 제품 생산 및 시장 현황

(1) 질병 발병지도 및 위험도 평가 프로그램

(가) 국외에서 PRRS 발병지도 및 위험도 평가 프로그램으로 연구계획서에서 소개한 PADRAP 솔루션이 있다.

(나) PADRAP은 미국 오하이오주립대학에서 개발한 웹 기반 PRRS 발생을 억제 차단 방역 프로그램으로 공익적 목적을 가지고 서비스 되고 있으며 상용화된 솔루션은 아니다.

(1) PRRS 백신 및 치료제

(가) 국외 PRRS 백신 제품은 많은 다국적 기업들이 대부분 생산하고 있다. 이 중에서 현재는 베링거인겔하임 동물약품(주)의 백신만 국내에 판매되고 있으며, 그 판매량은 매년 증가하여 국내 PRRS백신 시장의 95%를 점유하고 있는 실정이다.

(나) 더욱이 다른 많은 다국적 기업들이 유럽형 PRRSV 항원을 포함하는 백신을 출시하려고 국내에 허가 등록 중에 있으므로 머지않아 외국 제품들의 수는 더 많아질

것이다. 이렇게 되면 국내 제품의 판매비중은 더욱 감소할 것이며, PRRS 시장을 빼앗길 우려까지 있다. 따라서 PRRS 바이러스에 유효한 억제제 및 치료제 개발이 시급한 실정이다.

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- (1) 이미 제품으로 출시되어 돼지 사육두수 기준으로 30%의 양돈농가가 사용하고 있는 Pigplan 솔루션과 연동하여 상용화 추진 중
- (2) Pigplan 프로그램 안에 PRRS 위험도 평가 모듈을 탑재하여 부가서비스로 부대비용을 사용료로 추가 징수 (1만원/월)
- (3) 본 과제를 통한 PRRSV의 신규 치료 물질은 국내의 축산업에서 PRRSV의 효과적인 관리와 예방에 큰 도움이 될 것이므로 빠른 시간 내에 이 물질들을 이용하여 제품화를 추진할 계획임
- (4) 본 과제에서 효능평가와 안전성 평가는 이루어지므로 제품화에 필요한 추가적인 안정성(stability)평가, 약동학적 평가 등을 추진하여 제품의 규격을 확립하고, 사용이 편리하도록 제형을 주사제, 첨가제 등 다양하게 개발하여 제품 인허가를 빠른 시간 내에 추진하여 제품화하는 것을 목표로 함
- (5) 제품화에는 협동기관인 (주)동방이 담당할 것인데, (주)동방은 동물용의약품 제조 및 판매회사로서, 농림축산식품부로부터 2002년 5월 29일에 동물용의약품품질관리우수업체(KVGMP)를 인증 받았음

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	2,250	2,300	2,350	2,400	2,450	11,750
경제적 파급효과	30,000	30,500	31,000	31,500	32,000	155,000
부가가치 창출액	10,000	11,000	12,000	13,000	14,000	60,000
합 계	42,250	43,800	45,350	46,900	48,450	226,750

제 3장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1절. 국내 PRRSV의 특성 분석과 유전자 및 바이러스 बैं킹 시스템의 구축

1. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집 (1차년도)

가. 전국 양돈장의 PRRS 감염상황 분석

(1) 양돈장에서 수집한 가검물들을 PCR과 ELISA 검사를 통하여 국내 양돈장의 PRRS 감염 상황을 분석

(가) 2013년 9월에서 2014년 5월까지 국내 양돈장에서 수거한 혈청 및 조직을 검사한 결과 228건의 가검물에서 PRRSV를 검출하여 성공적으로 유전자형을 분석하였다.

(나) 2013년 9월에서 2014년 5월까지 PRRS 발생 농장의 25%(57건)는 경남에 위치하고 있었고 강원(11건)과 제주(10건) 지역에서 가장 낮은 PRRS 발생이 검출되었음. 그 외 타 지역은 전체 발생의 약 10% 내외를 차지하고 있었다(그림 1-1).

(다) 2013년 9월에서 2014년 5월까지 검출된 PRRSV 유전형을 분석한 결과 유럽형(EU)이 가장 많았고 (102건, 44.7%) 북미형(NA)이 78건 발생하여 34.2%를 차지하였다. 유럽형과 북미형이 혼합 감염된 농장도 21.2% 총 48건이 검출되어 혼합 감염이 상당히 빈번하게 일어나는 것으로 분석되었다(그림 1-2).

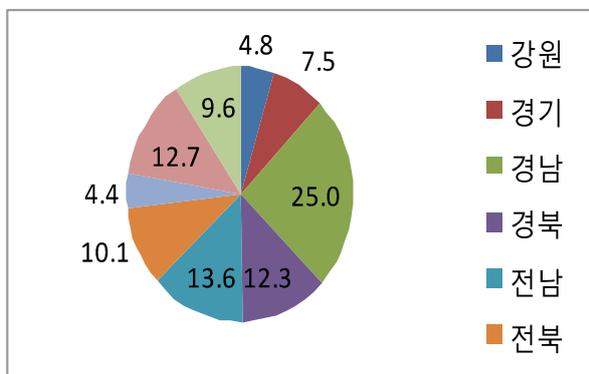


그림 1-1. 2013-2014년 PRRS 발생 농장의 위치

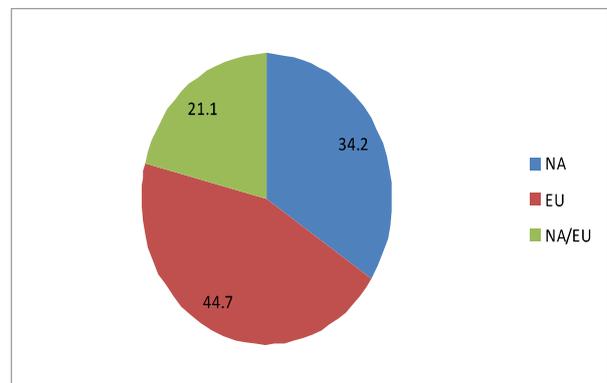


그림 1-2. 2013-2014년 발생 PRRSV type

(2) 지역별 발생 상황

(가) 2013년 9월에서 2014년 5월까지 국내 양돈장에서 검출된 PRRSV 분석 결과 제주도를 제외한 모든 지역에서 유럽형 단독, 북미형 단독 또는 두 유전형의 혼합 감염된 농장이 검출되었고 제주도에서는 유일하게 북미형 바이러스만이 검출되었다(그림 1-3).

(나) 전북, 전남 및 충북 지역에서 전체 중 40%에 해당하는 농장에서 유럽형 바이러스가 검출되었고 경기와 경북지역에서 52%와 67% 농장에서 북미형 바이러스가 검출되었다. 특이적으로 강원도와 경남에서 35% 이상의 농장에서 유럽형과 북미형 바

이러스의 혼합감염이 높게 검출되었다(그림 1-4).

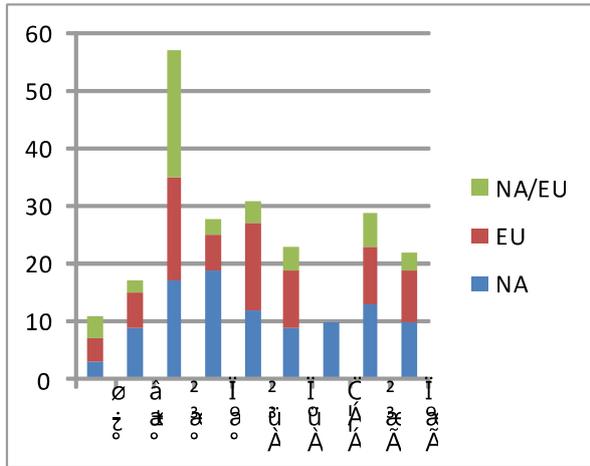


그림 1-3. 2013-2014년 지역별 PRRS 발생 건수 (Y=건수)

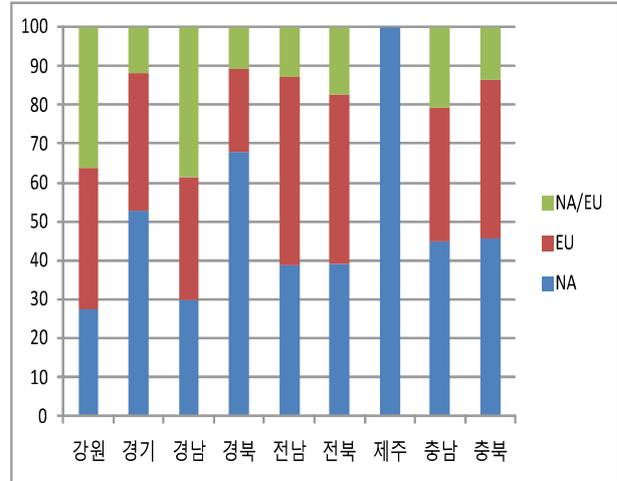


그림 1-4. 2013-2014년 지역별 발생 PRRSV 유전형 비율 (Y=%)

나. PRRSV의 분리와 바이러스 및 유전자 बैं킹 시스템의 구축

(1) PRRS 양성 가검물에서 바이러스를 분리하고 분리한 바이러스들의 효율적인 बैं킹 시스템 구축

- (가) 유전자 분석이 가능한 총 103개의 가검물로부터 PRRSV 항원타입(EU/NA) 확인 후, ORF5 RT-PCR 및 sequencing을 수행하여 80개의 sequencing 결과 확보
- (나) 현재 30주의 바이러스 분리를 수행하여 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁 및 기탁번호 부여 (표 1-1)

표 1-1. 2013-2014년 분리 및 등록 PRRSV strains

번호	학명	개체번호	지역_개체번호	항원타입	KVCC (기탁번호)
1	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12045-1	UN-12045-1	J1 (NA)	KVCC-VR1400017
2	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12045-2	UN-12045-2	J2 (NA)	KVCC-VR1400018
3	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12196-1	UN-12196-1	J3 (EU)	KVCC-VR1400019
4	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12196-2	UN-12196-2	J4 (EU)	KVCC-VR1400020
5	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12076-1	SE-12076-1	J5 (NA)	KVCC-VR1400021
6	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12030-2	JB-12030-2	J6 (NA)	KVCC-VR1400022
7	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12020-1	JB-12020-1	J7 (EU)	KVCC-VR1400023
8	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12042-1	JB-12042-1	J8	KVCC-VR1400024
9	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-2	JB-12298-2	J9 (NA)	KVCC-VR1400025
10	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13155-1	JB-13155-1	J10	KVCC-VR1400026
11	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13058-2	KK-13058-2	J11 (EU)	KVCC-VR1400027
12	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12020-2	JB-12020-2	J12 (EU)	KVCC-VR1400028
13	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12030-1	JB-12030-1	J13 (EU)	KVCC-VR1400029
14	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12034-2	JB-12034-2	J14 (EU)	KVCC-VR1400030
15	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12039-1	JB-12039-1	J15	KVCC-VR1400031
16	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12039-2	JB-12039-2	J16 (EU)	KVCC-VR1400032
17	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12076-2	SE-12076-2	J17 (NA)	KVCC-VR1400033
18	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12104-1	KK-12104-1	J18 (EU)	KVCC-VR1400034

19	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12277-1	UN-12277-1	J19 (EU)	KVCC-VR1400035
20	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-1	JB-12298-1	J20 (EU)	KVCC-VR1400036
21	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-3	JB-12298-3	J21 (EU)	KVCC-VR1400037
22	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-4	JB-12298-4	J22 (EU)	KVCC-VR1400038
23	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13049-1	KN-13049-1	J23 (EU)	KVCC-VR1400039
24	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13058-1	KK-13058-1	J24 (EU)	KVCC-VR1400040
25	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13065-2-2	JB-13065-2-2	J25 (EU)	KVCC-VR1400041
26	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13090-4,5	JB-13090-4,5	J26 (EU)	KVCC-VR1400042
27	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13185	KN-13185	J27 (NA)	KVCC-VR1400043
28	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13185	UN-13232	J28 (NA)	KVCC-VR1400044
29	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13232	KN-13255	J29 (NA)	KVCC-VR1400045
30	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13261	KN-13261	J30	KVCC-VR1400046

[참고: JB(전북), KN(경남), KK(경기도), SE(서울), UN(unknown)]

(2) ORF5 유전자 염기서열 분석 및 데이터베이스 구축

(가) 분리된 PRRSV의 ORF5 유전자를 분석, PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축

(나) 국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)에 등록 완료 : C14002081~C14002161

(다) 돼지 폐조직 또는 혈청에서 분리한 PRRSV 유럽주(경상도 13건, 전라도 14건, 경기도 10건, 충청도 4건)와 북미주(경상도 18건, 전라도 5건, 경기도 5건, 충청도 3건, 서울시 2건)의 ORF5 염기서열을 확보하였다. 확보된 ORF5 염기서열을 바탕으로, 현재까지 국내에서 분리된 PRRSV 야외분리주(57개)와 국외에서 분리된 PRRSV(20개)들간 염기서열의 상관관계를 확인하고자 multiple sequence alignment 와 phylogenetic analyses를 수행하였다.

(라) 그 결과, 유럽주(EU)로 확인된 PRRSV 분리주들은 “유럽주의 prototype인 Lelystad” 와 89% 이상의 유사성을 나타내었고, “북미주의 prototype인 VR2332”와는 58~63%의 유사성을 나타내었다.

(마) 또한, 북미주(NA)로 확인된 PRRSV 분리주들은 VR2332와 87% 이상의 유사성을 나타내었으며, Lelystad와는 59~62%의 유사성을 나타내었다. Phylogenetic tree를 이용하여 시각적으로 쉽게 구분할 수 있도록 나타내었다.

(바) Phylogenetic tree 분석 결과, 유럽주와 북미주 각각 한 개의 분리주에서 백신주와 같은 cluster에 포함되는 것을 알 수 있었다. 따라서, 이 분리주들은 백신주의 변이로 추정된다. 또한, 지리적으로 인접한 지역에서 분리된 바이러스들은 대부분 지역간 염기서열의 유사성은 보였지만, 유사성이 상이한 분리주들도 확인되었다. 또한, 이전에 분리된 국내 분리주와의 상관관계에서도 같은 지역에서 분리된 바이러스는 동일한 cluster에 포함되는 것으로 보아 이전 분리주들의 변이로 추정할 수 있다. 이제까지의 결과는 유전자 변이가 심하게 일어나거나 외부에서 유입된 바이러스는 없는 것으로 추정된다.

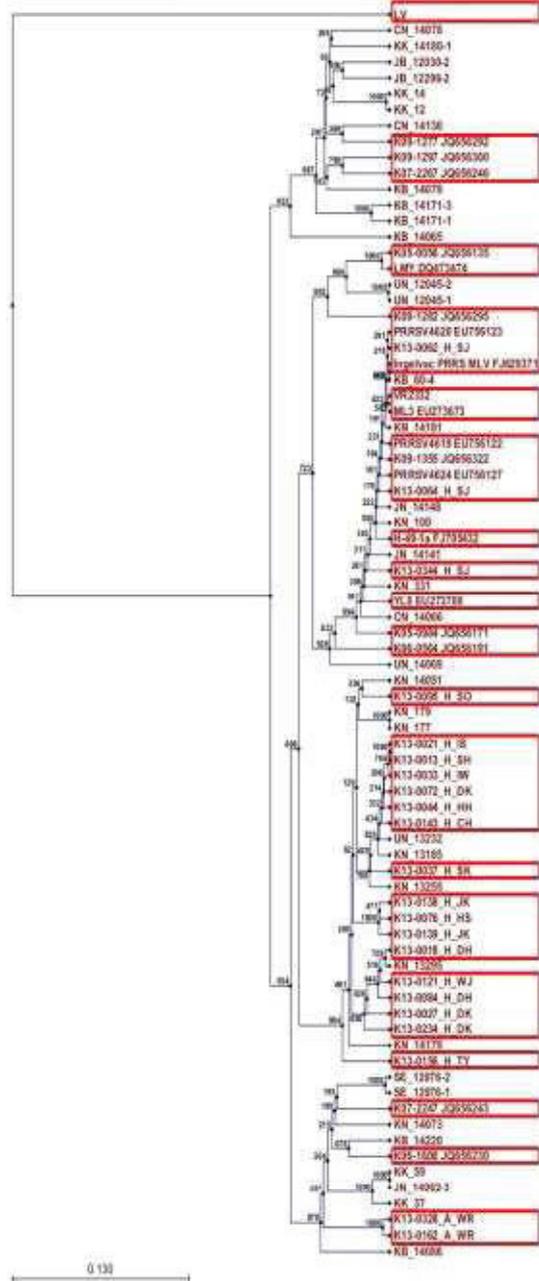
(2) 1차년도 검출 바이러스의 특징과 변이 경향

A. EU tupe



EU type

B. NA type



NA type

VS

< PRRS alignment tree >

다. 효과적인 PRRSV의 전체염기서열 분석 시스템 구축

(1) NGS system을 이용한 PRRSV의 full genomic sequencing

(가) PRRSV VR2332와 rVR strain을 이용하여 통상적인 방법으로 바이러스 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 NGS 반응에 이용함

(나) Ion Plus Fragment Library Kit & Ion Shear™ library kit(Life Technology, USA)를 이용하여 PCR을 수행한 후 밴드를 잘라 prep을 준비한 후 316chip에 반응시키고 염기서열을 분석함

(다) 칩을 이용한 분석 원리는 그림 1-5와 같음

(라) 반응 결과 높은 수준의 특이성이 관찰되어 기대한 전체 염기서열 분석 결과를 얻을 수 있었음(그림 1-6).

(마) 두 바이러스의 염기서열 분석 결과는 그림 1-7과 그림 1-8와 같음

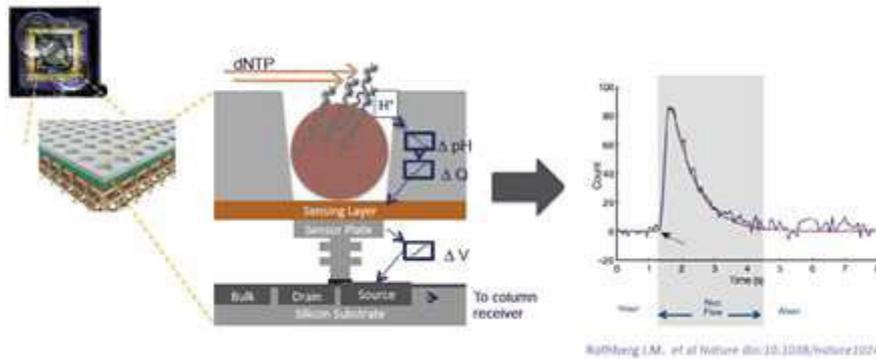


그림 1-5. PRRSV 전체 염기서열 분석을 위한 NGS 원리



그림 1-6. PRRSV 전체 염기서열 결과 분석도

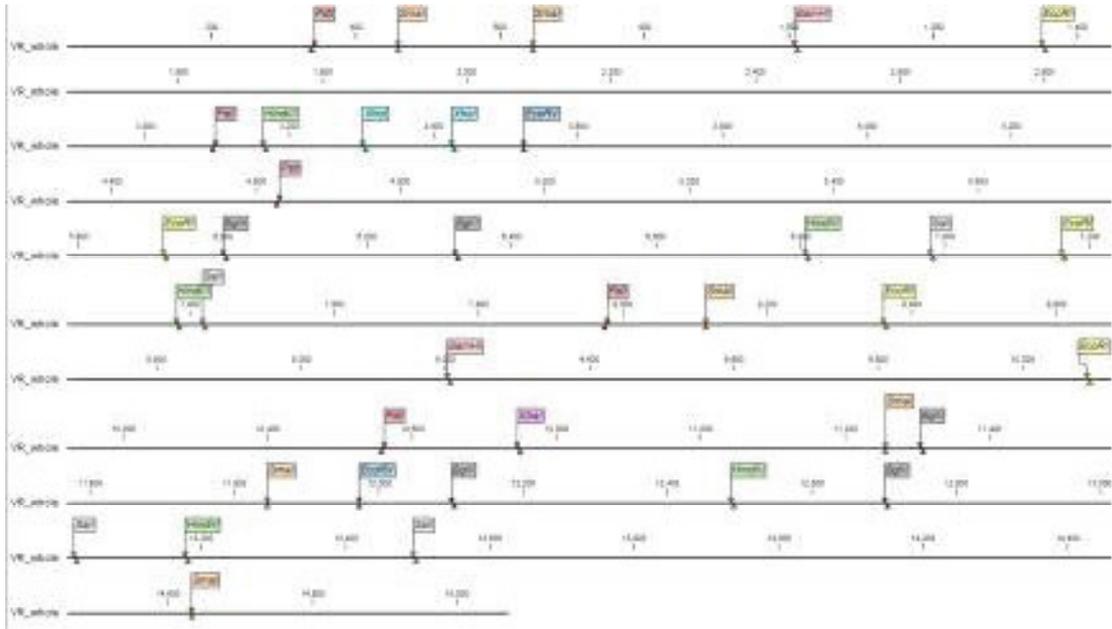


그림 1-7. PRRSV VR2332의 전체 염기서열 분석 결과 모식도

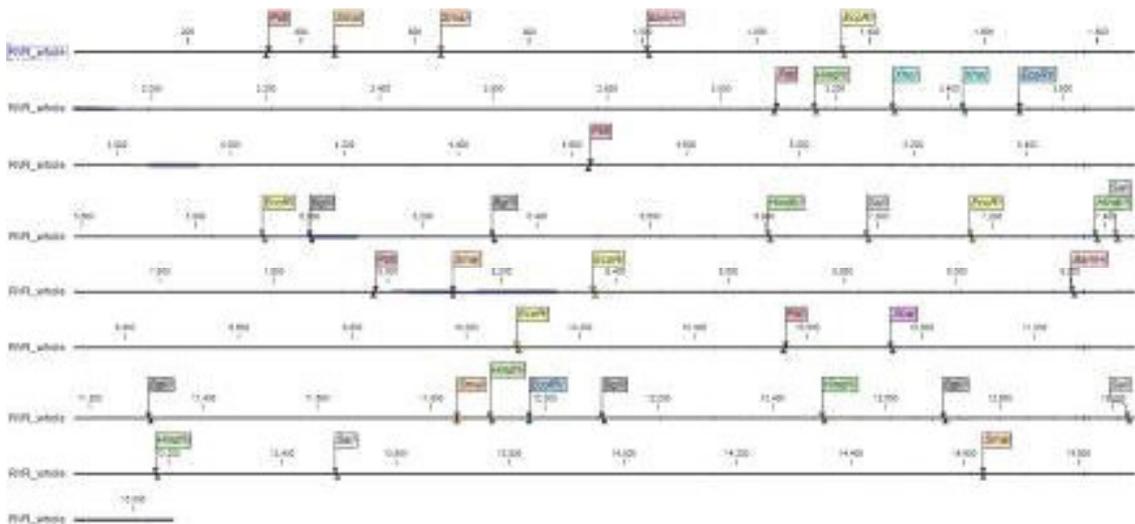


그림 1-8. PRRSV rVR의 전체 염기서열 분석 결과 모식도

(2) 분리한 PRRS 바이러스들의 효율적인 बैं킹 시스템 구축

- (가) NGS를 통해 얻은 PRRSV의 염기서열 전체에 대한 정보를 분석하여 बैं킹 시스템을 구축함
- (나) 이후 ORF5를 포함한 다양한 부위에서의 유전자 변이 여부를 검색하는데 활용가능 함

2. PRRSV의 실험실적 면역지표 분석방법 개발 및 면역원성 분석 (2차년도)

가. 전국 양돈장의 PRRS 감염상황 분석

- (1) 양돈장에서 수집한 가검물들을 PCR과 ELISA 검사를 통하여 국내 양돈장의 PRRS 감염 상황을 분석

- (가) 2014년 9월에서 2015년 5월까지 국내 양돈장에서 수거한 혈청 및 조직을 검사한 결과 389개 농장의 가검물에서 PRRSV를 검출하여 성공적으로 유전자형을 분석하

였다.

(나) 2014년 9월에서 2015년 5월까지 검출된 PRRSV 유전형을 분석한 결과 북미형 (NA)이 가장 많았고(140건, 36.0%), 유럽형(EU)이 116건 발생하여 29.8%를 차지하였다. 유럽형과 북미형이 혼합 감염된 농장도 34.2% 총 133건이 검출되어 혼합 감염이 상당히 빈번하게 일어나는 것으로 분석되었다(그림 1-8).

(다) 따라서 전 년도와 비교하여 북미형 및 유럽형 바이러스에 의한 단독감염의 비율이 각 유전형별 10% 정도 감소하였으나 두 유전형의 바이러스에 의한 혼합감염의 비율이 15% 이상 증가하는 것으로 분석되어 혼합감염의 비율이 점점 증가하는 것으로 분석되었다(그림 1-9).

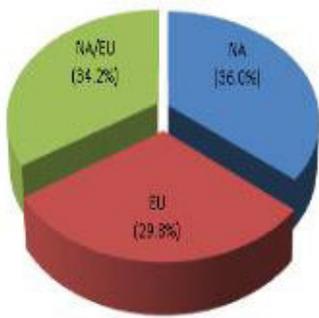


그림 1-8. 2014-2015년 PRRSV 유전형

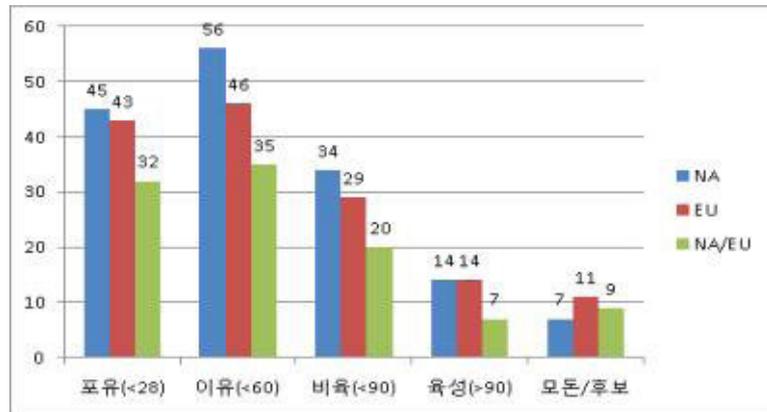


그림 1-9. 2014-2015년 연령별 PRRS 발생 현황

(2) 연령별 발생 상황

(가) 2013년 9월에서 2014년 5월까지 국내 양돈장에서 검출된 PRRSV 분석 결과 전 연령에 걸쳐 유럽형 바이러스 또는 북미형과 유럽형 바이러스에 의한 혼합감염이 전 년도와 비교하여 매우 증가한 양상을 보이고 있으며 포유 및 이유구간에서 발생이 가장 많은 것으로 보여 낮은 연령일수록 PRRSV 감염에 취약한 것으로 분석되었다 (그림1-10).

(나) 2013년 9월에서 2014년 5월까지 국내 양돈장에서 검출된 PRRSV 분석 결과는 실시간으로 1협동과제 연구팀에게 전달되어 국내 PRRS 발생지도 개발에 활용되었다.

나. PRRSV의 분리와 바이러스 및 유전자 बैं킹 시스템의 구축

(1) PRRS 양성 가검물에서 바이러스를 분리하고 분리한 바이러스들의 효율적인 बैं킹 시스템 구축

(가) 유전자 분석이 가능한 총 216개의 가검물로부터 PRRSV 항원타입(EU/NA) 확인하였다. Type 1(EU Type)은 110두, Type 2(NA type)는 80두, 그리고 Type 1/2(EU/NA)는 26두로 분류되었다.

(나) 현재 40주의 바이러스 분리를 수행하여 한국수의유전자은행(KVCC)에 기탁하였다 (표 1-2).(기탁번호는 현재 지정 중이며 7월까지 지정 가능 예상)

표 1-2. 2014-2015년 분리 및 등록 PRRSV strains

번호	학명	개체번호	지역	항원타입	KVCC (기탁번호)
1	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14136	CN	NA	
2	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14171-1	GB	NA	
3	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14181	GN	NA/EU	
4	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14220	GB	NA	
5	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	-	GN	EU	
6	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14078	CN	NA	
7	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14079	GB	NA/EU	
8	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14081	GN	EU	
9	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14086	GB	NA	
10	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14092	GB	NA	
11	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	-	GN	NA	
12	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14099	GN	NA	
13	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14145	JN	EU	
14	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14148	JN	NA	
15	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	-	GB	NA	
16	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14161	GG	NA/EU	
17	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14173	CN	EU	
18	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14179	GN	NA	
19	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14180-2	GG	EU	
20	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14324	CN	NA	
21	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14324	CN	NA	
22	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14336	GG	NA	
23	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14340	GG	EU	
24	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14340	GG	NA	
25	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14340	GG	EU	
26	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14352	JJ	NA	
27	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14356	JJ	NA	
28	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14360	JJ	EU	
29	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14363	JB	NA	
30	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14369	GB	EU	
31	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14374	GN	EU	
32	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14453	GG	NA	
33	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14460	GG	NA	
34	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14466	GG	NA	
35	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14404	GB	NA/EU	
36	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14332	JB	EU	
37	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14333	JN	NA	
38	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14353	JN	NA	
39	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14428	JB	NA/EU	
40	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14452	JB	NA	

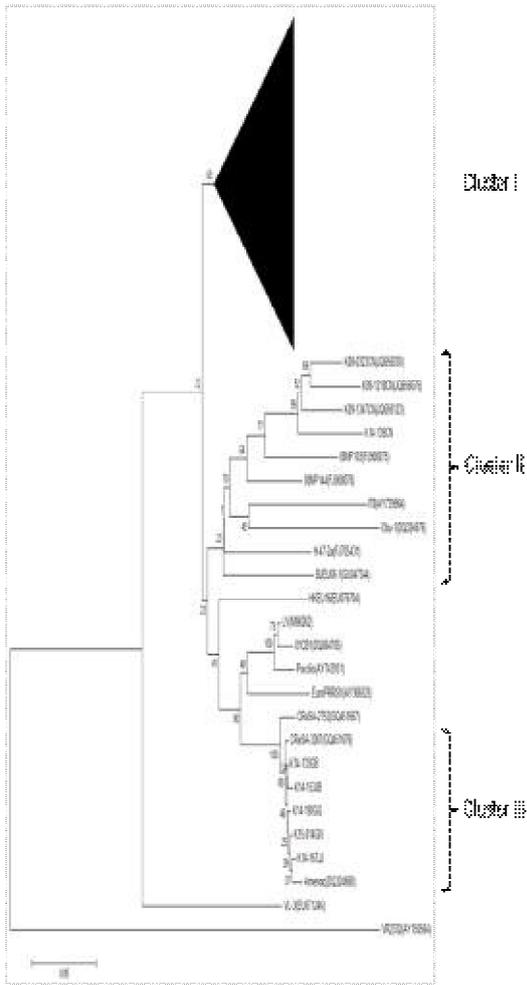
[참고: SE(서울), GG(경기도), KB(경북), KN(경남), JB(전북), JN(전남), JJ(제주), UN(unknown)]

* KVCC 폐지생식기호흡중후군(PRRSV) 40건 수의유전자원기탁신청완료

(2) ORF5 유전자 염기서열 분석, 데이터베이스 구축 및 검출 바이러스의 특징과 변이 경향

- (가) 분리된 PRRSV의 ORF5 유전자를 분석, PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축하였다. 국가동물방역통합시스템 (www.kahis.go.kr)에 2년차(2014~2015)에는 152개(C15002277~C15002440)를 등록하였다.
- (나) 검출된 바이러스 구조단백질(ORF5)에 대한 유전자 증폭 및 단백질 염기서열 분석하였다. 국내에서 검출된 국내에서 검출된 142개의 Type 1(EU Type) PRRSV와 Prototype virus(LV)간의 상동성 분석한 결과 Nucleotide는 85.15%~98.84%의 상동성을 보였고 Amino acid는 82.02%~98.02%의 상동성을 보였다. 연도별로 분석한 결과 2013년에 검출된 Type 1(EU Type) PRRSV는 Prototype virus(LV) 비교했을 때 83.47%~88.61%(NT)/84.65%~89.11%(AA)의 상동성을 보였고, 2014년에는 85.15%~98.84%(NT)/82.18%~98.02%(AA), 그리고 2015년에는 85.97%~94.39%(NT)/ 84.16%~93.07%(AA)의 상동성을 보였다 (표 1-2, 1-3).
- (다) 국내에서 검출된 국내에서 검출된 120개의 Type 2(NA Type) PRRSV와 Prototype virus(VR2332)간의 상동성 분석한 결과 Nucleotide는 82.59%~99.83%의 상동성을 보였고 Amino acid는 81.09%~99.50%의 상동성을 보였다. 연도별로 분석한 결과 2013년에 검출된 Type 2(NA Type) PRRSV는 Prototype virus(VR2332) 비교했을 때 83.91%~89.55%(NT)/84.08%~87.56%(AA)의 상동성을 보였고, 2014년에는 82.59%~99.83%(NT)/82.02%~99.50%(AA), 그리고 2015년에는 83.91%~98.34%(NT)/ 81.09%~97.51%(AA)의 상동성을 보였다 (표 1-2, 1-3).
- (라) 국내에서 2014년부터 2015년 동안 검출된 PRRSV의 ORF5 유전자는 2013년에 분리된 바이러스 유전자와 함께 분석한 결과 (Phylogenetic analysis), Type 1(EU type) PRRSV는 크게 3개의 cluster로 분류되었다. 141개의 Type 1(EU Type) PRRSV 중 135개가 cluster I(95.8%)에 속하였고, 1개가 cluster II(0.7%), 5개가 cluster III(3.5%)에 속하였다 (그림 3). 한편, Type 2(NA type) PRRSV는 크게 4개의 cluster로 분류되었다. MLV-like PRRSV를 제외한 91개의 Type 2(NA Type)를 분석한 결과 37개의 PRRSV가 cluster I(40.6%)에 속하였고, 2개의 PRRSV가 cluster II(2.2%), 15개의 PRRSV가 cluster III(16.5%), 34개의 PRRSV가 cluster IV(37.4%), 그리고 3개의 PRRSV가 Other group(3.3%)에 속하였다 (그림 1-11).
- (마) 백신주와 같은 cluster에 포함되는 PRRSV 분리주들은 백신주의 변이로 추정된다. 또한, 지리적으로 인접한 지역에서 분리된 바이러스들은 대부분 지역간 염기서열의 유사성은 보였지만, 유사성이 상이한 분리주들도 확인되었다. 이전에 분리된 국내 분리주와의 상관관계에서도 같은 지역에서 분리된 바이러스는 동일한 cluster에 포함되는 것으로 보아 이전 분리주들의 변이로 추정할 수 있다. 이제까지의 결과는 유전자 변이가 심하게 일어나거나 외부에서 유입된 바이러스는 없는 것으로 추정된다.

a.



b.

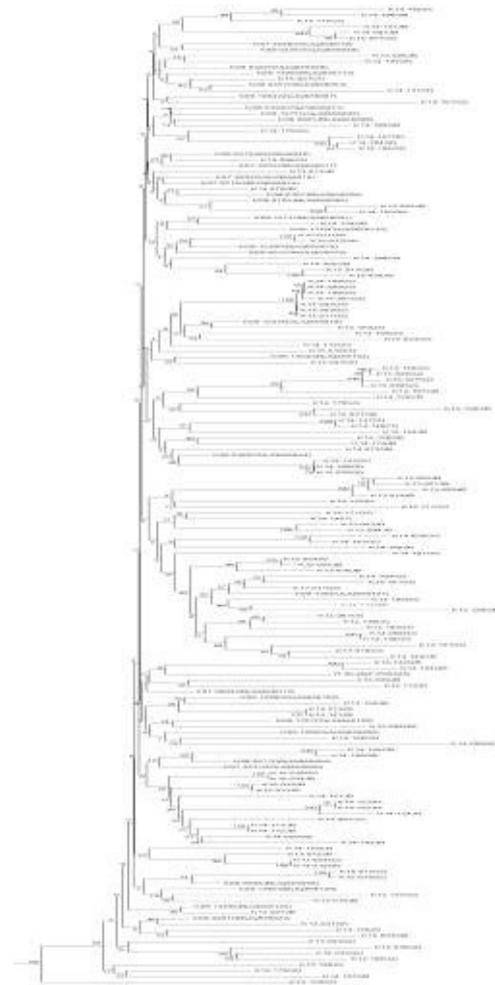
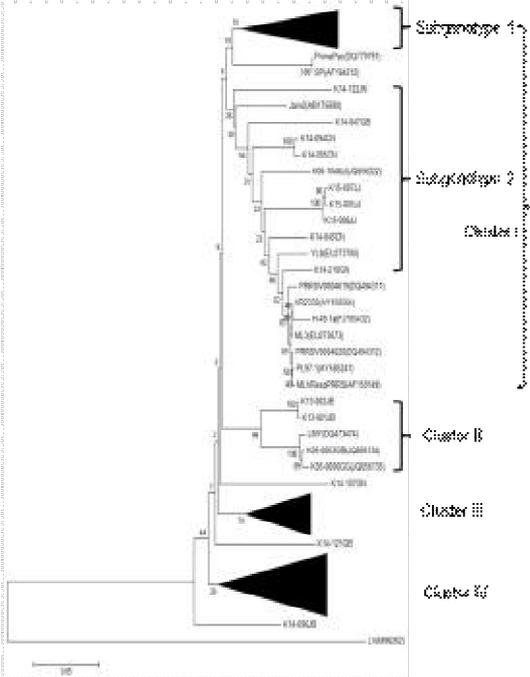
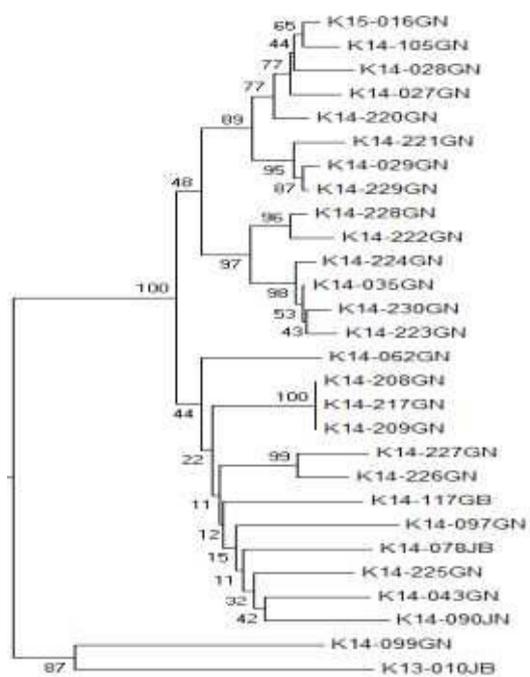


그림 1-10. PRRSV EU ORF5 NT phylogenetic tree (a) 및 Cluster I (b)

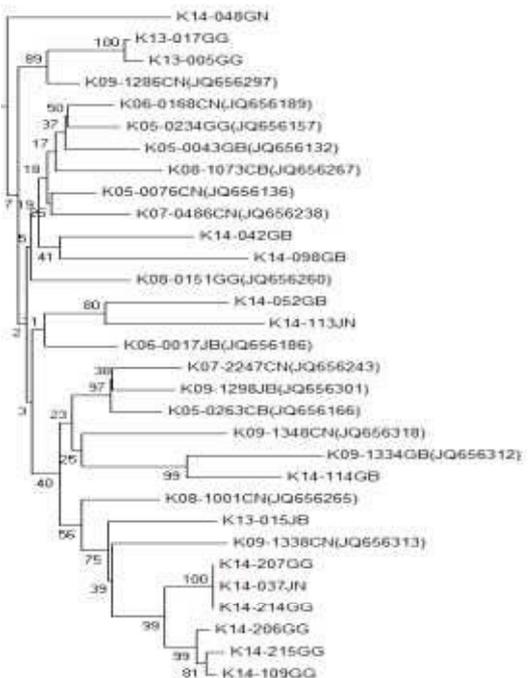
a.



b.



c.



d.

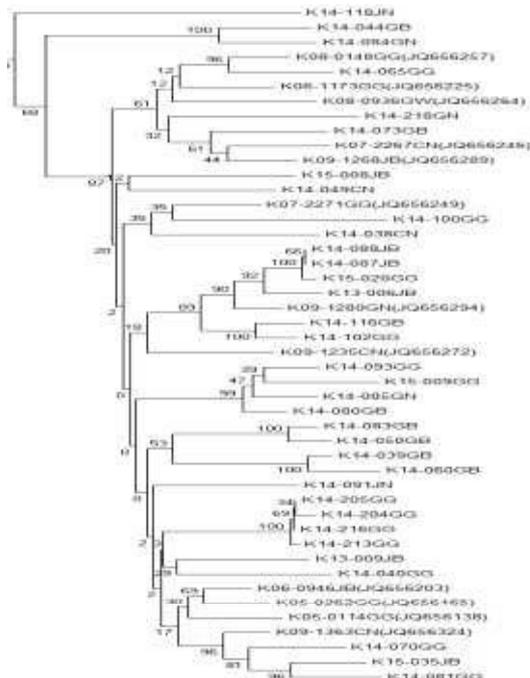


그림 1-11 . PRRSV NA ORF5 NT phylogenetic tree (a), Cluster I Subgenotype 1 (b), Cluster III (c) 및 Cluster IV (d)

표1-2. Sequence homology between Korean PRRSV isolates and Prototype virus(NT)

Isolation years	Genotype	2013	2014	2015	Prototype
2013	Type 1	89.27 ~ 98.84	80.86 ~ 100	85.81 ~ 97.19	83.47 ~ 88.61
	Type2	83.08 ~ 99.83	82.26 ~ 94.36	81.76 ~ 97.01	83.91 ~ 89.55
2014	Type1	80.86 ~ 100	80.53 ~ 100	81.19 ~ 100	85.15 ~ 98.84
	Type2	82.26 ~ 94.36	80.93 ~ 100	81.26 ~ 99.50	82.59 ~ 99.83
2015	Type1	85-81 ~ 97.19	81.19 ~ 100	84.82 ~ 100	85.97 ~ 94.39
	Type 2	81.76 ~ 97.01	81.26 ~ 99.50	82.42 ~ 100	83.91 ~ 98.34

표1-3. Sequence homology between Korean PRRSV isolates and Prototype virus(AA)

Isolation years	Genotype	2013	2014	2015	Prototype
2013	Type 1	84.65 ~ 99.01	79.70 ~ 100	83.66 ~ 97.52	84.65 ~ 89.11
	Type2	83.08 ~ 100	80.60 ~ 96.52	79.60 ~ 96.52	84.08 ~ 87.56
2014	Type1	79.70 ~ 100	78.71 ~ 100	81.19 ~ 96.53	82.18 ~ 98.02
	Type2	80.60 ~ 96.52	79.10 ~ 100	79.10 ~ 100	82.09 ~ 99.50
2015	Type1	83.66 ~ 97.52	81.19 ~ 96.53	84.16 ~ 100	84.16 ~ 93.07
	Type 2	79.60 ~ 96.52	79.10 ~ 100	80.10 ~ 100	81.09 ~ 97.51

다. PRRSV의 면역지표 분석 및 면역원성 분석

(1) PRRSV 감염에 의한 PAM 세포 싸이토카인 발현 분석

(가) 실험실적인 분석 방법에서 동물에서 발견되는 개체간의 차이를 반영하기 위하여 실험에 사용할 PAM 세포의 유전적 다양성을 MHC 분자의 타입으로 분류하여 사용함. 즉, 전북 정읍소재 PRRS 음성을 유지하고 있는 도원농장의 총 81마리의 자돈의 MHC1 (SLA1)과 MHCII (DRB1) 유전자를 typing 한 결과 아래의 표 1-4와 같이 24종 또는 28종의 MHC 유전형이 발견되었다.

표 1-4. 동물실험용 자돈의 MHC1과 MHCII 유전자의 다양성

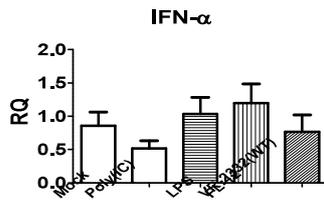
No.	SLA1	DRB1
1	0101(-23)/0401	0201
2	0101(-23)/0801(-12)	0201/0402
3	0101(-23)/08sk11(-31)/w11jh02	0201/0403
4	0101(-23)/w09sm09(-5)/15dh01	0201/0404
5	0101/08pt13	0201/0501
6	0101/an01	0201/0701
7	0101/w11jh01(-4)	0201/0901
8	0301(-19)/0801(-19)	0201/1001
9	0301(-19)/w11jh01(-4)	0201/1101

10	0301(-5)/0401(-5)	0201/1102
11	0401	0402/0404
12	0401/0501	0402/0501
13	0401/0701	0402/0901
14	0401/0801	0402/kn05
15	0401/08sk11(-31)	0404
16	0401/1201	0404/0901
17	0401/13ms21	0404/1102
18	0401/15dh01	0501
19	0401/ms5(-4)	0501/0801
20	0401/w09sm09(-5)/15dh01	0501/0901
21	0401/w11jh01	0501/1001
22	0702(-14)/st11	0901/kn05
23	0702/w11jh01(-14)	1101
24	0801(-7)/15dh01(-3)	kn05
25	0801/an01	-
26	08sk01/ms5(-4)	-
27	08sy01/w11jh01(-4)	-
28	w09sm09(-9)	-

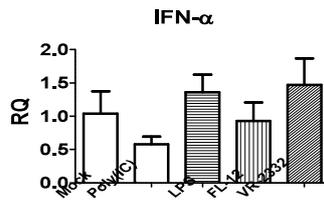
(나) MHCI 또는 II type이 상이한 8마리의 6주령 PRRS 음성 돼지의 폐에서 돼지 폐포 대식세포(Porcine alveolar macrophage, PAM)를 수거하여 -80℃에서 보관하여 사용하였다. 적혈구가 제거된 PAM 세포는 5 x 10⁶ cells/ml의 농도로 24-well plates에 분주한 뒤 PRRSV를 0.1 m.o.i 농도로 첨가하여 감염시켰다. 37℃에서 12, 24, 36시간 동안 배양한 PAM 수거하여 각각 두 개의 튜브에 나누어 준비하고 그 중 하나의 튜브의 PAM에서 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 돼지유래 IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ 와 TNF- α 특이 primers를 이용하여 real-time PCR로 정량적으로 분석하여 PRRSV 별 면역반응을 검증하였다. 나머지 하나의 튜브에는 PAM을 배양한 상층액을 수거하여 ELISA 검사법이 가능한 IL-12, IFN- α , TNF- α 의 단백질 발현을 정량적으로 분석하였다.

(다) 선행연구에서 병원성이 높고 면역반응의 유도가 높은 JA142와 중등도의 병원성을 보이고 면역반응의 유도가 약한 VR2332 등 2 종류의 병원성 및 면역원성이 다른 두 북미형 바이러스를 PAM에 감염시켜 싸이토카인의 발현을 분석하였을 때 특히 초기염증성 싸이토카인에 해당되는 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α 의 mRNA 발현이 JA142를 감염시킨 PAM세포에서 보다 빠르고 강하게 관찰되었다. 항바이러스성 면역반응인 인터페론의 발현을 관찰한 결과에서도 JA142를 감염시킨 PAM세포에서 IFN- β mRNA 발현이 VR2332를 감염시킨 PAM과 비교하여 약 10배 정도 높은 수준의 발현이 관찰되었다(그림 1-12)

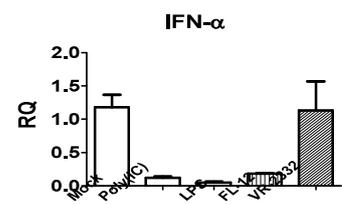
12hpi



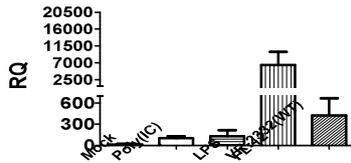
24hpi



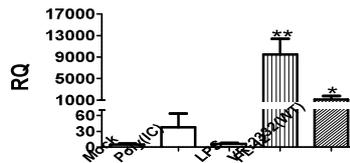
36hpi



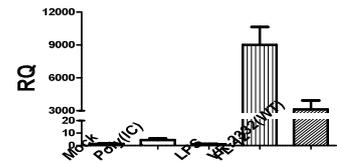
IFN- β _12hpi



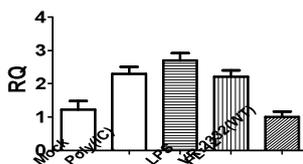
IFN- β _24hpi



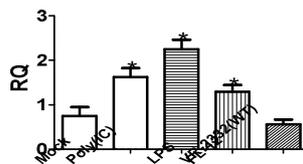
IFN- β - 36 hours



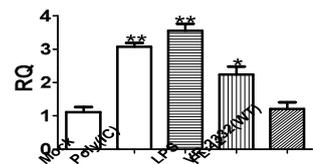
IL-8



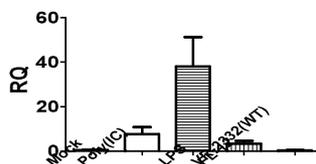
IL-8



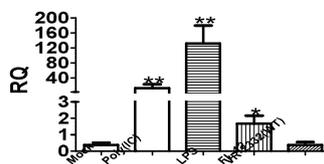
IL-8



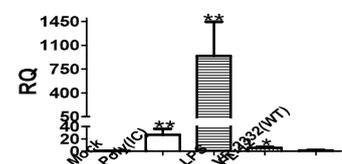
IL-12



IL-12



IL-12



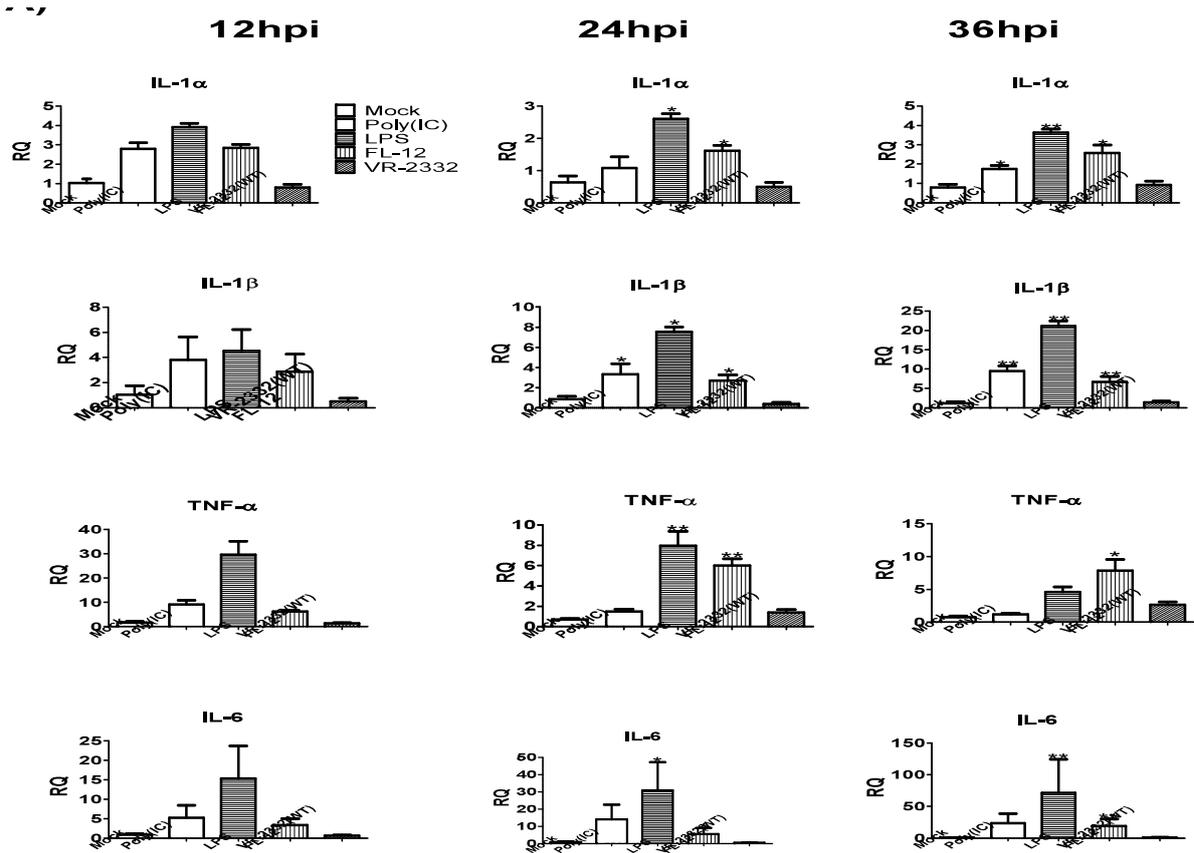


그림 1-12. PRRSV의 PAM 세포 감염에 의한 사이토카인 mRNA 발현의 정량적 분석

(라) 배양한 PAM에서 추출한 total RNA의 real-time PCR 결과와 마찬가지로 ELISA를 이용한 사이토카인 단백질 정량 검사에서도 JA142를 감염시킨 PAM 배양액에서 보다 높은 수준의 IL-12, IFN- α , TNF- α 의 단백질 발현이 관찰되어 병원성 및 면역원성이 초기 염증성 사이토카인의 발현과 밀접한 관계가 있는 것으로 평가되었다(그림 1-13).

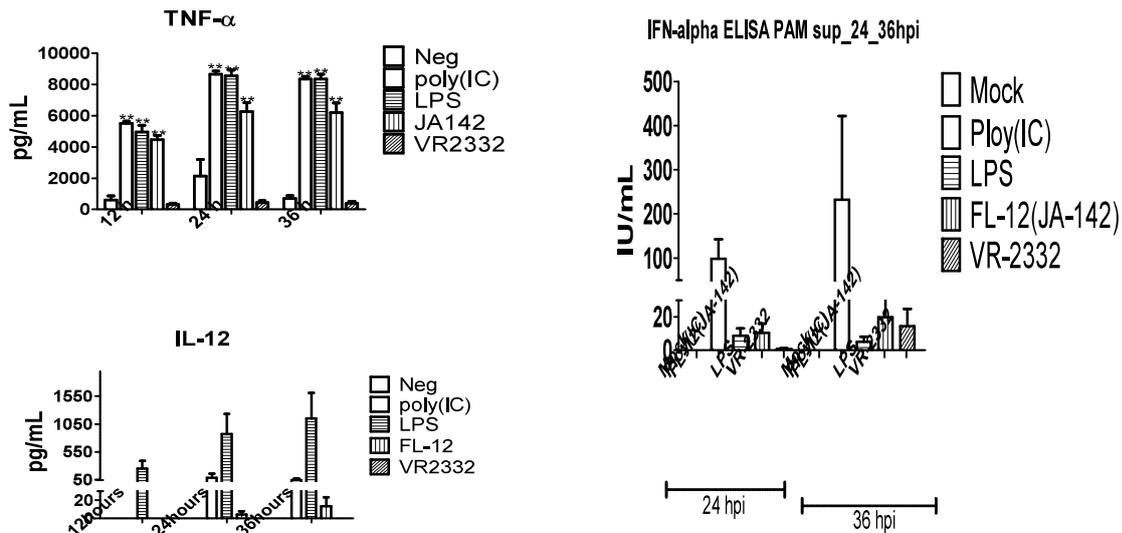
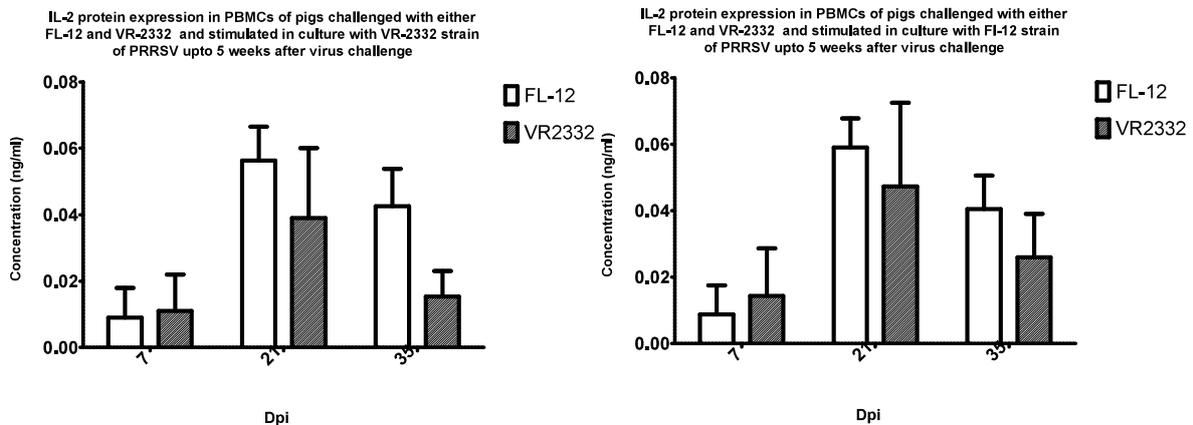


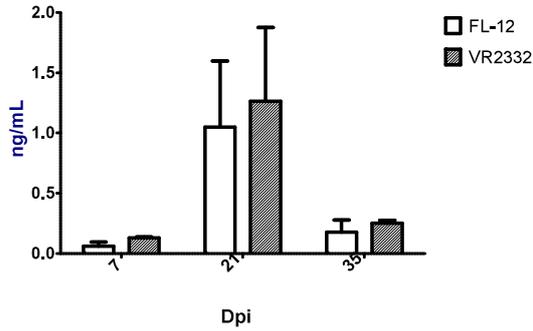
그림 1-13. PRRSV의 PAM 세포 감염에 의한 사이토카인 단백질 발현의 정량적 분석

(2) PRRSV 감염에 의한 PBMC 세포의 사이토카인 발현 분석

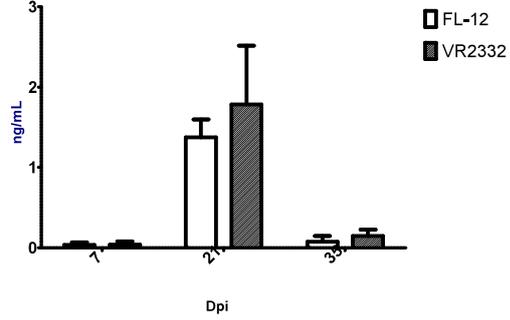
(가) MHC I 또는 II type이 상이한 10마리의 4주령 PRRS 음성 돼지를 구입하여 두 그룹으로 나누어 각 5마리의 돼지에 병원성 및 면역원성이 상이한 JA142(FL-12) 또는 VR2332 북미형 PRRSV들을 각각 1×10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 근육 접종하였다. 바이러스 접종 후 5주 동안 매주 전혈을 채취하여 PBMC 세포를 분리하여 5×10^6 cells/ml의 농도로 24-well plates에 분주한 뒤 JA142 또는 VR2332를 0.1 m.o.i 농도로 첨가하여 감염시켰다. 37°C에서 24시간 동안 배양한 PBMC 배양액을 수거하여 준비하고 ELISA 검사법을 이용하여 가능한 IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF-α의 단백질 발현을 정량적으로 분석하였다 (그림 1-14).



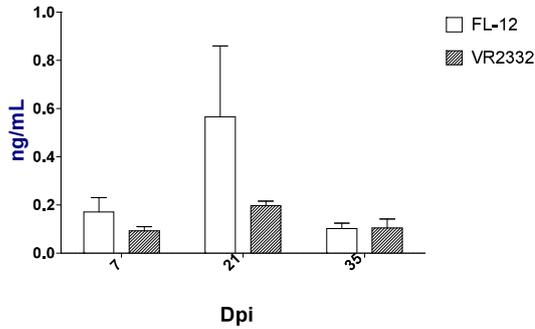
IL-10 protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with VR-2332 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



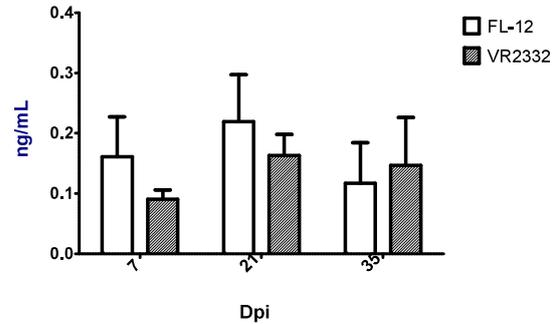
IL-10 protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with FL-12 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



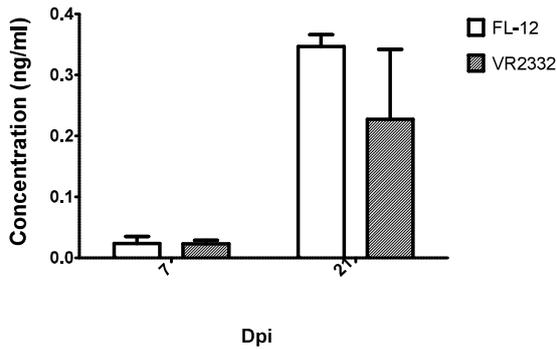
TNF- α protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with VR-2332 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



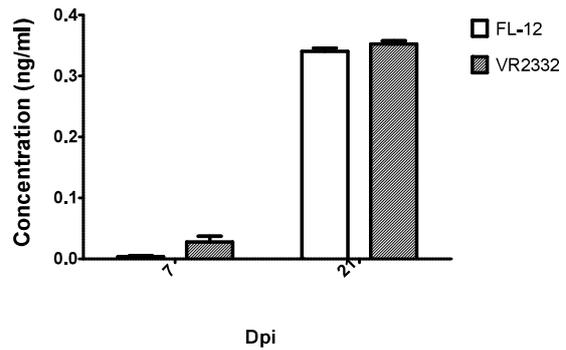
TNF- α protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with FL-12 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



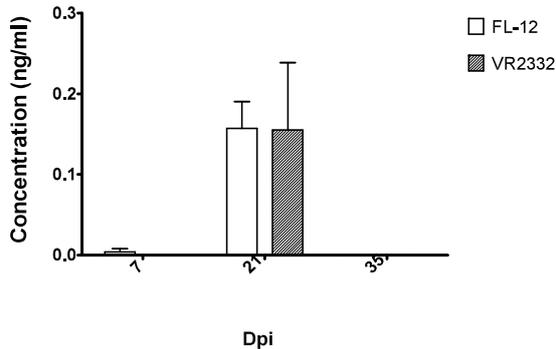
IL-4 protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with VR-2332 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



IL-4 protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with FL-12 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



IL-12 protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with VR-2332 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge



IL-12 protein expression in PBMCs of pigs challenged with either FL-12 and VR-2332 and stimulated in culture with FL-12 strain of PRRSV upto 5 weeks after virus challenge

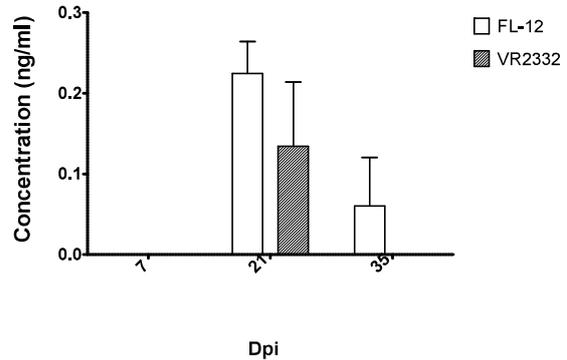


그림 1-14. PRRSV 공격접종 후 돼지 PBMC의 사이토카인 단백질 발현의 정량적 분석

(나) PAM 세포를 이용한 사이토카인 분석결과와 유사하게 JA142에 감염된 자돈들에서 분리한 PBMC 세포들은 어떤 바이러스에 의해 자극을 받은 유의적인 차이 없이 VR2332에 감염된 자돈들에서 분리한 PBMC 세포 보다 높은 수준의 초기 염증성 사이토카인(IL-12, TNF- α)의 발현이 관찰되었으며 이는 이후의 높은 수준의 IL-2와 IL-4의 발현으로 이어지는 경향이 관찰되었다. 하지만 IL-10 발현은 이와 반대의 경향을 보여 VR2332에 감염된 자돈들에서 분리한 PBMC 세포에서 발현되는 IL-10의 농도가 JA142에 감염된 자돈들에서 분리한 PBMC 세포들과 비교하여 높은 것으로 관찰되었다(그림 1-14). 따라서 PRRSV의 병원성과 면역원성의 특성은 이들 초기염증성 사이토카인과 면역조절 사이토카인 사이의 비율과 중요한 상관관계가 있는 것으로 판단된다.

(3) PRRSV의 면역지표 분석 및 면역원성 분석 결과 요약

- (가) 병원성과 면역원성이 다른 JA142와 VR2332, 2주의 바이러스를 PRRS 음성의 돼지에서 수거한 PAM에 감염시켜 다양한 면역반응을 분석하고 (세포를 이용한 실험실적 면역반응 분석)
- (나) 돼지에 직접 2주의 바이러스를 감염시켜 PBMC를 분리하여 발현 사이토카인을 분석하여 (동물을 이용한 면역반응 분석) 실험실적 면역반응 분석결과와 비교한 결과
- (다) 실험실적 분석 결과와 동물실험 분석 결과가 유사하여 PAM을 이용한 실험실적 분석 방법이 동물실험 분석 결과를 예측할 수 있는 수단이 될 수 있을 것으로 평가됨
- (라) 또한 병원성이 높고 면역원성이 높은 바이러스 주인 JA142는 병원성과 면역원성이 상대적으로 낮은 VR2332 바이러스 주와 비교하여 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α 등의 초기 염증성 사이토카인의 발현이 높았으며 세포독성면역반응을 억제하는 IL-10 발현은 상대적으로 낮은 것으로 분석됨
- (마) 따라서 다양한 PRRSV들의 병원성과 면역원성에 따른 분류를 위해서 PAM에 PRRSV를 감염시켜 발현되는 사이토카인의 종류를 분석하는 것이 유용할 것으로 판단되며 특히 초기 염증성 사이토카인의 발현과 IL-10의 발현 등의 면역지표를

분석하여 PRRSV의 병원성과 면역원성을 예측할 수 있는 체계의 개발에 도움이 될 것으로 판단됨

라. 효과적인 PRRSV의 전체염기서열 분석 시스템 구축 (추가 연구내용)

(1) NGS system을 이용한 PRRSV의 full genomic sequencing

(가) 1차년도에 분리하여 특성을 분석한 J57, J69, J71, J75 등의 국내 분리주를 대상으로 통상적인 방법으로 바이러스 RNA를 추출하고 5개의 프라이머 세트를 이용하여 3-4kb의 DNA fragment로 합성하고 혼합하여 NGS 반응에 이용하였다 (그림 1-15).

(나) Ion Plus Fragment Library Kit & Ion Shear™library kit(Life Technology, USA)를 이용하여 PCR을 수행한 후 밴드를 잘라 prep을 준비한 후 316chip에 반응 시키고 염기서열을 분석하였다.

(다) 반응 결과 높은 수준의 특이성이 관찰되어 기대한 전체 염기서열 분석 결과를 얻을 수 있었다 (그림 1-16).

(라) PRRSV VR2332(북미형 prototype)과 Lelystad virus(유럽형 prototype)을 표준주로 이용하여 두 바이러스의 염기서열 분석 하였고 염기서열은 GenBank에 등록 신청 하였으며 7월말까지 등록될 것으로 예상된다.

(마) 유럽형 PRRSV 전체 염기서열 분석을 위한 유니버설 프라이머의 개발이 진행 중이며 모든 PRRSV의 전체 염기서열 분석이 가능한 De novo 시퀀싱 시스템의 개발도 동시에 진행 중이며 3차년까지 진행하여 완성할 예정이다.



그림 1-15. cDNA 합성 후 밴드 확인 사진

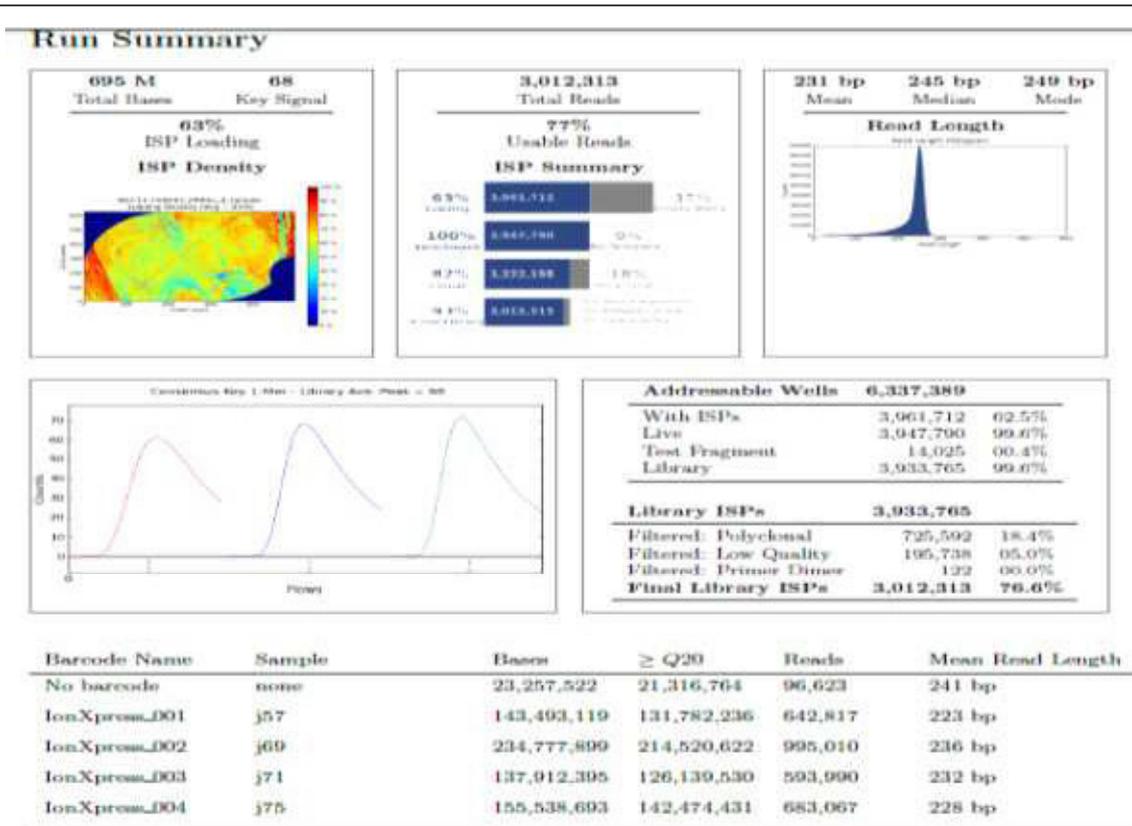


그림 1-16. 국내 분리주 전체 염기서열 분석을 위한 NGS 반응 요약

3. 개발 억제 기술의 현장 평가와 효용성 증명 (3차년도)

가. 국내 양돈장 유행 PRRSV 유전자 정보의 실시간 모니터링 시스템 구축

(1) 국내 양돈장내 유행하는 PRRSV의 분리 및 기초 특성 분석

(가) 시료 확보 및 항원 검사

① PRRS 의심축 시료 : 541두 검사

㉞ 전국 541농가 (경기도 76농가, 충북 5농가, 충남 21농가, 전북 64농가, 전남 30 농가, 경북 52농가, 경남 283농가, 제주 1농가)로부터 감염시료 541두 확보

㉟ 시료 형태 : 폐 및 혈청

㊱ PCR 결과 type별 감염율은 Type 1 (EU Type) 196호 (36.2%), Type 2 (NA type) 193호 (35.7%), Type 1&2 동시 감염 152호 (28.1%)로 나타남

㊲ 지역적인 유행율은 경기도 14.1%, 충북 0.9%, 충남 3.9%, 전북 11.8%, 전남 5.6%, 경북 9.6%, 경남 52.3%, 제주 1.8%로, 경기와 전북에서 type 1이, 경북에서는 type 2가 우세하게 감염되는 것으로 나타남

(나) PRRS 양성 가검물을 확보하여 세포를 이용한 바이러스 분리 진행

① Type 1 (EU Type)

㉞ 236개의 Type 1 (EU type) PRRSV PAM에서 분리 시도

㉔ 49개의 Type 1 (EU type) PRRSV CPE 관찰

② Type 2 (NA Type)

㉔ 233개의 Type 2 (NA type) PRRSV Marc-145 에서 분리 시도

㉔ 71개의 Type 2 (NA type) PRRSV CPE 관찰

(다) 검출된 바이러스 구조단백질(ORF5)에 대한 유전자 증폭 및 단백질 염기서열 분석

① 국내에서 검출된 Type 1 PRRSV (263주)와 Prototype virus (Lelystad, LV)간의 상동성 분석

㉔ Prototype virus인 LV와 Nucleotide 분석 결과 84.98~98.84%의 상동성을 보임

㉔ Prototype virus인 LV와 Amino acid 분석 결과 84.16~96.53%의 상동성을 보임

② 국내에서 검출된 Type 2 PRRSV (195주)와 Prototype virus (VR2332)간의 상동성 분석

㉔ Prototype virus인 VR2332와 Nucleotide 분석 결과 82.26~99.34%의 상동성을 보임

㉔ Prototype virus인 VR2332와 Amino acid 분석 결과 81.59~99.00%의 상동성을 보임 (표 1-5)

표 1-5. 2013-2016년 분리 및 등록된 PRRSV ORF5

Genotype	Prototype	Number of isolates	Nucleotide (%)	Amino acid (%)
Type 1	LV	293	84.98~98.84%	84.16~96.53%
Type 2	VR-2332	247	82.26~99.34%	81.59~99.00%

(라) 국내에서 2015년 동안 검출된 PRRSV의 ORF5 유전자를 참고 유전자와 함께 분석한 결과 (Phylogenetic analysis), Type 1 (EU type) PRRSV는 모두 subtype 1로 분류된 한편, Type 2 (NA type) PRRSV는 Lineage 1, 5 그리고 새로운 그룹으로 분류되었다. (그림 1-17).

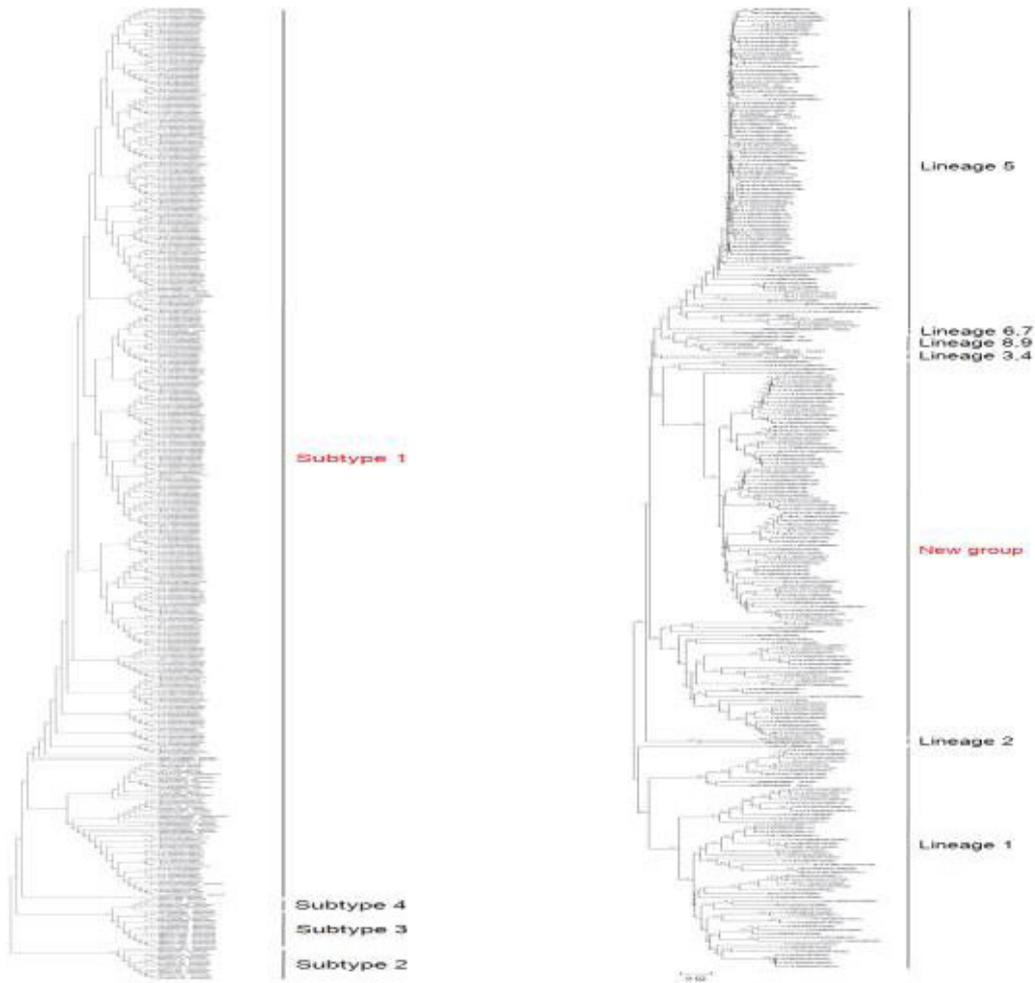


그림 1-17. PRRSV EU ORF5 NT phylogenetic tree 및 PRRSV NA ORF5 NT phylogenetic tree

(마) 백신주와 같은 cluster에 포함되는 PRRSV 분리주들은 백신주의 변이로 추정된다. 또한, 지리적으로 인접한 지역에서 분리된 바이러스들은 대부분 지역간 염기서열의 유사성은 보였지만, 유사성이 상이한 분리주들도 확인되었다. 이전에 분리된 국내 분리주와의 상관관계에서도 같은 지역에서 분리된 바이러스는 동일한 cluster에 포함되는 것으로 보아 이전 분리주들의 변이로 추정할 수 있다. 이제까지의 결과로 보면 심한 유전자 변이나 바이러스의 외부 유입은 없는 것으로 추정된다.

(2) 국내 유행 PRRS 바이러스의 면역원성, 병원성 분석 및 बैं킹 관리

(가) 1년차 30개, 2년차 40개, 3년차 40개 등 총 110주의 바이러스 분리를 수행하여 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁함 (표 1-6)

표 1-6. 2013-2016년 분리 및 등록 PRRSV strains

번호	학명	개체번호	KVCC (기탁번호)
1년차-1	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12045-1	KVCC-VR1400017
2	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12045-2	KVCC-VR1400018

3	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12196-1	KVCC-VR1400019
4	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12196-2	KVCC-VR1400020
5	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12076-1	KVCC-VR1400021
6	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12030-2	KVCC-VR1400022
7	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12020-1	KVCC-VR1400023
8	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12042-1	KVCC-VR1400024
9	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-2	KVCC-VR1400025
10	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13155-1	KVCC-VR1400026
11	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13058-2	KVCC-VR1400027
12	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12020-2	KVCC-VR1400028
13	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12030-1	KVCC-VR1400029
14	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12034-2	KVCC-VR1400030
15	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12039-1	KVCC-VR1400031
16	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12039-2	KVCC-VR1400032
17	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12076-2	KVCC-VR1400033
18	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12104-1	KVCC-VR1400034
19	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12277-1	KVCC-VR1400035
20	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-1	KVCC-VR1400036
21	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-3	KVCC-VR1400037
22	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	12298-4	KVCC-VR1400038
23	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13049-1	KVCC-VR1400039
24	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13058-1	KVCC-VR1400040
25	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13065-2-2	KVCC-VR1400041
26	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13090-4,5	KVCC-VR1400042
27	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13185	KVCC-VR1400043
28	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13185	KVCC-VR1400044
29	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13232	KVCC-VR1400045
30	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	13261	KVCC-VR1400046
2년차 31	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14136	KVCC - VR1500049
32	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14171-1	KVCC - VR1500050
33	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14181	KVCC - VR1500051
34	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14220	KVCC - VR1500052
35	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	-	KVCC - VR1500053
36	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14078	KVCC - VR1500054
37	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14079	KVCC - VR1500055
38	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14081	KVCC - VR1500056
39	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14086	KVCC - VR1500057
40	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14092	KVCC - VR1500058
41	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	-	KVCC - VR1500059
42	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14099	KVCC - VR1500060
43	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14145	KVCC - VR1500061
44	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14148	KVCC - VR1500062
45	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	-	KVCC - VR1500063
46	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14161	KVCC - VR1500064
47	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14173	KVCC - VR1500065
48	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14179	KVCC - VR1500066
49	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14180-2	KVCC - VR1500067
50	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14324	KVCC - VR1500068
51	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14324	KVCC - VR1500069

52	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14336	KVCC - VR1500070
53	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14340	KVCC - VR1500071
54	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14340	KVCC - VR1500072
55	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14340	KVCC - VR1500073
56	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14352	KVCC - VR1500074
57	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14356	KVCC - VR1500075
58	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14360	KVCC - VR1500076
59	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14363	KVCC - VR1500077
60	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14369	KVCC - VR1500078
61	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14374	KVCC - VR1500079
62	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14453	KVCC - VR1500080
63	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14460	KVCC - VR1500081
64	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14466	KVCC - VR1500082
65	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14404	KVCC - VR1500083
66	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14332	KVCC - VR1500084
67	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14333	KVCC - VR1500085
68	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14353	KVCC - VR1500086
69	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14428	KVCC - VR1500087
3년차 70	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus	14452	KVCC - VR1500088
71	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J163	KVCC - VR1500089
72	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J78	KVCC - VR1500090
73	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J80	KVCC - VR1500091
74	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J81	KVCC - VR1500092
75	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J82	KVCC - VR1500093
76	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J83	KVCC - VR1500094
77	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J85	KVCC - VR1500095
78	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J166	KVCC - VR1500096
79	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J86	KVCC - VR1500097
80	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J88	KVCC - VR1500098
81	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J167	KVCC - VR1500099
82	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J90	KVCC - VR1500100
83	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J92	KVCC - VR1500101
84	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J93	KVCC - VR1500102
85	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J94	KVCC - VR1500103
86	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J96	KVCC - VR1500104
87	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J170	KVCC - VR1500105
88	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J97	KVCC - VR1500106
89	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J175	KVCC - VR1500107
90	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J98	KVCC - VR1500108
91	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J176	KVCC - VR1500109
92	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J100	KVCC - VR1500110
93	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J179	KVCC - VR1500111
94	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J180	KVCC - VR1500112
95	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J181	KVCC - VR1500113
96	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J102	KVCC - VR1500114
97	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J182	KVCC - VR1500115
98	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J103	KVCC - VR1500116
99	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J184	KVCC - VR1500117
100	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J185	KVCC - VR1500118

101	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J107	KVCC - VR1500119
102	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J186	KVCC - VR1500120
103	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J109	KVCC - VR1500121
104	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J190	KVCC - VR1500122
105	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J192	KVCC - VR1500123
106	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J193	KVCC - VR1500124
107	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J113	KVCC - VR1500125
108	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J194	KVCC - VR1500126
109	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J163	KVCC - VR1500127
110	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	J78	KVCC - VR1500128

(3) KAHIS 유전자변이관리시스템을 이용한 유전자 정보 보존 및 활용

(가) 분리된 PRRSV의 ORF5 유전자를 분석, PRRSV 변이 추적 시스템과 연계하여 PRRSV 유전자 데이터베이스 구축

- ① 국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)에 1년차에 80개(C14002081 ~C14002161), 2년차에 163개(C15002277~C15002440), 3년차에 299개(C15002448~C15002747)를 등록하였다 (그림 1-18).

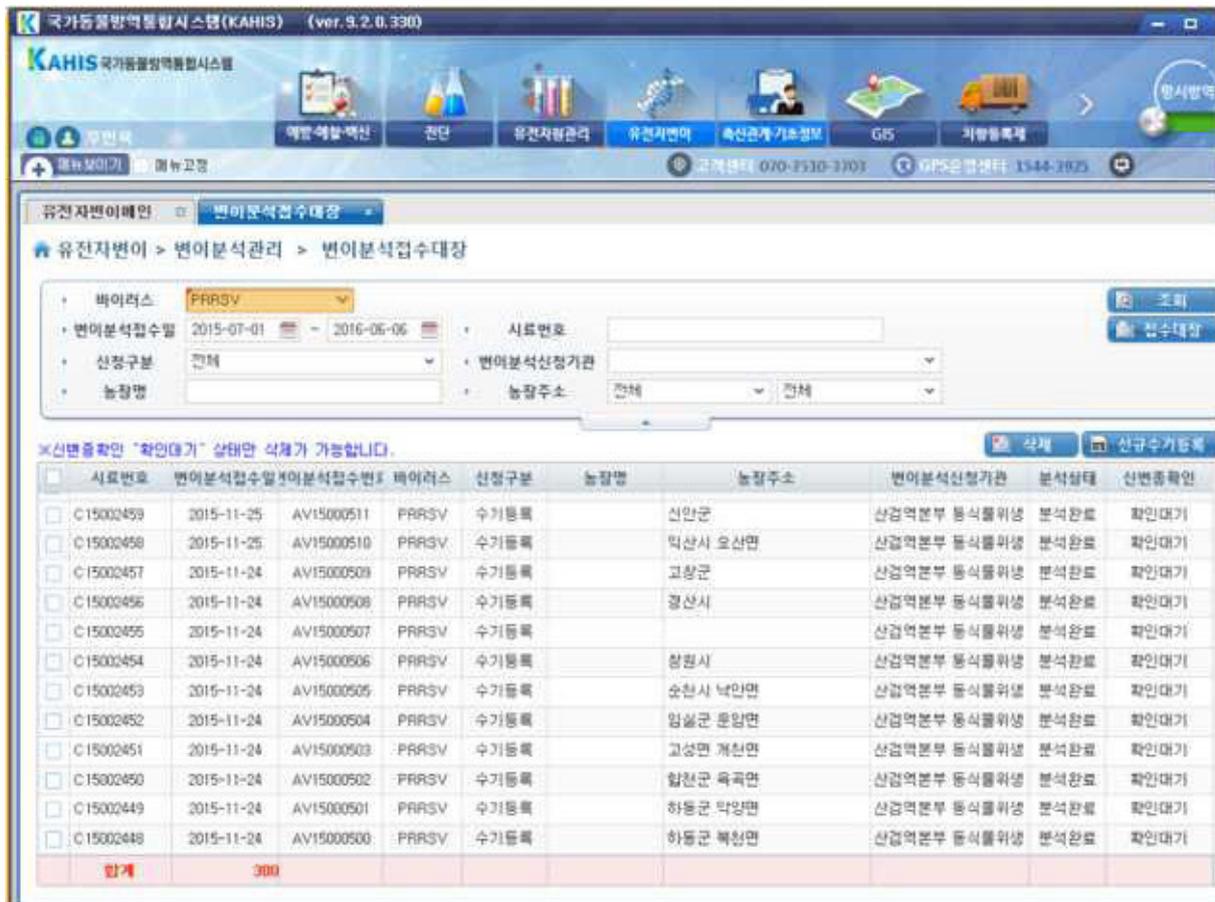


그림 1-18. 2016년 국가동물방역통합시스템 유전자 접수증거

제 2절. PRRS 발병지도 작성을 위한 국내 양돈장의 사육환경 평가와 한국형 질병발생 위험도 평가 프로그램 개발

1. 양돈장 현지조사를 위한 평가지표 개발 및 조사자료 DB 구축 (1차년도)

가. PRRS 발생 위험수준 평가지표 개발과 조사자료 입출력을 위한 DB 설계 및 구축

(1) PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 개발을 위한 농장 평가 설문서 개발

(가) 농장 평가 설문서 개발: 미국의 PADRAP과 다양한 농장 평가 설문서의 항목들을 분석하여 국내 양돈장의 평가에 효과적이고 적합한 설문 항목을 개발

(나) 설문서 문항의 평가방법: 국내 전문 양돈 수의사 및 PRRS 전문가들로 구성된 자문위원들과 설문 문항의 적합성 및 유효성을 평가하고 설문서 PRRS 발생의 위험도를 측정할 수 있도록 세부적인 내용을 수정하고 개선함

(다) 설문서의 최종 구성: 설문서의 구성은 일괄사육 형태가 주인 국내 양돈장의 상황에 적합하게 사육구간별로 구분하지 않고 하나의 형태로 구성하였으며 일반현황과 더불어 후보돈의 관리, 내부위험요소 관리, 외부위험요소 관리 및 양돈장의 위치와 관리 시스템으로 크게 나누어 아래와 같이 세부 설문 항목을 결정하였다.

PRRS 발생 위험도 평가 설문서

<일반 현황 조사>

1. 기본 정보

농장명	
농장주소	
농장대표	
사육형태	<input type="checkbox"/> 종돈장일관(GGP), <input type="checkbox"/> 종돈장 일관 (GP), <input type="checkbox"/> 일반농장 일관 (PS) <input type="checkbox"/> 자돈생산번식농장, <input type="checkbox"/> 육성 생산 번식농장, <input type="checkbox"/> 비육장
점검일	20 년 월 일
점검자	성명: _____수의사, 서명_____

2. 양돈장 현재 질병 상황 (실험실 진단 기준으로 해당 사항에 기록하십시오)

구분	양성	음성	백신 접종	상태 모름
PRRS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
구제역	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PED	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
TGE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
홍막페렴	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
유행성페렴 (MH)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
진행성 위축성 비염	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

돈적리	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
회장염	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
기타질병()	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
※ 이전 평가 이후 양돈장 질병 상황이 변화된 것이 있다면 아래에 기록하십시오.				
질병 발생 일자	20 년 월 일			
발생 질병	(1) (2)			
<p><농장 특이사항> PRRS를 포함한 질병을 제거하기 위해 디팜/리팜을 했다면 자세히 기록하십시오. 구제역, 돼지콜레라 발생 등에 의한 디팜/리팜도 기록하십시오.</p>				

3. 일반 정보

- (1) 모돈 규모: _____
- (2) 총사육규모: _____
- (3) 임신사 사육 형태
 - a. 군사 b. 스톨

4. PRRS 상황

- (1) 현재 PRRS 상황 (실험실 진단 결과를 기준)
 - a. 음성 - 한번도 감염되지 않았음
 - b. 음성 - 과거에 감염되었으나, 이전 감염되었던 돼지들이 모두 제거되었음
 - c. 음성 - 과거에 감염되었고, 이전 감염되었던 돼지들이 남아있음
 - d. 양성 - 모돈군 안정화 (이유 시에 자돈이 PRRS 항원 음성)
 - e. 양성 - 모돈군 불안정 (이유 시에 자돈이 PRRS 항원 양성)
 - f. 모름
- (2) PRRS의 타입은?
 - a. 북미형
 - b. 유럽형
 - c. 북미형 및 유럽형 모두 양성
 - d. 없음 (농장은 음성-naïve)
 - e. 모름
- (3) 가장 최근의 PRRS 임상증상 발생의 피해 강도
 - a. 번식 피해: 유산율 _____ % , 이유전폐사율 _____ %
 - b. 이유후폐사율: _____ %

<I. 후보종돈 (후보돈, 후보 웅돈, 정액)>

1. 후보돈 도입 방법

(1) 후보돈 도입 및 사용 방법

- a. 외부에서 후보돈 도입하지 않으나, 자체 생산된 F2 후보돈을 사용
- b. 외부에서 F1 후보돈을 도입하여 사용
- c. 외부에서 순종 후보돈을 도입하여, F1 후보돈을 자체 생산하여 사용
- d. 기타 (설명: _____)

(2) 외부 후보돈 도입 방법 (외부에서 후보돈을 구입하여 사용하는 농장만 해당 됨)

- a. PRRS 음성의 1개 종돈장
- b. PRRS 음성의 2개 이상의 종돈장
- c. PRRS 양성 1개 종돈장
- d. PRRS 양성 2개 이상의 종돈장
- e. PRRS 음성 및 양성 종돈장 혼재
- f. 도입 종돈장의 PRRS 상태 모름

(3) 정액의 도입 및 사용 방법

- a. 외부에서 PRRS 음성 정액
- b. 외부에서 PRRS 양성 정액
- c. PRRS 음성 용돈을 도입하여 자가 채취하여 사용
- d. PRRS 양성 용돈을 도입하여 자가 채취하여 사용
- e. 기타 (예. 용돈 도입하여 자연 종부 등. _____)

2. 격리 후보돈사의 위치 (기존돈군과의 거리)

- a. 격리후보돈사의 위치 (기존 돈사와의 거리): _____ M
- b. 격리사가 없는 경우의 입식 방법 설명:

3. _____ 격리 _____ 후보돈사에서의 _____ 격리기간 _____ (일수)

4. 격리 후보돈사 출입 절차 1

- a. 격리사에 수용하고 있으며, 출입시 장화와 작업복 교체
- b. 격리사에 수용하고 있으며, 출입시 장화 교체
- c. 격리사에 수용하고 있으며, 출입시 장화와 작업복을 교체하지 않음
- d. 격리 후보돈사가 없음

5. 격리 후보돈사 출입 절차 2

- a. 격리사의 출입은 일과의 제일 마지막에 실시하고, 퇴근
- b. 격리사의 출입은 일과 중에 실시하나, 다시 돼지관리를 위해 돌아오지 않음
- c. 격리사의 출입은 일과 중 실시하고, 돼지 관리를 위해 돌아올 때는 환복 및 샤워를 실시
- d. 격리사의 출입은 일과 중에 실시하고, 다시 돼지 관리를 위해 돌아올 때 아무런 조치를 실

시하지 않음

6. 외부 도입 후보돈 PRRS 검사

- a. 도입후 3일내 그리고 교배사(혹은 임신사) 이동 전에 PRRS에 대한 검사를 실시 (항원, 항체 검사 모두 실시)- 2회 검사
- b. 도입후 3일내 그리고 교배사(혹은 임신사) 이동전에 PRRS에 대한 검사를 실시 (항체검사만 실시)- 2회 검사
- c. 도입 후 3일내에 PRRS에 대한 검사를 실시 (항원, 항체 검사 모두 실시) - 1회 검사
- d. 도입 후 3일내에 PRRS에 대한 검사를 실시 (항체 검사만 실시) - 1회 검사
- e. 후보돈 도입 후 PRRS에 대한 검사를 실시하지 않음

7. 도입 후보종돈(후보돈, 후보웅돈)에 대한 PRRS 순치

- a. 농장의 맞춤형 PRRS 순치프로그램(백신 또는 혈청 접종 또는 자연노출 또는 기타)이 확립되어 있으며 순치여부를 노출 후 검사를 통해 정기적으로 확인
- b. 순치 프로그램이 없거나 순치하고 있지만 검사를 통해 확인하지 않음

8. 격리 후보돈사의 올인/올아웃 실행 여부

- a. 매 입식되는 후보돈은 올아웃 후 세척/소독/건조된 돈사(돈방)에 올인 입식 됨
- b. 매 입식되는 후보돈은 올아웃 후 세척/소독/건조된 펜스에 입식되나, 올인되지는 않음
- c. 매 입식되는 후보돈은 세척되지 않고, 기존 후보돈 또는 돼지가 있는 돈사에 입식 됨

9. 최근 3년 이내에 후보돈 이외의 외부에서 도입한 돼지는?

- a. 다른 농장의 자돈을 도입한 적이 있다 - (회)
- b. 검정소에서 웅돈을 도입한 적이 있다 - (회)
- c. 다른 농장에서 모돈 또는 웅돈을 도입한 적이 있다 - (회)

<II. 내부 위험 요소>

1. 돈사/내부 인원/기타 관리

(1) 최근 3년 이내에 담당 수의사와 계약하여 자문을 받고 있는가?

- a. 정기적으로 수의사와 계약하여 차단방역, 후보돈 환경적응 프로그램, 백신 프로그램, 위생 관리, 검사 및 처방을 실시하고 있다. (년간 6회 이상)
- b. 부정기적으로 필요할 시 수의사의 관리를 받고 있다.
- c. 정기적으로 수의사의 관리를 받고 있으나 주로 약품처방에 대한 조언을 받는다.
- d. 수의사와 전화로만 상담하고 있다.

(2) 최근 3년 이내에 직원 교육이 정기적으로 이루어 지고 있는가?

- a. 정기적으로 연간 4회이상 차단방역, 질병/위생 관리에 대한 교육을 실시하고 있다.
- b. 부정기적인 교육을 실시하고 있거나 교육프로그램이 없다.

(3) 최근 3년 이내에 차단방역 자체 점검이 이루어 지고 있는가?

1) 교체 후보돈 또는 모돈은 자연 노출(돼지 또는 피드백)에 의해 PRRS 바이러스에 계획적으로 노출되는 경우 기록하시오.

① 교체 후보돈은 종부사로 입식 전에 PRRSV에 감염된 돼지로부터 자연노출에 의해 노출된다.

- a. 모돈에 의한 노출
- b. 이전에 입식된 후보돈에 의한 노출
- c. 이유자돈에 의한 노출
- d. 육성돈에 의한 노출
- e. 아니오

② 교체 후보돈은 종부사로 입식 전에 PRRSV에 감염된 돼지의 조직 또는 똥에 의해 노출된다.

- a. 예
- b. 아니오

③ 교체 후보돈이 자연 노출(돼지 또는/그리고 피드백) 된 후 기존돈군(종부사로)으로 입식되는 경우 노출 후 기간은? _____

④ 모돈은 육성-비육사로부터의 PRRSV에 감염된 살아있는 돼지에 의해 고의적으로 노출된다.

- a. 예
- b. 아니오

⑤ 모돈은 PRRSV에 감염된 조직 또는 피드백을 통해 정기적으로 노출된다.

- a. 예
- b. 아니오

<혈청접종 - Serum Inoculation>

1) 교체 후보돈 또는 모돈은 혈청 접종(SI)에 의해서 PRRS 바이러스에 계획적으로 노출되는 경우 기록하시오.

① 교체 후보돈은 기존 농장의 종부사로 입식 전에 주사를 이용한 PRRSV에 감염된 자돈/육성돈/비육돈의 혈청 또는 모돈의 혈청에 노출된다.

- a. 예
- b. 아니오

② 교체 후보돈이 혈청 주사에 의해 노출된 후 기존돈군(종부사)으로 입식될 때까지의 기간(일수)을 적으시오. _____

③ 모돈은 정기적으로 주사를 통해 PRRSV에 감염된 자돈/육성돈/비육돈의 혈청 또는 모돈의 혈청에 의해 정기적으로(예, 3~4개월마다) 노출된다.

- a. 분만 후 또는 교배 후 마다 그룹별로 노출 됨
- b. 분만 전에 그룹별로 노출 됨
- c. 전체 돈군이 년 4회 이하로 정기적으로 노출됨
- d. 전체 돈군이 년 4회 또는 그 이상 정기적으로 노출됨
- e. 해당 없음

④ PRRS가 급성 발생하는 경우 즉시 전체 모돈은 주사에 의해서 PRRSV에 감염된 돼지의 혈청 또는 모돈의 혈청에 노출되어 왔다.

- a. 예 b. 아니오

<백신접종 - MLV>

1) 교체 후보돈 또는 모돈은 MLV에 의해서 PRRS 바이러스에 계획적으로 노출되는 경우 기록하시오.

① 사용하는 백신의 회사이름 / 백신명을 적으시오.

② 교체 후보돈은 기존 농장의 종부사로 편입 전에 MLV에 의해서 백신접종 되는 경우 자세히 기록하시오. [입식 후 접종 시기 및 접종 횟수 (1회 접종 또는 2회 접종)]

⑤ 교체 후보돈이 MLV에 의해 노출된 후 기존돈군(종부사)으로 입식될 때까지의 기간(일수)을 적으시오?

③ 모돈군에 MLV를 정기적으로 사용하는 경우 기록하시오.

- a. 이 농장에서 사용 안 함
b. 분만 후 또는 교배 전에 그룹별로 MLV 접종
c. 분만 전에 그룹별로 MLV 접종
d. 년 4회 이하로 전체 돈군에 정기적으로 MLV 접종
e. 년 4회 또는 그 이상 전체 돈군에 정기적으로 MLV 접종

④ 웅돈에 MLV 사용하는 경우 기록하시오.

- a. 이 농장에서 사용 안함
b. 단계별로 접종 (예. 5주 동안 주당 20%)
c. 년 4회 이하로 전체 돈군에 정기적으로 접종
d. 년 4회 또는 그 이상 전체 돈군에 정기적으로 접종

(3) 사양/위생 관리

① 1두 1침 준수

- a. 번식돈에 1두 1침, 자돈육성돈군에는 복당 1침, 돈방당 1침 이상을 실시
b. 1두 1침을 실시하고 있지 않음

② 돼지 사육 흐름 (올인/올아웃 또는 연속 사육)에 대해 설명하시오.

- a. 분만사:
b. 자돈사:
c. 육성사 (육성사가 없는 경우 통과):

d. 비육사:

③ 환돈사 또는 환돈방 운영

- a. 환돈을 위한 격리농장(Streaming system) 운영함
- b. 환돈을 위한 농장내 격리사를 운영하고 있으며, 기존돈군에 편입되지 않음
- c. 환돈을 위한 농장내 격리사 운영하고 있으며, 회복돈이 기존돈군에 편입되고 있음
- d. 환돈을 위한 격리돈방(펜스)이 운영되고 있음
- e. 환돈을 위한 격리돈방(펜스)이 운영되고 있지 않음

④ 환돈 도태 원칙이 있고 원칙에 따라 회복불능돈을 도태하고 있는가?

- a. 예
- b. 아니오

⑤ 분만사 양자

- a. 분만후 24시간이후 양자 실시하지 않음
- b. 분만후 24시간이후에도 필요에 따라 양자를 실시하고 있음

⑥ 돈사별 장화

- a. 돈사별 장화(고무신 포함)를 비치하고 갈아신고 출입하고 있음
- b. 돈사별 장화가 비치되고 있지 않음

⑦ 장화는 청결하게 유지되는가?

- a. 적절(정기적인 세척)
- b. 부적절 (유기물이 잔뜩 묻어있음)

⑧ 슬러리 피트는 낮은 수위를 유지하는가?

- a. 예(폐지 올라옴 및 세척 후 슬러리를 비운다.)
- b. 아니오

⑨ 문제 발생 시 전문 주치 수의사의 방문과 조치가 단시간에 가능한가?

- a. 예
- b. 아니오

⑩ 효과적인 백신 접종 프로그램이 적절히 수행되는가?

- a. 예
- b. 아니오

⑪ 약품은 적절하고 안전하게 보관되는가? (약품 보관함, 백신 보관 상태 등)

- a. 예
- b. 아니오

⑫ 사체 처리는 방법은 어떠한가?

- a. 농장 내부에서 소각, 매몰, 분해
- b. 외부에서 사체 수거

⑬ 사체 처리는 적절하게 수행되는가?

- a. 외부에 방치되지 않고, 매일 퇴근 전 적절하게 처리 (야생동물 접근 못함)

b. 부적절 (몇 일씩 돈사 내외부에 방치하여 야생동물이 접근 함)

⑭ 사체를 처리장(퇴비장등)에서 처리 후, 착용한 옷, 장화를 교체하고 손을 씻은 후 돈사에 출입하는가?

- a. 예 b. 아니오

<III. 외부 위험 요소>

1. 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송

(1) 상하차 시설(출하대 등)의 위치는?

- a. 농장 울타리 경계 또는 외부 (외부 차량이 농장 내부로 진입하지 않음)
b. 농장 내부 (외부 차량이 농장 내부로 진입 함)

(2) 상하차 시설이 돼지가 되돌아 오지 못하도록 설계, 건축되었는가?

- a. 예 b. 아니오

(3) 상하차 시설의 형태가 세척 시 분뇨가 돈사 및 농장 내로 역류되지 않는가?

- a. 예 b. 아니오

(4) 상하차 시설은 세척·소독에 적합한 구조(재질)인가?

- a. 예 b. 아니오

(5) 전입 돼지 (후보돈 및 자돈)와 도태/출하돈/분양돈의 상하차 시설이 구분되어 있는가?

- a. 예 b. 아니오

(6) 상하차 절차 및 운송 상태는?

- a. 청결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 없음
b. 청결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 있음
c. 청결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 낮음
d. 청결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 높음

(7) 상하차 작업 후에 세척/소독/건조 절차는?

- a. 즉시 세척→ 소독→ 건조 실시
b. 분변 제거만 실시
c. 소독만 실시
d. 분변제거, 세척, 소독 모두 하지 않음

(8) 농장 내부에서만 돼지 수송용으로 사용하는 차량의 관리는?

- a. 돼지 수송 후 마다 세척/소독/건조
b. 매주 1회 세척/소독/건조
c. 세척을 제대로 하지 않고 계속 사용

(9) 돼지 전출 시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈 • 비육돈 판매, 번식돈 판매 등 돼지 전출 시 이용하는 차량은 무엇인가?

- a. 농장 소유 차량(다른 용도로도 사용)
- b. 제삼자 차량(타 농장 돼지 접촉 없음)
- c. 제삼자 차량(타 농장 돼지 접촉)

(10) 돼지 전출시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈 • 비육돈 판매, 번식돈 판매 등 농장 진입 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?

- a. 세척, 소독 및 건조 다운 타임 8시간 이상 준수
- b. 세척 및 소독 후 다운 타임 없음
- c. 세척 및 건조 (다운타임 8시간 준수)
- d. 위와 같은 절차 없음

(11) 돼지 전입시의 위생 절차 - 후보돈, 자돈 입식 등에 사용되는 차량의 농장 진입 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?

- a. 세척, 소독 및 건조 다운 타임 8시간 이상 준수 (다른 양돈장 들르지 않음)
- b. 세척, 소독 및 건조 다운 타임 8시간 이상 준수 (다른 양돈장을 방문 후 진입)
- c. 세척 및 소독 후 다운 타임 없음
- d. 세척 및 건조 (다운타임 8시간 준수)
- e. 위와 같은 절차 없음

2. 차량 방역

(1) 차량소독조는 농장 경계에서 운영되고 있는가?

- a. 예
- b. 아니오

(2) 차량소독은 PRRS 및 악성전염병(구제역, 돼지열병)에 효과적인 소독제를 유효한 농도로 희석하여 사용하고 있는가?

- a. 예
- b. 아니오

(3) 차량을 위한 소독시설은 잘 작동되고, 보온이 되는가?

- a. 예
- b. 아니오

(4) 농장내 진입하는 차량 기사는 샤워 후 지정된 의복, 장화로 갈아입는가?

- a. 샤워 후 지정된 의복, 장화 착용
- b. 샤워는 하지 않고, 지정된 의복, 장화 만 착용
- c. 위의 것 모두 하지 않음

(5) 사료 차량이 농장내 준청결구역으로 진입하는가?

- a. 예
- b. 아니오

(6) 분뇨 차량이 농장내 준청결구역으로 진입하는가?

- a. 예
- b. 아니오

(6) 샤워실 내부의 환복실에 갈아입을 작업복이 잘 준비되어 있는가?

- a. 예 b. 아니오

(7) 방문자를 위해 샤워 절차에 대한 알림판이 잘 보이도록 게시되어 있는가?

- a. 예 b. 아니오

(8) 내부 작업복의 세탁은 어디에서 하는가?

- a. 샤워실 내부
b. 농장 내부
c. 농장 외부
d. 통제 없음

(9) 농장 작업복 및 신발은 농장 내부에서만 착용하는가?

- a. 농장 내 청결 구역에서만 착용
b. 울타리 외부 밖에서도 착용

(10) 방역실이 농장 경계지역에 위치하고 있는가?

- a. 예 b. 아니오

(11) 방역실이 교차오염이 되지 않도록 설계되어 있는가?

- a. 예 b. 아니오

(12) 방역실에 농장내 장화와 방역복이 비치되어 있는가?

- a. 예 b. 아니오

(13) 개인 소지품의 돈사 내 반입을 허용하는가? (시계, 장신구, 휴대전화, 노트북 등)

- a. 예 (아무런 소독절차 없이)
b. 예 (알코올소독 및 자외선 소독 후 허용)
c. 아니오

(14) 농장을 진입하는 모든 사람에게 권장 다운타임을 준수하게 하는가? (예. 다른 농장의 돼지 또는 오염물질 접촉 후의 24시간 동안의 출입 제한 시간 준수)

- a. 예 b. 아니오

(15) 농장 직원이 다른 오염 원인과 접촉하는가?

- a. 아래와 같은 사항 없음 (접촉 없음)
b. 돼지 이외의 다른 가축과 접촉
c. 타 양돈농장에서 일하는 사람과 접촉
d. 타 양돈농장에 접촉 또는 집에서 돼지사육

4. 농장 입구 및 주변 울타리

(1) 농장 입구(정문)는 항상 닫아두고 잠겨있는가?

- a. 항상(주야간, 24시간)
- b. 열어놓음

(2) 방명록에는 이전 방문농장과 다운타임을 기록하는가?

- a. 항상 기록
- b. 기록하지 않음
- c. 방명록 없음

(3) 농장 내부 출입하는 모든 사람은 허가된 다운타임을 준수한 사람 만 입장하는가?

- a. 예
- b. 아니오

(4) 방문자 알림판(출입절차 등)과 진입금지 표지가 잘 보이도록 설치되었는가?

- a. 예
- b. 아니오

(5) 농장외부에 방문자 차량 주차장이 있는가?

- a. 예
- b. 아니오

(6) 방문자가 돈사 밖 주변(준청결 구역)을 다니게 될 때 그 절차는 어떠한가?

- a. 샤워/환복 후 진입
- b. 환복(옷/신발) 후 진입
- c. 절차 없음

(7) 돈사 출입문은 항상 닫혀있는가?

- a. 예
- b. 아니오

(8) 주변 울타리가 오염지역과 청결지역을 명확히 구분하고 차량, 사람, 동물의 이동을 제한하는가?

- a. 예
- b. 아니오

5. 물품 방역

(1) 외부에 물품반입창고가 운영되고 있는가?

- a. 예
- b. 아니오

(2) 물품반입창고는 농장 경계에 위치하고 있는가?

- a. 예
- b. 아니오

(3) 물품반입창고에 입고 된 물품은 소독과(자외선등) 계류 시간을 가지는가?

- a. 물품보관창고에 입고 후 소독과 다운타임(24시간 계류)을 거친 후 사용
- b. 물품보관창고에 입고 후 소독 후 바로 반입(다운타임 없음)하여 사용
- c. 물품보관창고에 입고 후 소독은 없으나 다운타임(24시간 계류)을 거친 후 사용

- e. 5001 - 10000두
- f. 10000두 이상

(3) 인근 2~5km 사이에 사육중인 돼지의 총숫자 (현장조사 하지 않음)

- a. 없음
- b. 50두 이하
- c. 250두 이하
- d. 251 - 1000두
- e. 1001 - 5000두
- f. 5001 - 10000두
- g. 10000두 이상

(4) 인근 2km 이내에 사육중인 돼지의 총숫자 (현장조사 하지 않음)

- a. 없음
- b. 50두 이하
- c. 250두 이하
- d. 251 - 1000두
- e. 1001 - 5000두
- f. 5001 - 10000두
- g. 10000두 이상

(5) 반경 5km 이내 지역의 (Local) 돼지 사육 밀도 (현장조사 하지 않음)

- a. 낮음: 100두 이하 / km²
- b. 중간: 100 - 200두 / km²
- c. 높음: 200 - 400두 / km²
- d. 매우 높음: 400두 이상 / km²

(6) 반경 20-50km 까지의 지역의 (Regional) 돼지 사육 밀도

- a. 낮음
- b. 중간
- c. 높음

(7) 5km 이내의 양돈장 숫자 (현장조사 하지 않음)

- a. 없음
- b. 3개 농장 이하
- c. 3 -6개 농장
- d. 7- 12개 농장
- e. 13 - 20개 농장
- f. 20개 농장 이상

(8) 농장 주위에 잠재 오염원이 존재하는가, 한다면 명칭과 거리를 기록하십시오. (도축장, 육가공공장, 공동분뇨처리장, 사료공장 또는 집하센터, 돼지운송차량 차고지 등)

(9) 농장에서 주 도로까지의 거리는? (공용도로에서 농장 입구까지의 거리)

- a. 100m 이상
- b. 20~100m
- c. 20m 이하

(10) 농장에서 가장 인접한 공용도로를 함께 이용하는 양돈장의 수는? (사료, 출하 등)

- a. 없다
- b. 1개
- c. 2개 이상

(11) 주요한 바람의 방향

- a. 북풍
- b. 남풍
- c. 동풍
- d. 서풍
- e. 적용할 수 없음

(12) 농장이 위치한 특징적인 형태를 설명하시오. (산, 계곡, 바다, 언덕, 평야 등)

(13) 농장 지역 기후?

- a. 건조 - 따뜻
- b. 건조 - 추운
- c. 습하고 - 더운
- d. 습하고 - 추움: 적용할 수 없음

2. 사육시스템

- a. 3-SITE
- b. 2-SITE
- c. 일괄사육농장

3. 돈사

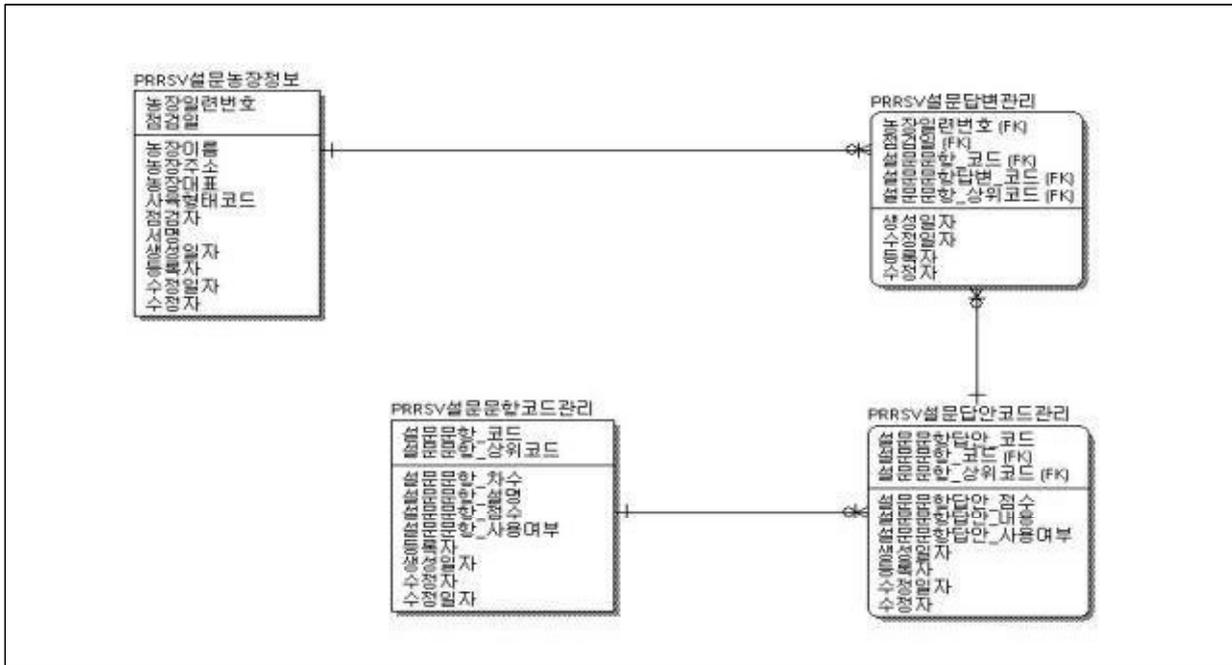
(1) 돈사의 형태

- a. 모든 돈사는 무창이며, 각 돈사는 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있음
- b. 모든 돈사는 무창이며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있지 않음
- c. 모든 돈사는 원치이며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있음
- d. 모든 모든 돈사는 원치이며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있지 않음
- e. 무창, 원치 돈사 함께 있으며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있음
- f. 무창, 원치 돈사 함께 있으며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있지 않음

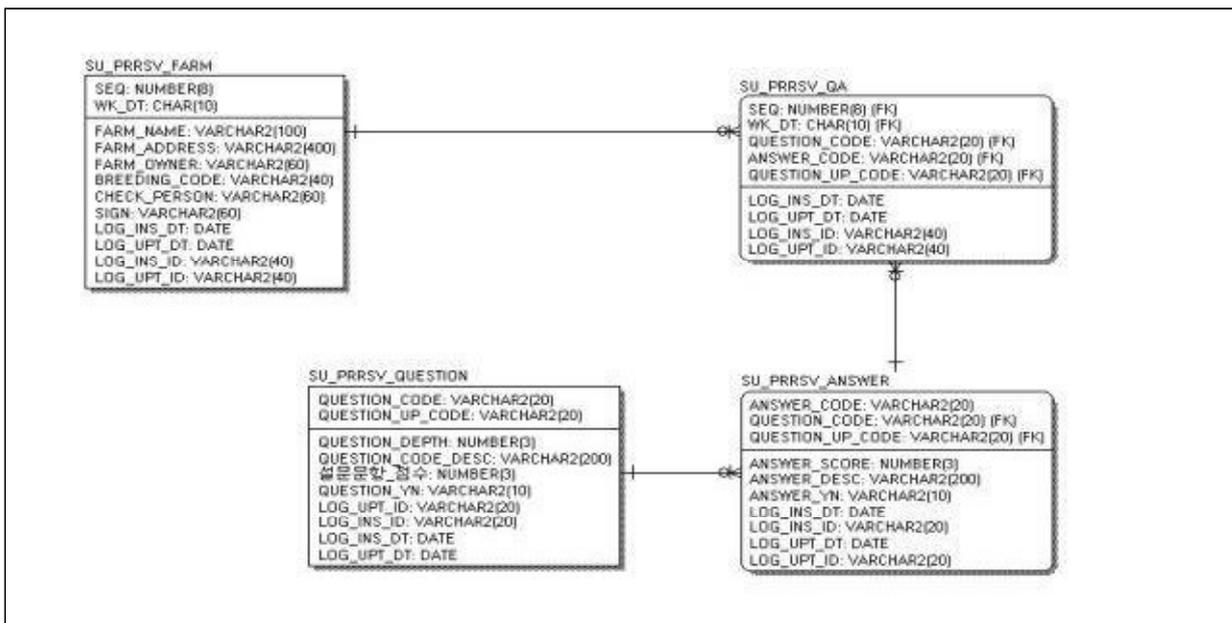
(2) 돈사의 방조망 설치

- a. 농장에 모든 입기구에 바이러스 필터가 설치되고 적절하게 운영되고 있다.
- b. 농장의 전돈사 무창돈사이며 입기구에는 방충망이 설치되어 있다.
- c. 원치돈사가 있지만 방조망이 설치되어 있다.
- d. 원치돈사이며, 방충망이 설치되어 있지 않다.

나. PRRSV 설문지 입력프로그램 DB 설계서



< PRRSV 설문지 입력 프로그램 물리 ERD >



< PRRSV 설문지 입력 프로그램 논리 ERD >

데이터베이스 설계서 (테이블정의서)

시스템	PRRSV 설문지 입력 프로그램	업무 영역	PRRSV 설문지입력
테이블 ID	SU_PRRSV_FARM	테이블명	PRRSV 설문농장정보
정의	PRRSV 설문지에 표시할 농장정보를 관리한다.		
예상 데이터 발생량	초기	0	증가할
인덱스정의			
인덱스(Index)명	인덱스유형	PK여부	활용명
SU_PRRSV_FARM_PK	PK	○	SEQ, WK_DT
순번	필드ID	필드명	PK FK 데이터타입 NULL DEFAULT
1	SEQ	농장일련번호	○ ○ NUMBER(8) N
2	WK_DT	일주일	○ ○ CHAR(10) N
3	FARM_NAME	농장이름	VARCHAR2(200)
4	FARM_ADDRESS	농장주소	VARCHAR2(400)
5	FARM_OWNER	농장대표	VARCHAR2(60)
6	SPEEDING_CODE	사육형태코드	VARCHAR2(40)
7	CHECK_PERSON	점검자	VARCHAR2(60)
8	SION	시연	VARCHAR2(60)
9	LOG_INS_DT	생성일자	DATE
10	LOG_UPT_DT	수정일자	DATE
11	LOG_INS_ID	생성자ID	DATE
12	LOG_UPT_ID	수정자ID	DATE

시스템	PRRSV 설문지 입력 프로그램	업무 영역	PRRSV 설문지입력
테이블 ID	SU_PRRSV_QUESTION	테이블명	PRRSV 설문문항코드관리
정의	PRRSV 설문지 문항 코드를 관리한다.		
예상 데이터 발생량	초기	0	증가할
인덱스정의			
인덱스(Index)명	인덱스유형	PK여부	활용명
SU_PRRSV_QUESTION_PK	PK	○	QUESTION_CODE, QUESTION_LP_CODE
순번	필드ID	필드명	PK FK 데이터타입 NULL DEFAULT
1	QUESTION_CODE	설문문항 코드	○ ○ NUMBER(8) N
2	QUESTION_LP_CODE	설문문항 상위코드	○ ○ CHAR(10) N
3	QUESTION_DEPTH	설문문항 차수	NUMBER(3)
4	QUESTION_CODE_DESC	설문문항 설명	VARCHAR2(200)
5	QUESTION_SCORE	설문문항 점수	NUMBER(3)
6	QUESTION_YN	설문문항 사용여부	VARCHAR2(10)
7	LOG_UPT_ID	생성자ID	VARCHAR2(20)
8	LOG_UPT_DT	생성일자	DATE
9	LOG_INS_ID	수정자ID	DATE
10	LOG_INS_DT	수정일자	DATE

시스템	PRRSV 설문지 입력 프로그램	업무 영역	PRRSV 설문지입력
테이블 ID	SU_PRRSV_ANSWER	테이블명	PRRSV 설문답안관리
정의	PRRSV 설문지 답안 코드를 관리한다.		
예상 데이터 발생량	초기	0	증가할
인덱스정의			
인덱스(Index)명	인덱스유형	PK여부	활용명
SU_PRRSV_ANSWER_PK	PK	○	ANSWER_CODE, QUESTION_CODE, QUESTION_LP_CODE
외래키(Foreign Key)명	시스템	활용명	
QUESTION_CODE	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_QUESTION	QUESTION_CODE
QUESTION_LP_CODE	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_QUESTION	QUESTION_LP_CODE
순번	필드ID	필드명	PK FK 데이터타입 NULL DEFAULT
1	ANSWER_CODE	설문문항답안 코드	○ ○ VARCHAR2(20) N
2	QUESTION_CODE	설문문항 코드	○ ○ VARCHAR2(20) N
3	QUESTION_LP_CODE	설문문항 상위코드	○ ○ VARCHAR2(20) N
4	ANSWER_SCORE	설문문항답안 점수	NUMBER(3)
5	ANSWER_DESC	설문문항답안 내용	VARCHAR2(200)
6	ANSWER_YN	설문문항답안 사용여부	VARCHAR2(10)
7	LOG_INS_DT	생성일자	DATE
8	LOG_UPT_DT	수정일자	DATE
9	LOG_INS_ID	생성자ID	DATE
10	LOG_UPT_ID	수정자ID	DATE

시스템	PRRSV 설문지 입력 프로그램	업무 영역	PRRSV 설문지입력
테이블 ID	SU_PRRSV_QA	테이블명	PRRSV 설문답변관리
정의	PRRSV 설문지에 답변한 내용을 관리한다.		
예상 데이터 발생량	초기	0	증가할
인덱스정의			
인덱스(Index)명	인덱스유형	PK여부	활용명
SU_PRRSV_QA_PK	PK	○	SEQ, WK_DT, QUESTION_CODE, ANSWER_CODE, QUESTION_LP_CODE
외래키(Foreign Key)명	시스템	활용명	
SEQ	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_FARM	SEQ
WK_DT	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_FARM	WK_DT
QUESTION_CODE	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_QUESTION	QUESTION_CODE
ANSWER_CODE	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_ANSWER	ANSWER_CODE
QUESTION_LP_CODE	PRRSV 설문지 입력 프로그램	SU_PRRSV_QUESTION	QUESTION_LP_CODE
순번	필드ID	필드명	PK FK 데이터타입 NULL DEFAULT
1	SEQ	농장일련번호	○ ○ NUMBER(8) N
2	WK_DT	일주일	○ ○ CHAR(10) N
3	QUESTION_CODE	설문문항 코드	○ ○ VARCHAR2(20) N
4	ANSWER_CODE	설문문항답안 코드	○ ○ VARCHAR2(20) N
5	QUESTION_LP_CODE	설문문항 상위코드	○ ○ VARCHAR2(20) N
6	LOG_INS_DT	생성일자	DATE
7	LOG_UPT_DT	수정일자	DATE
8	LOG_INS_ID	생성자ID	DATE
9	LOG_UPT_ID	수정자ID	DATE

다. PRRS 조사자료 입출력 시스템 : 양돈농장 조사 설계 및 자료 입출력 기능 개발

(1) 웹기반의 PRRS 조사자료 입출력 시스템 개발

(2) 입력 시스템

(가) 개인정보 동의

(나) 농장 일반 현황

(다) 설문 입력

(3) 출력 시스템

(가) 농장 일반 정보 : 농장명, 농장 경영형태, 혈청검사 결과, 위험도 4분면 결과, 생축 이동흐름

(나) 설문결과 보고서 : 항목별 배점, 농장 점수, 평균점수, 적합 여부

(다) 농장 자가진단 : 항목별 배점 결과에 따른 농장의 자주적 차단방역 프로그램 계획 유도

(라) PRRS 위험도 종합 보고서

■ PRRS 조사자료 입출력 시스템 화면



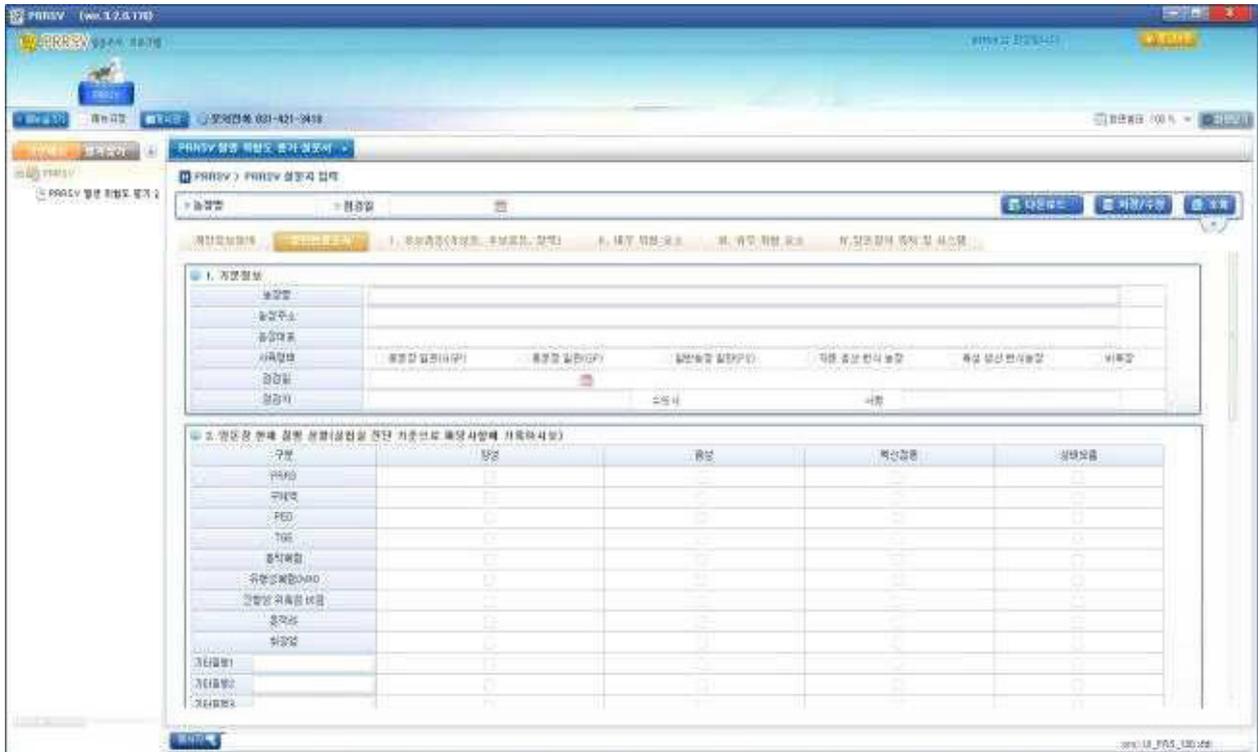
< PRRSV 설문조사 입출력 프로그램 로그인 화면 >



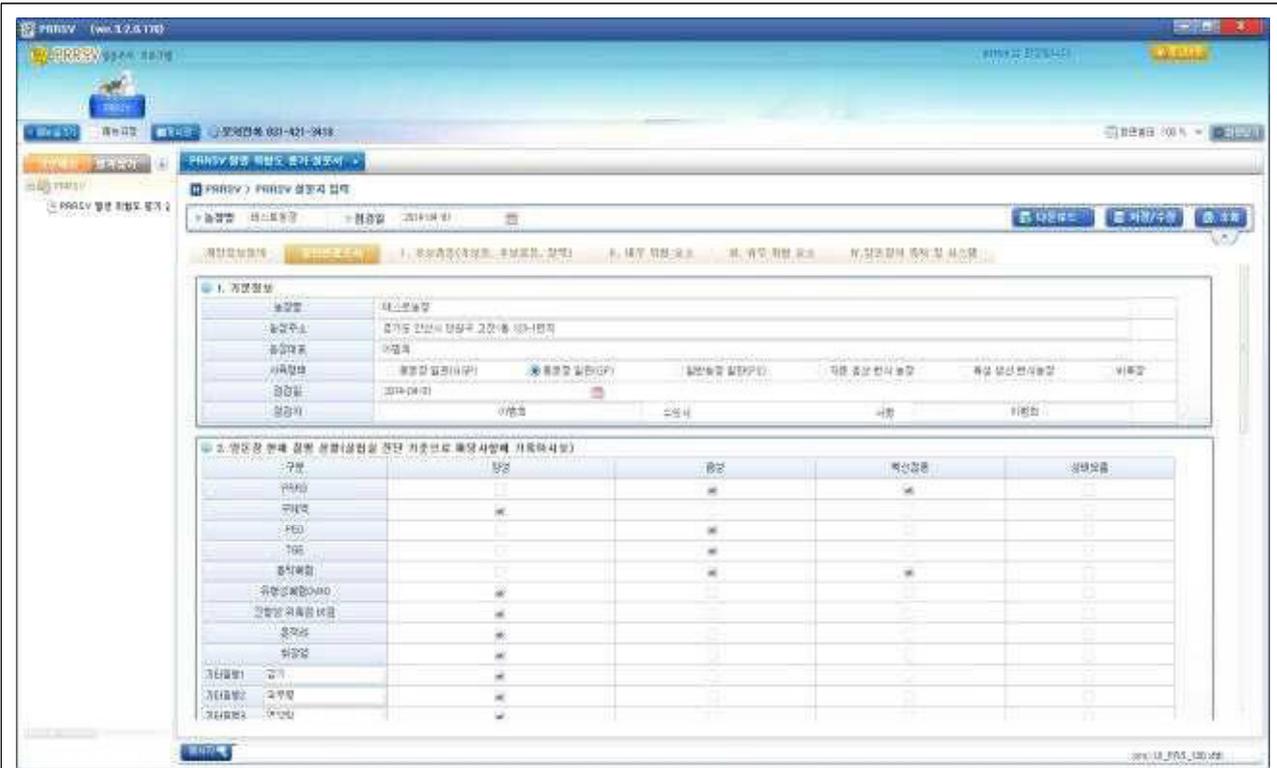
< PRRSV 설문조사 입출력 프로그램 메인화면 >



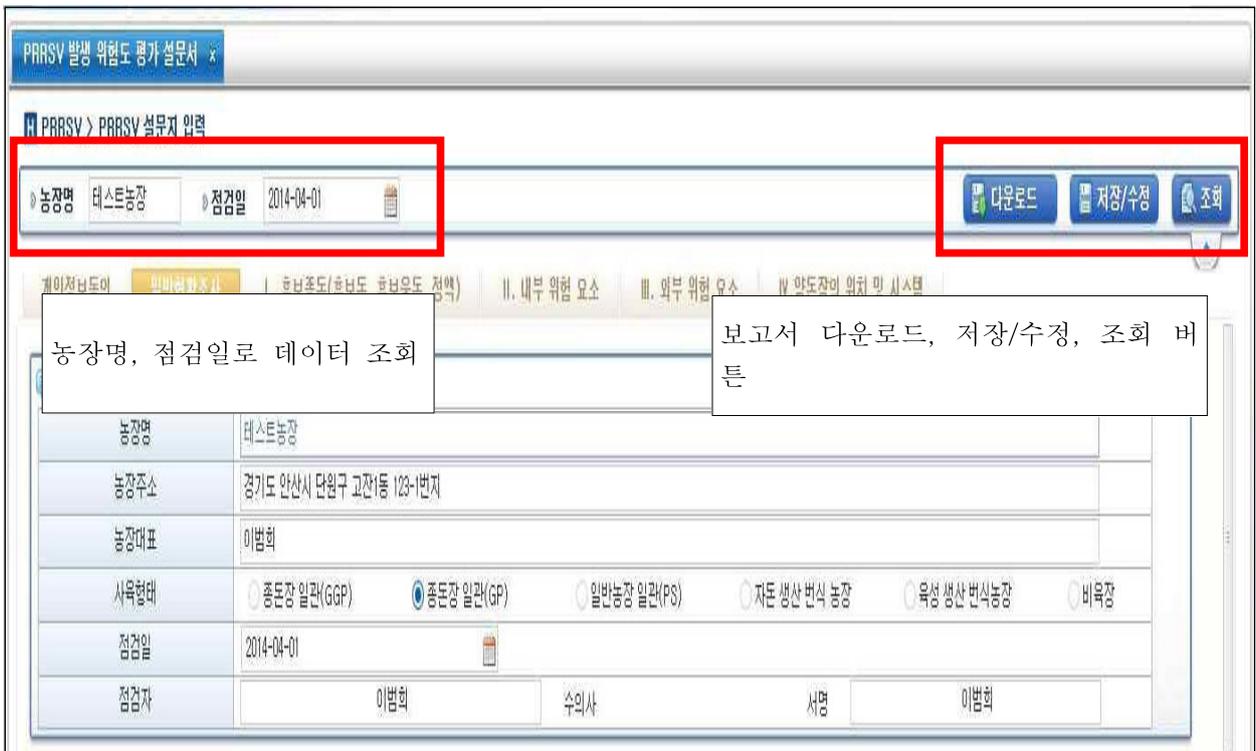
< 개인정보 공개 동의 확인 화면 >



< '일반현황' 관련 설문내역 입출력 화면 >



< 입출력 내역 조회화면 >



< PRRSV 설문조사 입출력 프로그램 기능 >

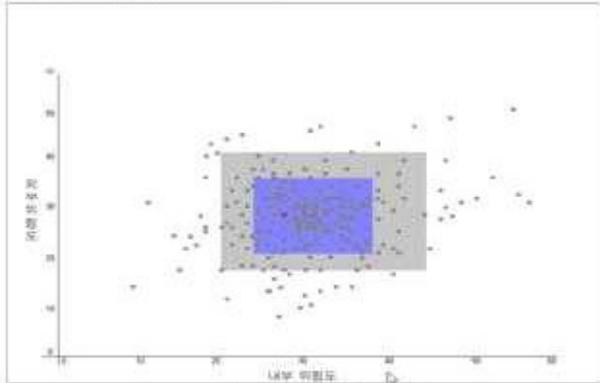
■ PRRS 조사자료 출력 시스템 화면

PRRSV 농장 일반정보 보고서

구분	내용
농장명	대청농장
사육형태	일괄사육장
월참검사값	양성
검사일	2014-03-05
관계농장	GGP, GP, 비육장, 도축장, 시센터



농장 위치정보



농장 PRRSV 위험도

< PRRSV 농장 일반정보 보고서 >

PRRSV 설문결과 보고서

설문유형	배점	평균 점수	농장 점수	적합 여부
1. 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송	170	123	120	부적합
(1) 상하차 시설(올하대 등)의 위치는?	10	8	10	적합
(2) 상하차 시설이 돼지가 되돌아 오지 못하도록 설계, 건축되었는가?	20	15	15	적합
(3) 상하차 시설의 형태가 세척 시 분뇨가 분사 및 농장 내로 역류되지 않는가?	10	8	10	부적합
(4) 상하차 시설은 세척/소독에 적합한 구조(재질)인가?	20	15	15	적합
(5) 진입 돼지 (후보돈 및 자돈)와 도태/출하돈/분양돈의 상하차 시설이 구분되어 있는가?	20	12	10	부적합
(6) 상하차 절차 및 운용 상태는?	20	15	10	적합
a. 정결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직할/운송기사의 접촉위험 없음	10	8	10	부적합
b. 정결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직할/운송기사의 접촉위험 있음	5	4		
c. 정결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직할/운송기사의 접촉위험 낮음	5	3		
d. 정결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직할/운송기사의 접촉위험 높음	0	0		
(7) 상하차 작업 후에 세척/소독/건조 절차는?	20	14	15	적합
(8) 농장 내부에서만 돼지 수송용으로 사용하는 차량의 관리는?	30	20	10	부적합
a. 돼지 수송 후 마다 세척/소독/건조	20	20	10	적합
b. 매주 3회 세척/소독/건조	10	8		
c. 세척을 제대로 하지 않고 계속 사용	0	0		
(9) 돼지 전용 시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈·비육돈 판매, 번식돈 판매 등 돼지 전용 시 이용하는 차량은 무엇인가?	20	12	15	적합
(10) 돼지 전용시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈·비육돈 판매, 번식돈 판매 등 농장 진입 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?	10	6	10	적합

< PRRSV 설문결과 보고서 >

설문분류	백점	평균 점수	농장 점수	적합 여부
1. 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송	170	125	120	
(1) 상하차 시설(출하대 등)의 위치는?	10	8	10	
(2) 상하차 시설이 돼지가 파동아 오지 못하도록 설계, 건축되었는가?	20	15	15	
(3) 상하차 시설의 형태가 세척, 소독, 분사 및 농장 내로 역류되지 않는가?	10	8	10	
(4) 상하차 시설은 세척·소독에 적합한 구조(재질)인가?	20	15	15	
(5) 진입 돼지 (후보돈 및 자돈)와 도태/출하돈/분양돈의 상하차 시설이 구분되어 있는가?	20	12	10	
(6) 상하차 집차 및 운송 상태는?	20	15	10	
a. 청결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 없음	10	8	10	
b. 청결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 있음	5	4		
c. 청결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 낮음	5	3		
d. 청결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 높음	0	0		
(7) 상하차 작업 후에 세척/소독/건조 절차는?	20	14	15	
(8) 농장 내부에서만 돼지 수송용도로 사용하는 차량의 관리?	30	20	10	
a. 돼지 수송 후 마다 세척/소독/건조	20	20	10	
b. 매주 1회 세척/소독/건조	10	8		
c. 세척을 제대로 하지 않고 계속 사용	0	0		
(9) 돼지 전용 시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈·비육돈 판매, 번식돈 판매 등 돼지 전용 시 이용하는 차량은 무엇인가?	20	12	15	
(10) 돼지 전용 시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈·비육돈 판매, 번식돈 판매 등 농장 진입 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?	10	6	10	

< PRRSV 농장 자가진단 보고서 >

라. 양돈장 방문조사를 통한 PRRS 위험도 평가 관련 역학정보 수집

(1) 농장선정: 지역별 사육두수, 농장수를 고려한 층화확률표본추출로 선발

(가) 조사방법: 위험수준 평가를 위해 사전 계획된 설문서를 이용한 면접조사

(나) 조사자: 한국양돈수의사회 및 양돈전문컨설팅사와 협력하여 지역별 컨설턴트를 선정

(다) 조사기간: 6개월 마다 농장의 PRRS 상황을 분석하기 위하여 진단검사와 방문 평가 실시

<PRRS 위험도 평가 프로그램 개발을 위한 모니터링 농장정보>

순번	시/도	군	모돈규모	PRRS 상태	사육형태
1	강원		450	음성	일괄
2	강원	횡성	450	양성_안정	일괄
3	경기	여주	400	음성	일괄
4	경기	여주	600	음성	일괄
5	경기	포천	200	음성	일괄
6	경기	파주	200	음성	일괄
7	경기		200	안정	일괄
8	경기		800	안정	일괄
9	경기		250	안정	일괄
10	경기		200	안정	일괄
11	경기		100	안정	일괄
12	경기		350	음성	일괄
13	경기		250	음성	일괄
14	경기		250	안정	일괄
15	경기		800	안정	일괄

16	경기		400	안정	일괄
17	경기		200	안정	일괄
18	경기	여주	450	안정	일괄
19	경기	용인	200	안정	일괄
20	경기	안성	500	양성_안정	일괄
21	경기	화성	400	양성_불안정	일괄
22	경기	평택	500	양성_불안정	2-site
23	경기	김포	600	양성	일괄
24	경기	안성	200	안정화	일괄
25	경기	연천군	200	음성	일괄
26	경기	이천	900	안정	일괄
27	경기	포천	220	음성	일괄
28	경기	포천		음성	비육장
29	경기	이천	730	양성_불안정	2-site
30	경남	창녕군	700	음성	일괄
31	경남	거창	300	음성	일괄
32	경남	진주	120	음성	일괄
33	경남	거창	350	음성	일괄
34	경남	거창	350	음성	일괄
35	경남	합천	218	양성_불안정	일괄_단지
36	경남	양산	250	음성	일괄
37	경남	합천군	1800	양성	번식농장
38	경북	안동	250	음성	일괄
39	경북	안동	500	음성	일괄
40	경북	영주	200	음성	일괄
41	경북	영주	900	음성	일괄
42	경북	안동	900	음성	일괄
43	경북	안동	400	음성	일괄
44	경북	안동	750	음성	일괄
45	경북	경주	230	음성	일괄
46	경북	고령	500	안정	일괄
47	경북	예천	300	음성	일괄
48	경북	고령	400	안정	일괄
49	경북	영주	300	양성_안정	일괄
50	경북	의성	430	양성_안정	2-site_일부비육
51	경북	의성	550	양성_불안정	2site
52	경북	의성군	500	음성	일괄
53	경북	경주	250	음성	일괄
54	경북	경주	95	음성	일괄
55	경북	영천	250	안정	일괄
56	경북	영천	200	안정	일괄
57	경북	경주	180	안정	일괄
58	경북	경주	380	안정	일괄
59	경북	의성군	550	음성	일괄
60	경북	의성군		음성	비육장
61	경북	안동군	500	음성	일괄

62	경북	안동군		음성	비육장
63	경북	상주	220	음성	번식농장
64	경북	경주	2600	양성	3 sites
65	경북	영천	2,800두	양성	2 sites
66	경북	군위군	1,600	양성	일괄
67	경북	영천		양성	비육장
68	세종	연기	350	안정	일괄
69	세종	세종	400	안정화	일괄
70	세종	세종	500	안정화	일괄
71	안성	대덕면	300	안정	일괄
72	안성	미양면	500	안정	일괄
73	원주	문막읍	200	안정	일괄
74	전남	함평	100	음성	일괄
75	전남		250	안정	일괄
76	전남	무안	350	안정	일괄
77	전남	담양	100	양성_불안정	일괄
78	전남	강진	280	안정화	일괄
79	전북	부안	750	음성	일괄
80	전북	김제	220	음성	일괄
81	전북	남원	200	음성	일괄
82	전북		250	안정	일괄
83	전북		400	음성	일괄
84	전북	완주	300	안정	일괄
85	전북	익산	300	안정	일괄
86	전북	함평	500	음성	일괄
87	전북	정읍	1400	안정	일괄
88	전북	남원	580	음성	일괄
89	전북	고창	950	양성_불안정	일괄
90	전북	고창	400	음성	일괄
91	전북	고창	500	안정화	일괄
92	전북	고창	250	음성	일괄
93	전북	정읍	350	음성	번식농장
94	전북	태인	110	음성	일괄
95	전북	정읍	450	음성	2-site
96	전북	순창	180	양성_안정	일괄
97	제주	서귀포	250	안정	일괄
98	제주	서귀포	200	음성	일괄
99	제주	서귀포	50	음성	일괄
100	제주	서귀포	200	음성	일괄
101	제주	서귀포	500	안정	일괄
102	제주	서귀포	250	안정	일괄
103	충남	서천	100	음성	일괄
104	충남	예산	120	음성	일괄
105	충남	홍성	200	음성	일괄
106	충남	홍성	180	음성	일괄
107	충남	홍성	250	음성	일괄

108	충남		250	안정	일괄
109	충남	아산	100	안정	일괄
110	충남	금산	1000	음성	자돈생산
111	충남	천안	1000	안정화	자돈생산
112	충남	예산	350	안정화	일괄
113	충남	당진	500	안정화	일괄
114	충남	홍성	360	음성	자돈생산
115	충남	홍성	160	안정화	일괄
116	충남	보령	500	안정화	일괄
117	충남	홍성	120	안정화	일괄
118	충남	홍성	220	불안정	일괄
119	충남	홍성	350	불안정	일괄
120	충남	홍성	1000	안정화	자돈생산
121	충남	논산	800	안정	일괄
122	충남	부여군	350	음성	일괄
123	충북	충주	120	음성	일괄
124	충북	충주	250	음성	일괄
125	충북	청원	150	음성	일괄
126	충북	충주	150	음성	일괄
127	충북	진천	600	음성	일괄
128	충북	청원	150	안정	일괄
129	충북	진천	2400	안정	일괄
130	충북	청원	350	음성	일괄
131	충북	괴산	350	양성_안정	2-site
132	충북	진천	1,200	양성_불안정	2-site_일부비육
133	충북	괴산	150	음성	일괄
134	충북	음성군	1800	안정	일괄
135	충북	보은군		음성	비육장
136	충북	괴산	850	양성_불안정	2-site
137	충북	진천	650	양성_불안정	일괄

* 농장주 및 농장명은 개인정보 보호를 위해 삭제함.

** 일부 군 단위 정보는 농장주의 요청에 따라 삭제함.

(2) 선발 양돈장의 위치, 사양 및 방역환경 등의 PRRS 관리에 중요한 정보 수집

(가) 지역별로 강원 3곳, 경기 29곳, 경남 8곳, 경북 30곳, 전남 5곳, 전북 18곳, 제주 6곳, 충남 20곳, 충북 18곳 등 총 137곳의 양돈장을 PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 적용 및 개선에 대한 연구에 참여 동의를 받아 선발하였다. 향후 참여 농장은 지속적으로 확대해 나갈 예정이다.

(나) 대부분의 참여농장들이 일괄사육형태를 가지고 있지만 번식농장, 비육농장, 2-sites 및 3-sites 농장 등도 포함되어있어 다양한 사육형태에 대한 관찰이 가능할 것으로 기대된다.

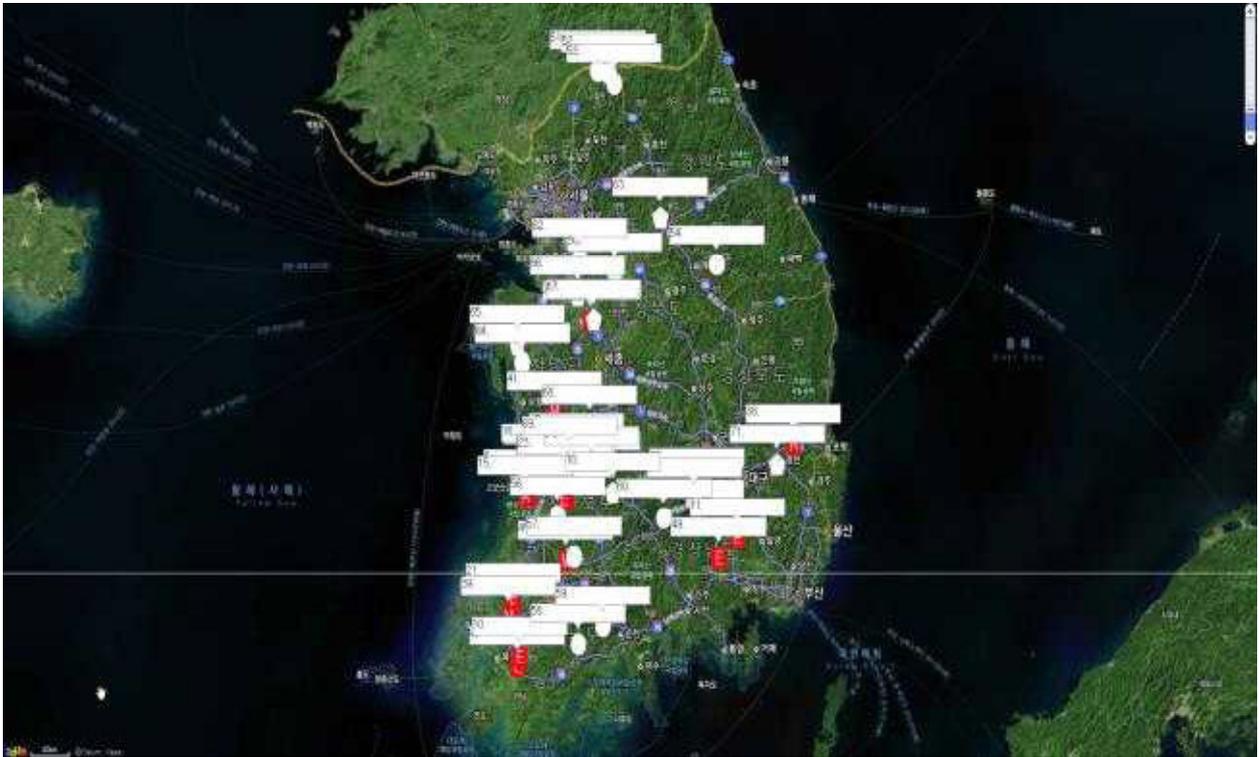
(다) 총 137곳의 양돈장 중 6개월 이내의 PRRS PCR과 ELISA 검사결과와 농장별 PRRS 발생 정보를 바탕으로 양성으로 확인된 농장이 73곳이었고 음성으로 확인된 농장이 64곳으로 확인되었다.

- (라) 평균 10,000두 규모의 비육장 5곳을 제외하고 132곳 양돈장의 모든 58,973두 규모의 정보를 수집할 수 있을 것으로 기대된다.
- (마) 총 137곳의 선발 농장의 농장정보가 현재 수집 중이며 6개월 마다 재평가가 이루어질 예정이다.

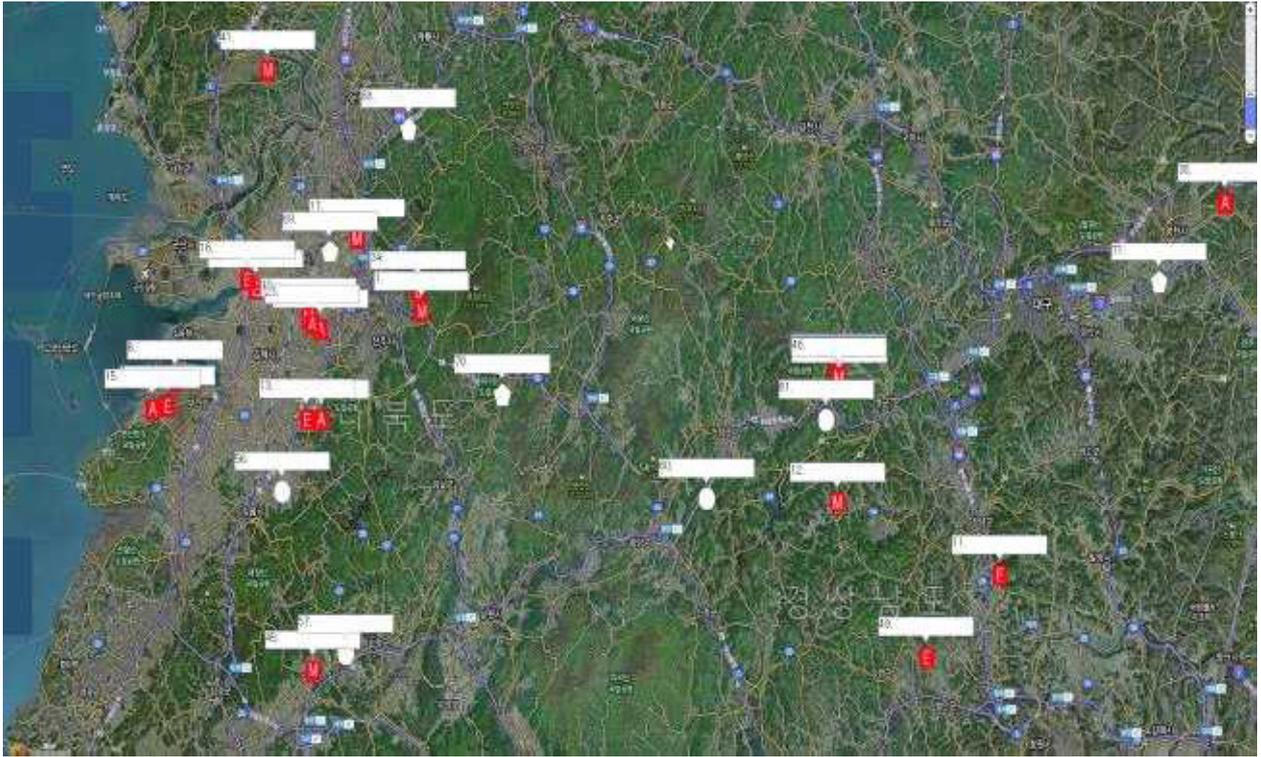
마. PRRSV 발병 현황 지도 (일반농가, 종돈장, 도축장, AI센터)

- (1) 수집된 PRRS 발생 위험수준 조사자료를 지리정보에 근거하여 표현
- (2) 시, 군단위 농장수 및 사육두수를 전국 단위 지도에 표현
- (3) 농장 고유번호, 지리적 위치, 농장 경영형태, PRRS 질병 수준, PRRS 유전형 정보 지도에 표현

■ PRRSV 발병 현황 지도 화면



< PRRSV 발병 현황 지도 >



< PRRSV 발병 현황 지도 >



< PRRSV 발병 현황 지도 >

■ PRRS 발병지도 아이콘 설명

시설형태	질병상황	유전자형	표현형
일반농가	양성	N/A(북미형)	
		EU(유럽형)	
		M(혼합형)	
	음성	-	
	모름	-	
종돈장	양성	N/A(북미형)	
		EU(유럽형)	
		M(혼합형)	
	음성	-	
	모름	-	
AI센터	양성	N/A(북미형)	
		EU(유럽형)	
		M(혼합형)	
	음성	-	

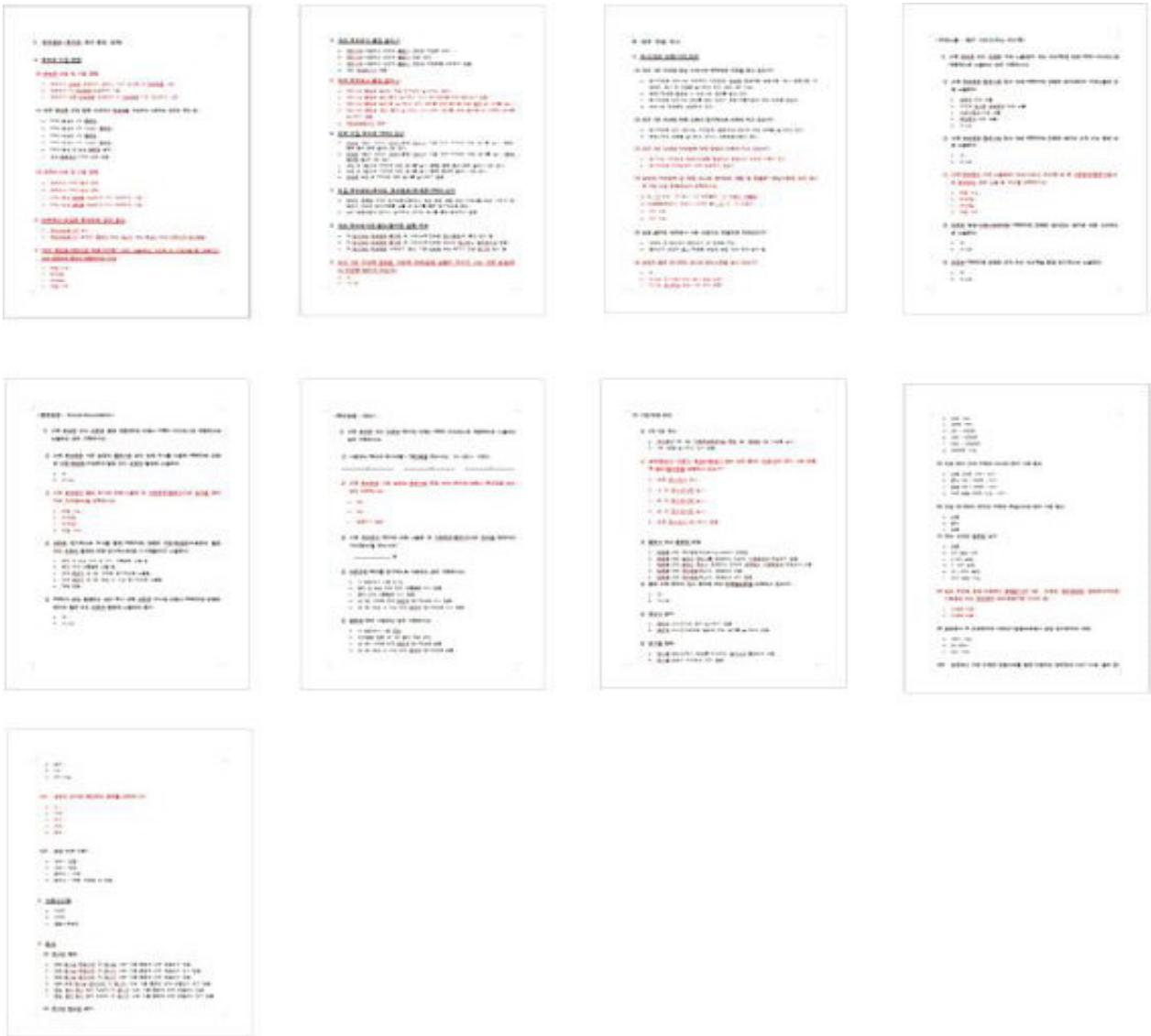
	모름	-	
--	----	---	---

2. PRRS 위험수준 평가모형 개발 및 클러스터링 분석 (2차년도)

가. PRRS 조사자료 입출력 시스템 개선 작업

(1) 설문 문항 변경

(가) 1차년도 설문작업을 수행한 주관기관의 양돈 전문수의사의 의견을 취합 결과를 반영하여 설문문항 변경, 2차년도 설문결과가 1차년도 설문작업 결과와 연계되어 평가되도록 1차년도 입력정보 수정

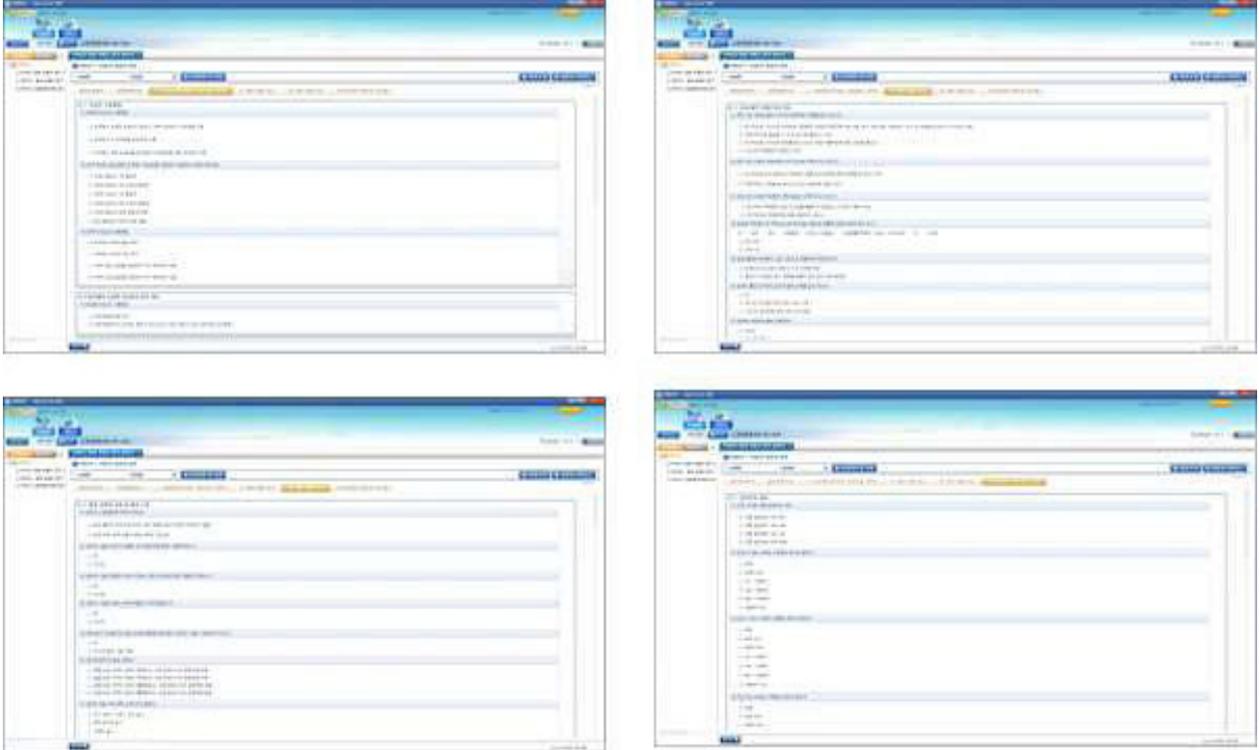


(2) 가중치 변경

(가) 위험도 평가 시스템 취지에 맞게 위험도가 높을수록 점수가 높도록 가중치 변경

(나) 주관연구기관의 가중치 변경안을 시스템에 반영하도록 프로그램 변경

(2) 입출력 시스템의 UI 일부 변경



나. 양돈장 방문조사를 통한 PRRS 위험도 평가 관련 역학정보 수집

(1) 1차 년도 선발 양돈장의 위치, 사양 및 방역환경 등의 PRRS 관리에 중요한 정보 재수집

(가) 지역별로 강원 3곳, 경기 29곳, 경남 8곳, 경북 30곳, 전남 5곳, 전북 18곳, 제주 6곳, 충남 20곳, 충북 18곳 등 총 137곳의 양돈장을 PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 적용 및 개선에 대한 연구에 참여 동의를 받아 선발하고 지속적으로 관리해 나가고 있음

(나) 총 137곳의 양돈장 중 6개월 이내의 PRRS PCR과 ELISA 검사결과와 농장별 PRRS 발생 정보를 바탕으로 양성으로 확인된 농장이 73곳이었고 음성으로 확인된 농장이 64곳으로 확인되었음

(다) 총 137곳의 선발 농장의 농장정보가 현재 수집 중이며 6개월 마다 재평가가 이루어질 예정

(2) 2차 년도 추가 농장선정

(가) 지역별 사육두수, 농장수를 고려한 증화확률표본추출로 위험도평가 참여 양돈장 90곳을 추가로 선발(표 2-1)

- (나) 조사방법: 위험수준 평가를 위해 사전 계획된 설문서를 이용한 면접조사
- (다) 조사자: 한국양돈수의사회 및 양돈전문컨설팅사와 협력하여 지역별 컨설턴트를 선정
- (라) 조사기간: 6개월 마다 농장의 PRRS 상황을 분석하기 위하여 진단검사와 방문 평가 실시

표 2-1. PRRS 위험도 평가 프로그램 개발을 위한 모니터링 농장정보

순번	농장명	주소	사육형태	PRRSV 양성/음성 여부		모돈 규모	총사육 규모
1	JH	경기도	자돈 생산 번식농장	PRRS 음성		400	5000
2	SG	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		474	6500
3	DL	충청북도	자돈 생산 번식농장	PRRS 음성		300	1100
4	NM	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	200	2500
5	HS	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	150	1800
6	SK	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	500	5500
7	AB	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	300	3500
8	JH	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	400	4800
9	AS	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		160	2000
10	HL	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	100	1100
11	SY	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	200	2400
12	MD	경기도	자돈 생산 번식농장	PRRS 양성	PRRS 백신접종	500	3000
13	YS	경기도	자돈 생산 번식농장	PRRS 양성		2300	30000
14	SK	충청북도	자돈 생산 번식농장	PRRS 음성		370	5000
15	DD	경기도	자돈 생산 번식농장	PRRS 양성		600	3000
16	SLS	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	300	3600
17	WS	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	190	2300
18	SH	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		550	4500
19	WD	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	250	2500
20	WO	경상북도	종돈장 일관(GP)	PRRS 음성		550	8000
21	HY	경상북도	종돈장 일관(GP)	PRRS 음성		490	6500
22	MY	경기도	종돈장 일관(GP)	PRRS 음성		220	2400
23	CH	충청남도	종돈장 일관(GP)	PRRS 음성		350	3800
24	IC	경상북도	비육장	PRRS 음성			1800
25	NA	경상북도	종돈장 일관(GP)	PRRS 음성		500	7000
26	DO	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		350	3800
27	CK	경기도	비육장	PRRS 양성			1400
28	NH	경상북도	비육장	PRRS 음성			
29	DK	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		220	2600
30	IR	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		200	2200
31	YU	경상북도	종돈장 일관(GP)	PRRS 음성		220	2500
32	TA	충청북도	비육장	PRRS 음성			1600
33	MH	경상남도	자돈 생산 번식농장	PRRS 양성		1800	11000
34	SA	경기도	자돈 생산 번식농장	PRRS 양성		600	3600
35	SW	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		450	5800
36	HC	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	190	2200

37	SY	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	120	1500
38	HK	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	200	2400
39	SL	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	220	2500
40	SM	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	250	2600
41	SSGYC	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		2800	30000
42	HI	경상북도	자돈 생산 번식농장	PRRS 양성		450	4000
43	SSGKW	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		1600	16000
44	SC	경상남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		180	2500
45	TG	전라남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		300	3000
46	DS	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	550	7000
47	DS	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		300	3000
48	KP	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		120	1100
49	ENMI	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	70	900
50	MY	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	140	1500
51	YS	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	300	3500
52	WJ	충청남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	380	4000
53	BR	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	2400	14000
54	SC	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	400	4000
55	KN	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	700	7000
56	HS	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	350	3500
57	DW	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	200	2000
58	AR	충청북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		570	5700
59	IL	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		400	4000
60	IM	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	300	3000
61	JD	전라남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		350	3500
62	SK	전라남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		500	5000
63	DD	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		1400	14000
64	SH	제주도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		250	2500
65	JS	제주도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		50	400
66	SL	제주도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		200	2000
67	KK	제주도	종돈장 일관(GP) / 일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		650	7000
68	SH	제주도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성	PRRS 백신접종	210	3000
69	HL	경상남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	350	4000
70	HK	경상남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		350	4000
71	MW	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	500	5000
72	EC	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성			
73	HI	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성	PRRS 백신접종	400	4200
74	A	전라북도	비육장	PRRS 음성		430	4300
75	B	충청북도	PRRS 음성	PRRS 음성		350	3500
76	C	전라남도	비육장	PRRS 음성		350	3500
77	D	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		550	5500
78	E	전라북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 음성		520	5200
80	MR	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		450	4500
81	DW	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		780	7800

82	KI	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		450	4500
83	WB	강원도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		280	2800
84	DH	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		900	9000
85	YI	경기도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		320	3200
86	JS	전라남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		330	3300
87	HB	충청북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		550	5500
88	KS	충청북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		350	3500
89	SK	경상북도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		420	4200
90	SKW	경상남도	일반농장 일관(PS)	PRRS 양성		550	5500
총 계							409,900

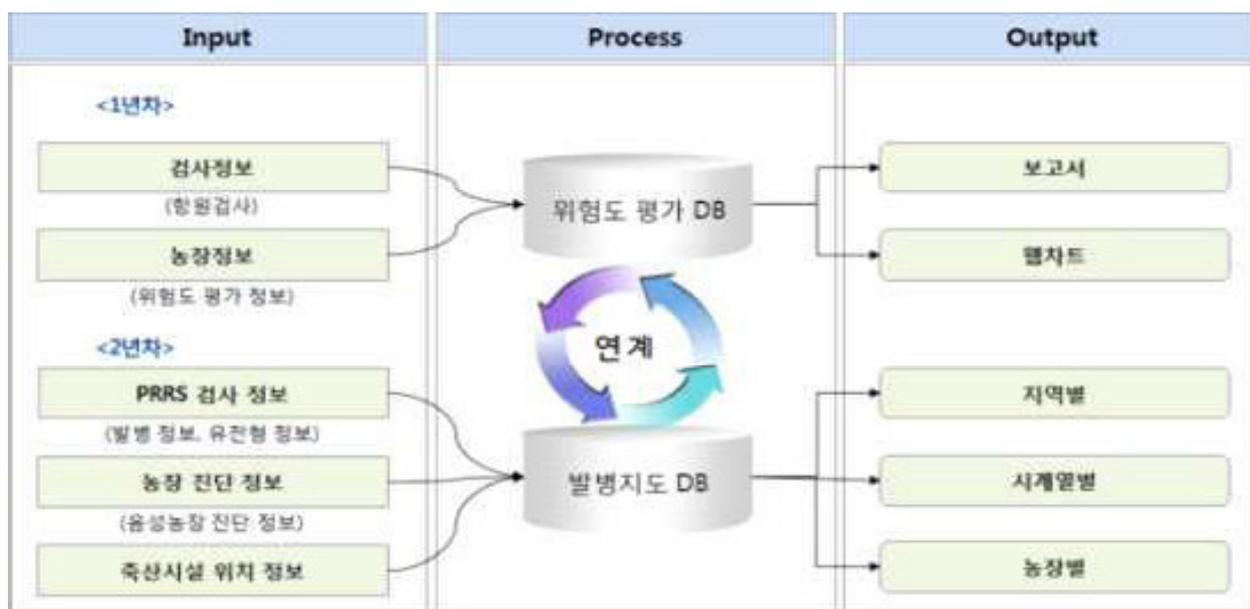
* 농장주 및 농장명은 개인정보 보호를 위해 삭제함.

** 군 단위 정보는 농장주의 요청에 따라 삭제함.

다. PRRS 발병지도 시스템 개발

(1) PRRS 발병지도 시스템 업무 흐름도

(가) 가축전염병 병성감정기관의 PRRS 검사정보(농장 위치정보 및 검사일, 검사기관, 검사결과, PRRS 유전형 포함)를 주관 연구기관으로부터 수령하여 지역별, 시계열별, 농장별로 GIS 정보위에 표출



(2) PRRS 발병지도 시스템 앱 기능 설명서

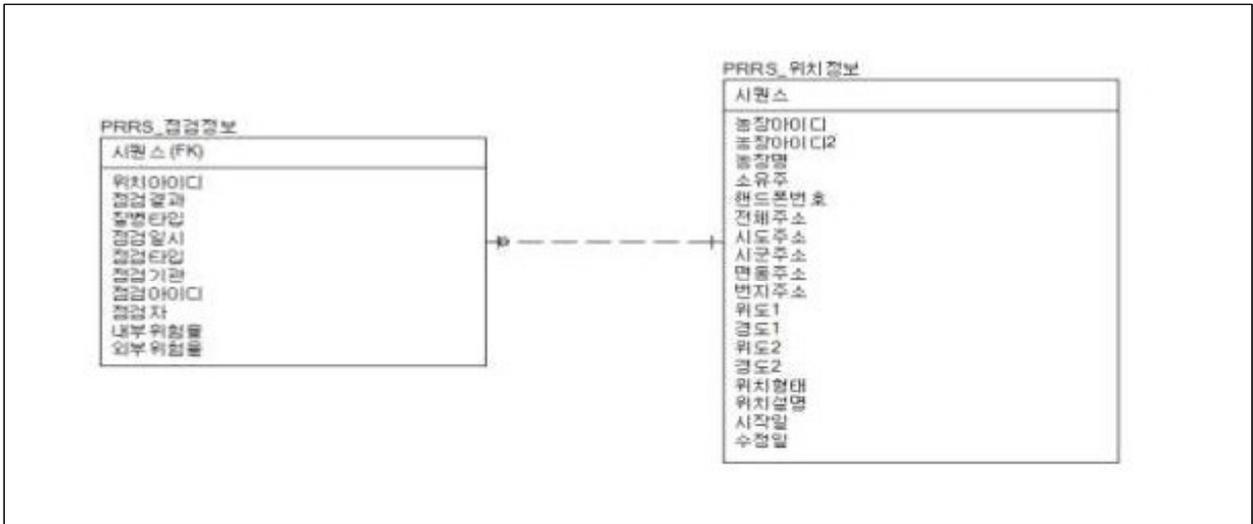
1차기능	2차기능	3차기능	기능설명
PRRS 발생지도	지도서비스	PRRS 양성결과 지도표기	- PRRS 양성검사 결과지도 표현
		도축장, 종돈장 지도표기	- 도축장, 종돈장, AI센터 위치 표현
	통계서비스	통계조회	- 연도별, 지역별 PRRS 양성검사결과 통계수치 조회
	PRRS	PRRS 질병정보 소개	- PRRS 질병정보 소개

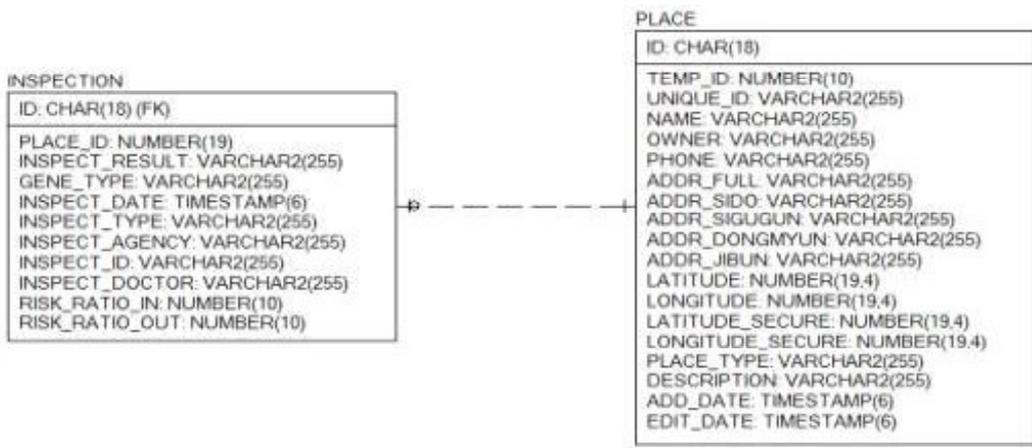
	정보서비스	<ul style="list-style-type: none"> - PRRS 바이러스 특징 소개 - PRRS 발생양상 소개 - PRRS 임상증상 소개 - PRRS 진단방법 소개
--	-------	---

(3) PRRS 발병지도 시스템 앱 데이터 기술서

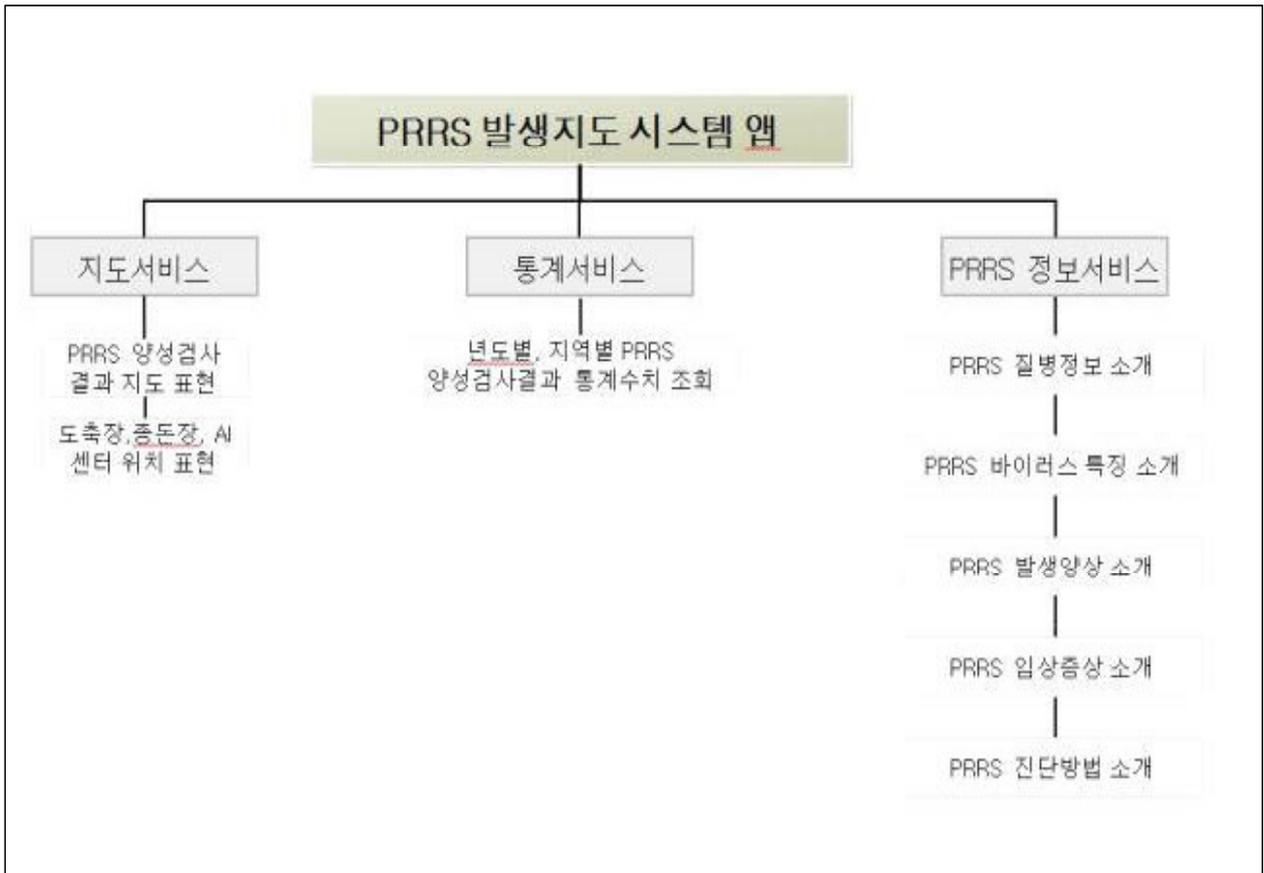
구분	엔티티명	엔티티설명
지도서비스 / 통계서비스	INSPECTION	ID, PLACE_ID, INSPECT_RESULT, GENE_TYPE, INSPECT_DATE, INSPECT_TYPE, INSPECT_AGENCY, INSPECT_ID, INSPECT_DOCTOR, RISK_RATIO_IN, RISK_RATIO_OUT
	PLACE	ID, TEMP_ID, UNIQUE_ID, NAME, OWNER, PHONE, ADDR_FULL, ADDR_SIDO, ADDR_SIGUGUN, ADDR_DONGMYUN, ADDR_JIBUN, LATITUDE, LONGITUDE, LONGITUDE, LONGITUDE, LATITUDE_SECURE, LONGITUDE_SECURE, PLACE_TYPE, DESCRIPTION, ADD_DATE, EDIT_DATE

(4) PRRS 발병지도 시스템 앱 데이터 연관도(논리 ERD, 물리 ERD)





(5) PRRS 발병지도 시스템 앱 어플리케이션 구조도

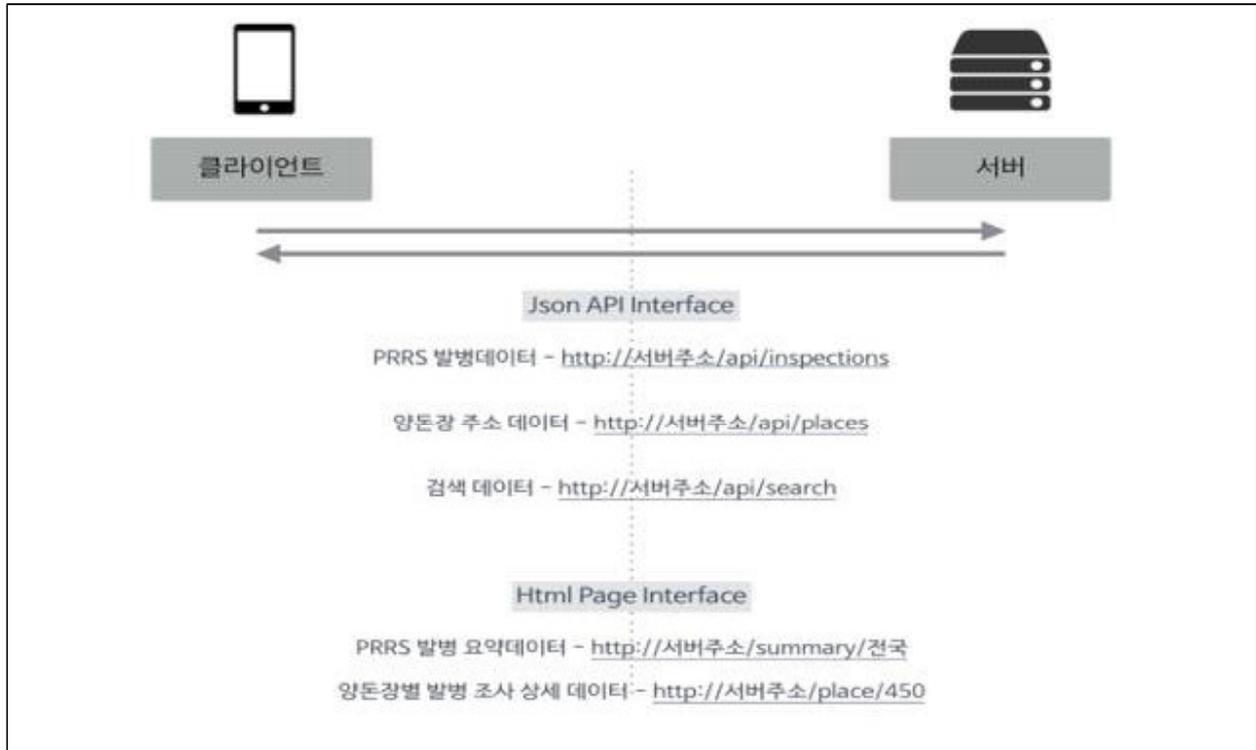


(6) PRRS 발병지도 시스템 앱 구성

(가) 클라이언트/서버 통신 인터페이스 구성

PRRS 발병데이터의 지속적인 업데이트를 위해서 클라이언트/서버의 구조로 어플리케이션 아키텍처를 설계하였으며 데이터 통신은 HTTP와 REST(웹상의 자료를 HTTP위에서 SOAP이나 쿠키를 통한 세션 트래킹 같은 별도의 전송 계층 없이 전송하기 위한 인터페

이스)으로 구현됨



(나) 오픈소스 활용

개발 기간을 단축 및 제품의 품질을 위해 다양한 오픈소스를 활용

① 클라이언트측 오픈소스

retrofit, okhttp : 서버와의 REST 통신 인터페이스 관리

② 서버측 오픈소스

apache poi : 엑셀파일로 제공받은 대량의 발병데이터를 에서 DB로 변환하기 위한 작업에 이용

google guava : 빠른 개발을 위한 다양한 helper 제공

joda time : 시간 단위 변환 helper 제공

google chart api : PRRS 발병데이터 요약정보를 표현하기 위해 사용

twitter bootstrap : HTML, CSS 디자인 프레임워크

(다) 서버

① Playframework

Java, Scala기반의 웹 어플리케이션을 위한 프레임워크로 MVC 아키텍처를 따르고 있으며 웹서버를 내장하고 있어 별도로 서버를 세팅할 필요가 없는 등 빠른 개발에 필요한 다양한 장점을 지니고 있음

- ㉔ 비동기 방식의 프로그래밍을 지원함, 액터(Actor)에 기반한 모델로 이루어져 고도의 분산화된 시스템을 만들 수 있다.
- ㉕ 컴파일러가 자료형을 확실하게 검사하여 타입의 오류를 막거나 방지해준다.
- ㉖ 자바와 스칼라를 네이티브 방식으로 지원한다.
- ㉗ 강력한 빌드 시스템을 제공한다.
- ㉘ 데이터저장과 모델 통합을 제공하여 데이터 모델을 다루기 쉽다.

② Naver 지도 api

PRRS 질병데이터를 지도위에 표현하기 위해 제공받은 지번주소를 위도/경도 주소로 변환하는 과정이 필요하였으며 이를 위해 naver 지도 api를 사용(REST 기반의 변환 인터페이스를 제공) 이를 이용하여 지번주소를 위도/경도 주소로 변환하였음

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8" standalone="yes" ?>
<geocode xmlns="naver:openapi">
  <userquery>
    <![CDATA[ 경상남도 함양군 함양읍 용평리 470-6 ]]>
  </userquery>
  <total>1</total>
  <item>
    <point>
      <x>127.7379814</x>
      <y>35.5119689</y>
    </point>
    <address>경상남도 함양군 함양읍 용평리 470-6</address>
    <addrdetail>
      <sid>
        <![CDATA[ 경상남도 ]]>
        <sigugun>
          <![CDATA[ 함양군 함양읍 ]]>
          <dongmyun>
            <![CDATA[ 용평리 ]]>
            <rest>
              <![CDATA[ 470-6 ]]>
            </rest>
          </dongmyun>
        </sigugun>
      </sid>
    </addrdetail>
  </item>
</geocode>

```

<변환 예시화면 >

(7) PRRS 검사결과 정보 등 수집

(가) 검사정보 제공기관 : 읍티팜, 전북대

(나) 제공정보 : 농장 위치(군단위), 유전형, 검사기관, 검사일시, 검사번호

	전북대	읍티팜	비고
농장 수	294	269	
샘플 수	365	402	

(다) 음성진단 정보 : 34개 농장

(라) 위험도 평가 정보 : 68개 농장(위험도 평가 프로그램 입력 데이터 연계)

(마) 축산시설 위치 정보

① 도축장 정보 : 국립수의과학검역본부 게시판,

② 종돈장 및 AI센터 정보 : 한돈협회 전산성적 2012 자료집)

	도축장	종돈장	AI센터
개소 수	145	151	44

(8) PRRS 발병지도 어플리케이션 활성화를 위한 정책 협의

(가) PRRS 발병지도 어플리케이션을 활용한 클러스터링 분석 등을 위해서는 농장의 위치정보 및 검사결과 정보 등이 공개될 수 있도록 정보 주체인 농가 및 당국의 동의가 필수적임.

(나) 생산자단체 면담 : 대한한돈협회 방역대책위원회, 2015, 4, 24일

① 참석자

- ㉠ 한돈협회 부회장, 상무 및 PRRS ARC 참여 농가 대표 다수
- ㉡ 박봉균(서울대 교수), 박선일(강원대 교수)
- ㉢ 양돈수의사회 김현일 이사 등 다수 참

② 주관연구기관 책임연구원의 “PRRS 발병지도 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답

(다) 생산자 교육 : 부경양돈조합 소속 농가 대상, 2015, 4, 10일

① 참석자

- ㉠ 부경양돈조합 조합장 외 농가 다수

② 주관연구기관 책임연구원의 “PRRS 발병지도 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답

(라) 정책당국 면담 : 농림축산검역본부, 2015, 4, 13일

① 참석자

- ㉠ 검역본부 질병진단과 직원 다수

② 이지팜 책임연구원의 “이지팜의 PRRS 연구 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답

(마) 통계 연구자 교육 : 서울대 농업정보체계실, 2015, 4, 12일

① 참석자

- ㉠ 서울대 농업정보체계실 소속 연구원 다수
- ② 이지팜 책임연구원의 “이지팜의 PRRS 연구 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답
- ③ PADRAP 개발자 홀캠프 교수의 페드랩 개발 사례 발표 후 질의/응답

(9) PRRS 발병지도 시스템 앱 화면



① 아이디 / 패스워드 입력

② 로그인버튼

- 아이디 / 패스워드 입력후 로그인 버튼 클릭 하여 발병지도앱화면으로 이동



① PRRS 발병지도 화면

- 손가락 터치 및 +, - 버튼을 통해 지도 확대, 축소 가능

② PRSS 발병현황 정보제공 화면

- 전국 및 각 지역별 발병지도 현황 정보 제공

- ^ 버튼 클릭을 통해 발병지도 현황 상세화면으로 이동



- ① PRSS 발병현황 정보제공 화면
- 전국 및 각 지역별 발병지도 현황 및 원형그래프 정보 제공



- ① PRRS 발병지도 화면
- PRRS 발병지도 확대 화면으로 면단위까지 확대 가능



① 축산시설 검색화면

- 검색조건 입력화면으로 시설명, 대표자명, 농장유형, 주소를 검색조건으로 가진다.

② 검색버튼

- 검색조건 입력후 검색버튼 클릭을 통해 축산시설 검색



① 축산시설 조회정보 화면

- 검색한 축산시설 정보를 보여주는 화면



① PRRS 질병정보 화면

- PRRS 질병지도 앱 이용방법 및 PRRS에 대한 기본 정보를 보여주는 화면

(10) PRRS 발병지도 프로그램 등록증



3. PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발 (3차년도)

가. PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발 (기술이전 준비)

(1) 프로그램의 유용성 확보를 위한 양돈장 PRRS 조사용 설문서 입출력 관리 시스템 개발
 사용자 편의성, 자료의 유효성, 유지보수의 용이성, 활용의 용이성을 위해 전자정부프레임워크 기반의 설문서 입출력 관리 시스템을 신규 구축함

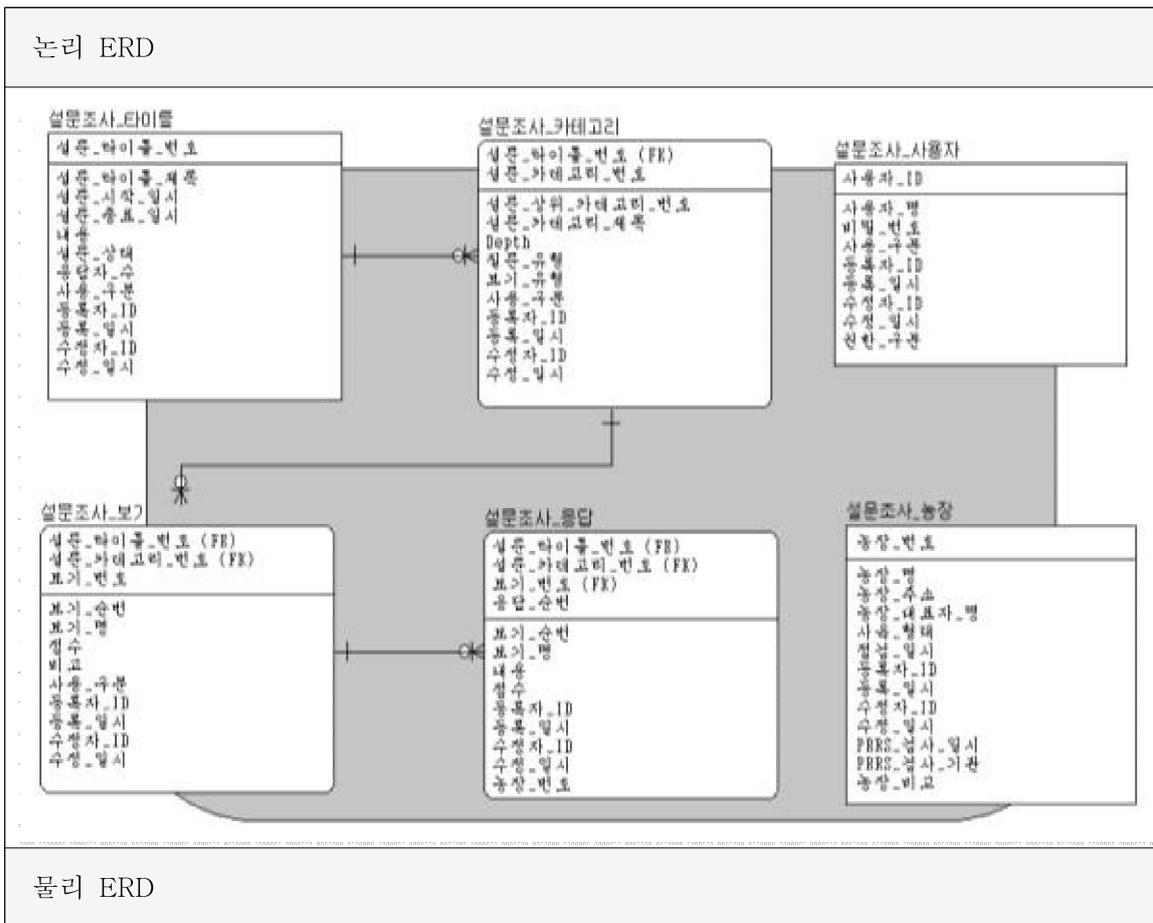
(가) 구축 사항

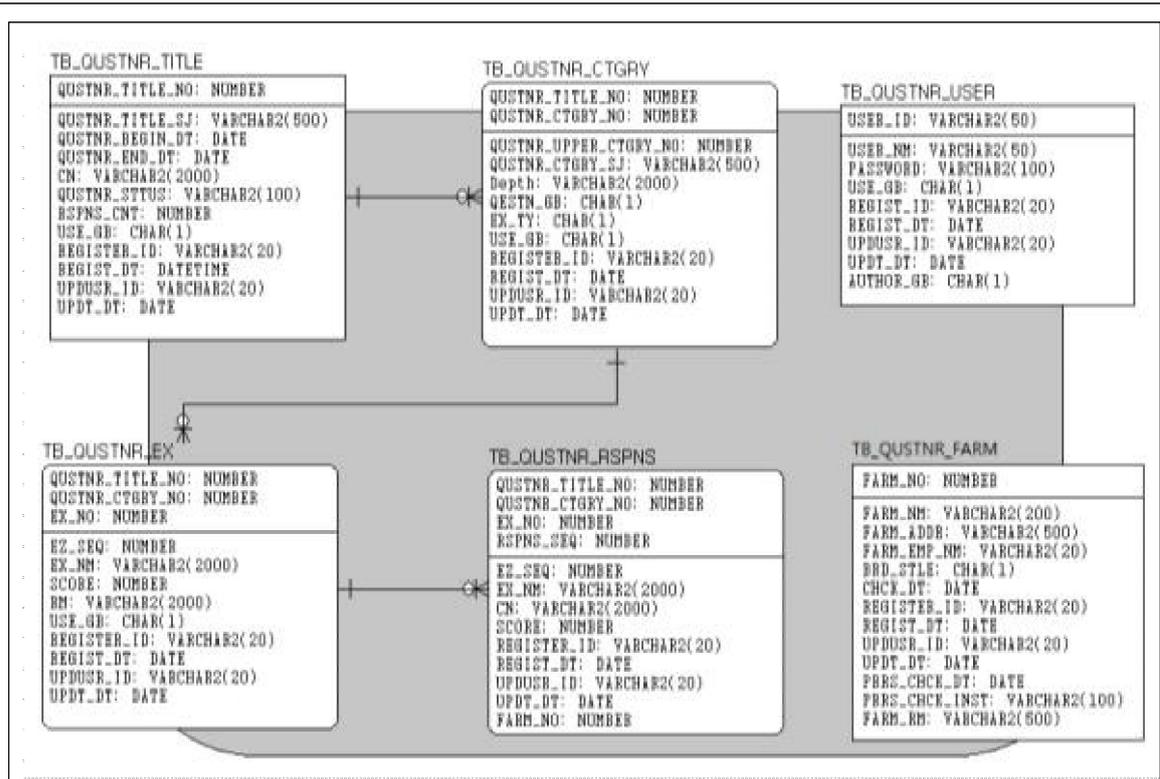
① 시스템 사양

구분	사양
운영체제	Linux 또는 Windows Server
데이터베이스	MySQL Server 5.6
개발언어	Java 1.6.045
프레임워크	eGovFrame 3.2
WAS	Tomcat 7.0

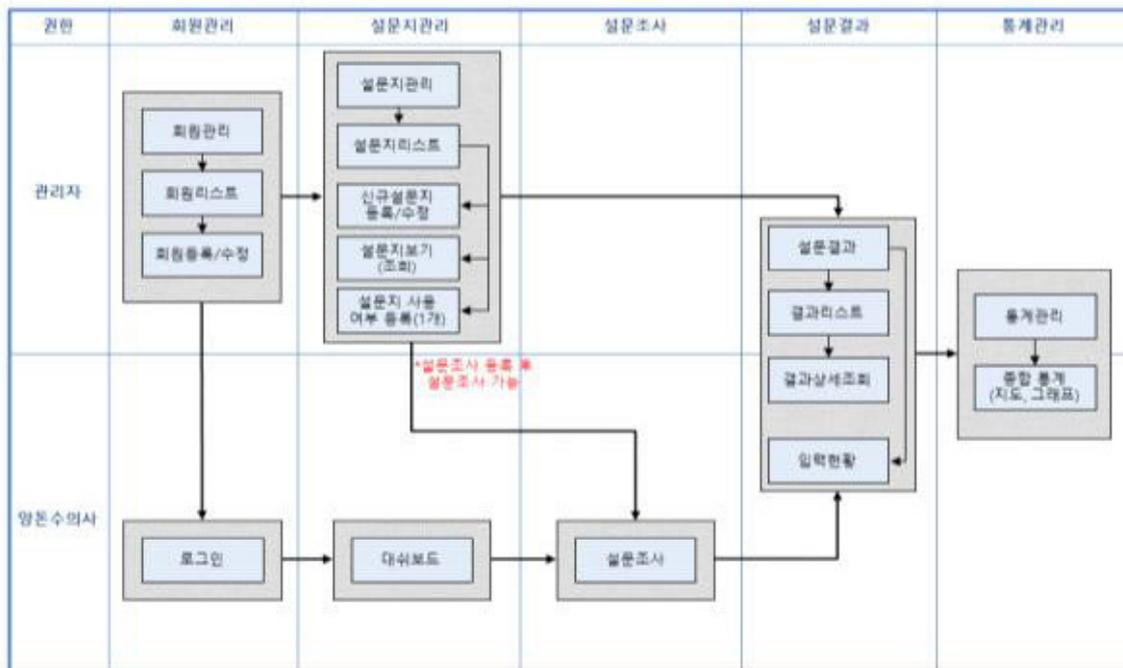
② 데이터베이스 구축 사항

㉞ 설문 조사 데이터 연관도





③ 어플리케이션 기능 구조



④ 사용자 화면 구성

㉞ 사이트 접속

사용자 접근성과 양돈수의사회로 기술이전을 위해 양돈수의사회 홈페이지를 통해 접속



[양돈수의사회 홈페이지 좌측 배너에 PRRS 위험도 평가 프로그램 링크 게시]

㉠ 설문지 관리



- | | |
|-----------------|----------------|
| 1. 주 메뉴 네비게이션 바 | 2. 설문 리스트 조회조건 |
| 3. 설문 등록 | 4. 설문 문항 보기 |

㉔ 설문결과

The screenshot shows the '설문결과' (Survey Results) page. It features a navigation bar with '설문지관리', '설문결과', '통계관리', and '회원관리'. The main content area is titled '설문결과' and includes a sidebar with '설문결과' and '설문입력현황'. The main content is divided into four sections: 1. '설문지 정보' (Survey Location Info) with fields for '설문지 지역' (Survey Location: PRRS 위험도 평가 설문서 Ver 1.0), '수의사명' (Veterinarian: 김수용), and '농장명' (Farm Name: WJ농장 (Jongseong)). 2. A map showing the farm's location. 3. A scatter plot titled '통합 PRRS 위험도 사분면 그래프' (Integrated PRRS Risk Quadrant Graph) showing '설문지 위험도' (Survey Location Risk) on the y-axis and '농장 위험도' (Farm Risk) on the x-axis. 4. '항목정보' (Item Info) table with fields for '농장주소' (Farm Address: 경북 김천시 용성면), '농장대표' (Farm Representative: 지남), '소재형태' (Location Type: 종돈장, 육돈사육기, 종돈장, 육돈사육기, 육돈, 양돈번식농장, 육돈, 양돈번식농장, 번식장), and '경영일' (Operating Days: 2018-02-18).

1. 설문 결과 조회조건 (설문지, 수의사, 농장 선택)
2. 선택 농장 위치
3. PRRS 위험도 사분면 그래프
4. 항목별 답변 내역과 점수

㉕ 설문입력 현황

The screenshot shows the '설문입력현황' (Survey Input Status) page. It features a navigation bar with '설문지관리', '설문결과', '통계관리', and '회원관리'. The main content area is titled '설문입력현황' and includes a sidebar with '설문입력현황' and '통계관리'. The main content is divided into two sections: 1. A search bar with fields for '설문제목' (Survey Title: 검색), '수의사명' (Veterinarian: 검색), and '설문기간' (Survey Period). 2. A table showing survey data with columns for '순번' (Serial No.), '설문 제목' (Survey Title), '기간' (Period), '수의사명' (Veterinarian), and '입력량' (Input Amount). The table contains 9 rows of data.

순번	설문 제목	기간	수의사명	입력량
1	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-06-01 ~ 2018-08-31	김수용	43
2	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	김수용	8
3	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	이영우	0
4	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	윤종대	13
5	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	이현근	16
6	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	김진	11
7	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	유재현	35
8	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	김현종	5
9	PRRS 위험도 위험도 평가 설문서 Ver 1.0	2018-07-01 ~ 2018-07-31	김홍열	11

1. 설문 입력현황 조회조건 (설문지, 수의사, 설문기간)
2. 조회 결과 (설문서 버전, 설문 기간, 수의사, 입력량 조회)

㉔ 종합 통계

1. 종합 통계 조회조건 (설문지, 검색기간, 그룹 구분기준)
2. 조회 결과 (PRRS 위험도 사분면 그래프)

㉕ 회원 관리

번호	ID	수의사명	회원번호(암호화)	권한	사용여부	등록일
1	admin	관리자	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	관리자	사용	2016-01-07
2	admin	최인수	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-07
3	user1	김수동	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-07
4	user2	이영주	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-07
5	user3	홍영태	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-07
6	user4	서현근	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-07
7	user5	김선	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-08
8	user6	류재진	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-08
9	user7	김현철	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-08
10	user8	김영우	5D4D02940E1F4cA427D187b(L1v81kx0D9vE2)	사용자	사용	2016-01-08

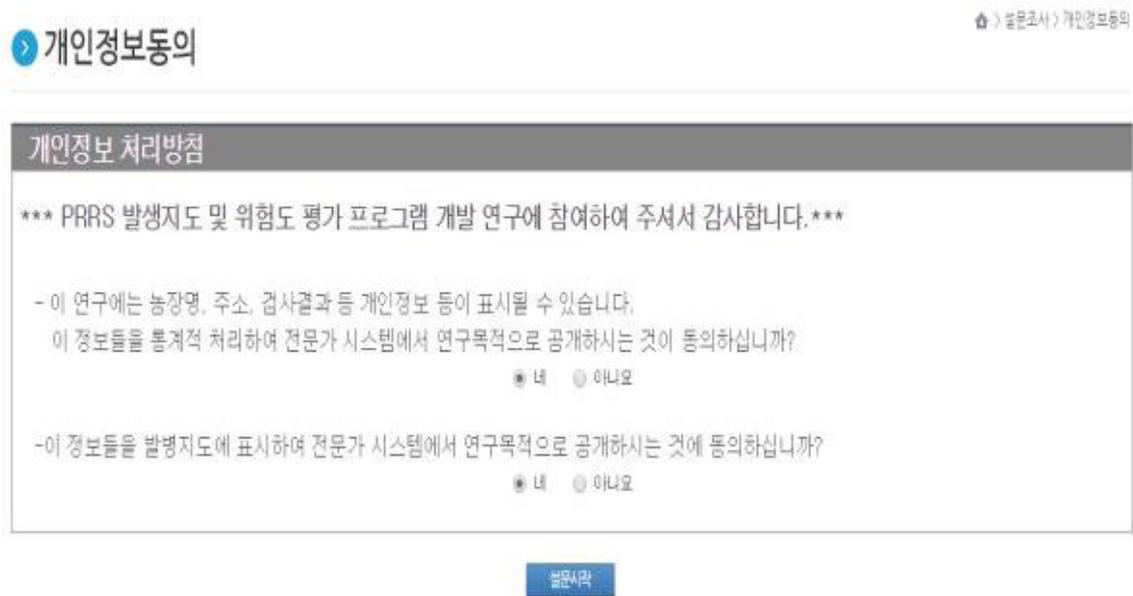
1. 회원 리스트 조회조건 (ID, 수의사명, 권한, 사용여부)
2. 사용자 등록
3. 조회 결과

(2) 웹 평가시스템 디자인 개선 및 조사대상 양돈장에 대한 정보제공 시스템 확립
 (가) 시스템 재구축으로 디자인 개선



[시스템 재구축으로 디자인 개선]

(나) 개인정보 활용에 동의할 경우에만 입력 가능



[설문 전 개인정보활용 안내]

(다) 설문결과 입력 단계에서 답변하지 않은 문항이 없도록 (Null을 허용하지 않도록) 유효성 검증 기능

4. PRRS 상황

(1) 현재 PRRS 상황(실험실 진단 결과를 기준)

- a. 음성-한번도 감염되지 않았음
- b. 음성-과거에 감염되었
- c. 양성-모든군 안정화()
- d. 양성-모든군 불안정()
- e. 모름

[사육형태](은)는 필수체크 사항입니다.

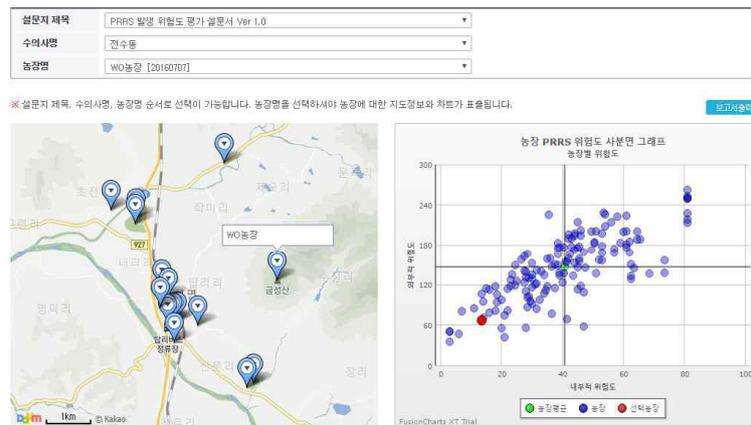
(2) PRRS의 타입은?

- a. 복미형
- b. 유럽형
- c. 복미형 및 유럽형 모두
- d. 없음(농장은 음성)
- e. 모름

확인

[필수 입력항목 유효성 검사]

(라) 조사대상 양돈장의 설문결과 조회 및 농장 간의 위험도 비교 기능 구현



1. 후보종돈 (후보돈, 후보 웅돈, 정액)

1.1. 후보돈 도입 방법

1.1.1. 후보돈 도입 및 사용 방법

- (1). 외부에서 후보돈 도입하지 않으나, 자체 생산된 F2 후보돈을 사용
- (2). 외부에서 F1 후보돈을 도입하여 사용
- (3). 외부에서 순종 후보돈을 도입하며, F1 후보돈을 사체 생산하여 사용

1.1.2. 외부 후보돈 도입 방법 (외부에서 후보돈을 구입하여 사용하는 농장만 해당 됨)

- (1). 외부에서 들어오지 않고, 농장 내에서 자체 생산된 후보돈을 사용
- (2). PRRS 음성의 1개 종돈장
- (3). PRRS 음성의 2개 이상의 종돈장
- (4). PRRS 양성 1개 종돈장
- (5). PRRS 양성 2개 이상의 종돈장
- (6). PRRS 음성 외 양성 종돈장 혼재
- (7). 도입 종돈장의 PRRS 상태 모름

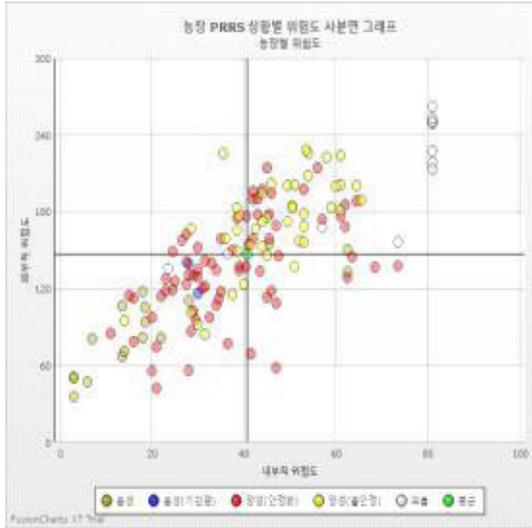
농장점수 : 30.5 점 / 평균점수 : 43.0 점

농장점수 : 11.0 점 / 평균점수 : 9.9 점

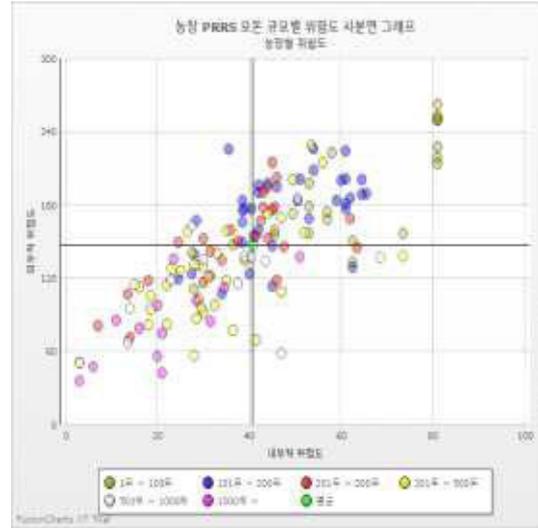
농장점수 : 5.0 점 / 평균점수 : 4.3 점

농장점수 : 6.0 점 / 평균점수 : 3.2 점

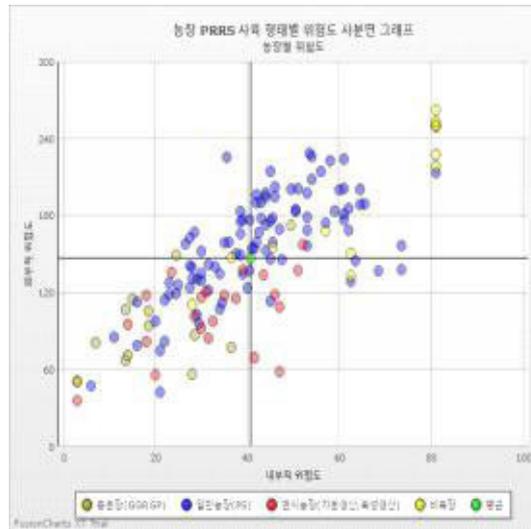
[조사대상 양돈장의 설문결과 조회 화면]



[PRRS 상태 그룹 간 비교]



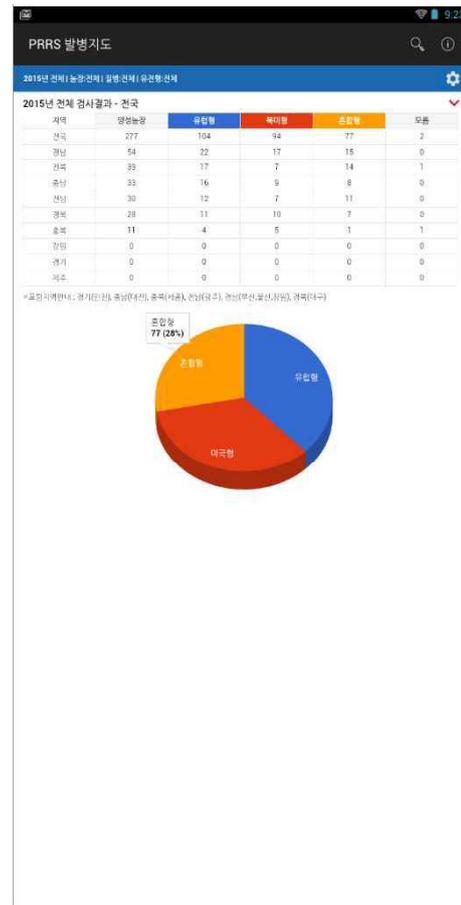
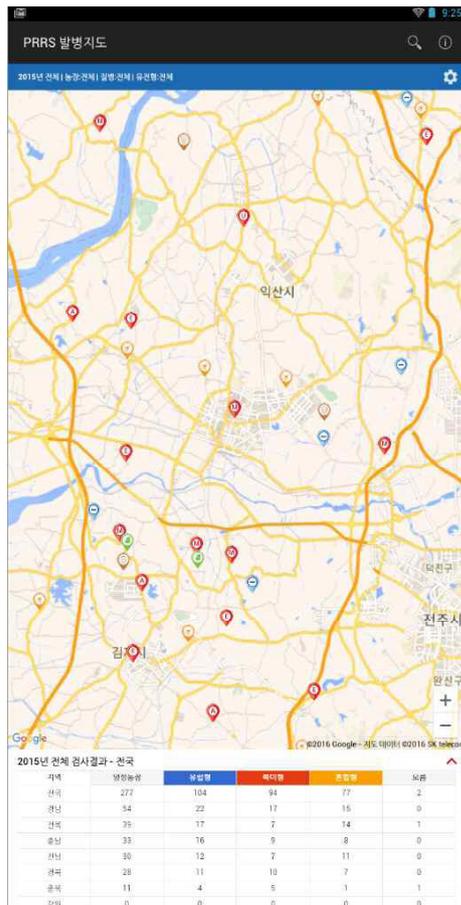
[농장 규모 그룹 간 비교]



[사육 형태 그룹 간 비교]

(3) 제 1 세부의 유전자 정보를 통합한 PRRS 평가 프로그램 개발

(가) 2015년 유전자 정보(검사 결과)가 지도상에 표출될 수 있도록 데이터 업데이트



[2015년 유전자 정보가 반영된 PRRS 발병지도 안드로이드 어플]

나. 평가모형의 타당성 검증을 위한 양돈장 대상 실증 연구

3차년도에 147 개 양돈장을 대상으로 설문을 실시하고 설문 프로그램을 통해 입력 설문 결과에 대해 평가문항 중요도 분석, 평가모형 수정 및 검증

[3 차 년 PRRS 위험도 평가 설문서]

<일반 현황 조사>	
1. 기본 정보	
■ 농장명	- 오른쪽에 적어주세요
■ 농장주소	- 오른쪽에 적어주세요
■ 농장대표	- 오른쪽에 적어주세요
■ 사육형태	- 오른쪽에 적어주세요
<input type="checkbox"/> 종돈장 일관 (GGP), <input type="checkbox"/> 종돈장 일관 (GP), <input type="checkbox"/> 일반농장 일관 (PS) <input type="checkbox"/> 자돈생산번식농장, <input type="checkbox"/> 육성생산번식농장, <input type="checkbox"/> 비육장	
■ 점검일	- 오른쪽에 적어주세요
■ 점검자	- 오른쪽에 적어주세요
2. 양돈장 현재 질병 상황 (실험실 진단 기준으로 해당 사항에 기록하시오)	
■ PRRS	
a. 양성,	b. 음성, c. 백신접종, d. 상태 모름
■ 구제역	
a. 양성,	b. 음성, c. 백신접종, d. 상태 모름
■ PED	
a. 양성,	b. 음성, c. 백신접종, d. 상태 모름
■ TGE	
a. 양성,	b. 음성, c. 백신접종, d. 상태 모름
■ 유행성폐렴 (MH)	

- b. 격리사의출입은일과중에 실시하나,다시돼지관리를위해돌아오지않음(0)
- c. 격리사의출입은일과중실시하고,돼지관리를위해돌아올때는환복및샤워를실시(1)
- d. 격리사의출입은일과중에 실시하고,다시돼지관리를위해돌아올때아무런조치를실시하지않음(1.5)
- e. 격리후보돈사가없음(2)

6. 외부 도입 후보돈 PRRS 검사는?

- a. 도입후 3일 이내 그리고 교배사(혹은 임신사) 이동 전에 PRRS에 대한 검사를 실시 (항원, 항체 검사 모두 실시)- 2회 검사 (0)
- b. 도입후3일 이내그리고교배사(혹은임신사)이동전에PRRS에대한검사를실시(항체검사만실시)-2회검사(5)
- c. 도입후3일 이내에PRRS에 대한검사를실시(항원,항체검사모두실시) - 1회검사(7)
- d. 도입후3일 이내에PRRS에 대한검사를실시(항체검사만실시) - 1회검사(10)
- e. 후보돈도입후PRRS에 대한검사를실시하지않음(15)

7. 도입 후보종돈(후보돈, 후보용돈)에 대한 PRRS 순치는?

- a. PRRS 음성농장이기 때문에 PRRS에 대한 순치를 하지 않음 (0)
- b. PRRS양성농장이기때문에맞춤형PRRS순치프로그램(백신또는혈청접종또는자연노출또는기타)이확립되어있으며순치여부를노출후검사를통해정기적으로확인(0)
- c. PRRS순치하고있지만검사를통해확인하지않음(4)
- d. PRRS양성농장이거나순치프로그램이없음(8)

8. 격리 후보돈사의 올인/올아웃 실행 여부는?

- a. 매 입식되는 후보돈은 올아웃 후 세척/소독/건조된 돈사(돈방)에 올인 입식 됨 (0)
- b. 매입식되는후보돈은올아웃후세척/소독/건조된펜스에입식되나,올인되지는않음(2)
- c. 매입식되는후보돈은세척되지않고,기존후보돈또는돼지가있는돈사에입식됨(3)

9. 최근 3년 이내에 후보돈 이외에 외부(질병 상황이 차이가 나는 다른 농장의 이유모돈, 임신돈, 웅돈, 자돈 등)에서 도입한 돼지가 있는가?

- a. 예 (10) b. 아니오(0)

II. 내부 위험 요소

1. 돈사/내부 인원/기타 관리

(1) 최근 3년 이내에 담당 수의사와 계약하여 자문을 받고 있는가?

- a. 정기적으로 수의사와 계약하여 차단방역, 후보돈 환경적응 프로그램, 백신 프로그램, 위생관리, 검사 및 처방을 실시하고 있다 - 년간6회이상. (0)
- b. 부정기적으로필요할시수의사의관리를받고있다.(2)
- c. 정기적으로수의사의관리를받고있으나주로약품처방에대한조건만받는다.(2)
- d. 수의사와전화로만상담하고있다.(3)
- e. 수의사의자문을전혀받지않고,자체적으로질병관리를한다.(4)

(2) 최근 3년 이내에 직원 교육이 정기적으로 이루어지고 있는가?

- a. 정기적으로 년간 4회이상 차단방역, 질병/위생 관리에 대한 교육을 실시하고 있다. (0)
- b. 부정기적으로2회이하로교육하고있다.(3)
- c. 교육하지않음(5)

(3) 차단방역 자체 점검이 이루어지고 있는가?

- a. 월 1회 정기적인 차단방역 점검리스트를 활용하고 점검하고 있으며 기록이 있다. (0)
- b. 분기1회정기적인차단방역점검리스트를활용하고점검하고있으며기록이있다.(2)
- c. 년1회정기적인차단방역점검리스트를활용하고점검하고있으며기록이있다.(5)
- d. 차단방역점검리스트가없고,정기적으로차단방역에대해점검하지않는다.(10)

(4) 농장에 차단방역 상 위해 요소로 생각되는 해충 및 동물은? 해당 사항에 모두 표시 후 3개 이상 존재하는지 선택하십시오.

쥐, 파리, 모기, 바퀴벌레, 새 (돈사 내부 출입), 야생동물(멧돼지,고라니,너구리등), 개, 고양이

- a. 3개이하(0)
- b. 3개이상(1)

(5) 농장 울타리 내부에서 나온 쓰레기는 청결하게 처리되는가?

- a. 내부의 한 장소에서 분리수거 후 외부로 처리 (0)
- b. 분리수거안되며돈사주변을포함한농장여러곳에방치됨(1)

(6) 농장의 물은 정기적인 검사와 음수소독을 실시 하는가?

- a. 예 (0)
- b. 아니오,단비정기적인검사또는소독(0.5)
- c. 아니오,모니터닝또는기타조치없음(1)

(7) 농장에 공급되는 물의 공급처는?

- a. 지하수 또는 수돗물 (0)
- b. 건수(물부족시돼지사육에사용되는경우/처리장에사용하는물은제외)(1)

(8) 주관정 및 돈사 내 물 탱크는 어떻게 관리되는가?

- a. 닫혀있고, 주기적으로 비우고 세척하여 청결하게 유지함 (0)
- b. 닫혀있지않고불결함(1)

(9) 소독

- a. 돈사내 ●외부를 1일 1회소독하고 있으며, 소독약은 살바이러스효과가 검증되었다. (0)
- b. 주1회정도돈사내외부소독을실시하고있다.(0.5)=>삭제
- c. 돈사내외부소독을실시하고있지않고있으며소독약또한검증되지않았다.(1)

2. PRRS 순환 위험 요소 (PRRS 안정)

(1) 돈군의 특징

① 모돈의 규모 - 오른쪽에 적어주세요!!

② 연간 모돈갱신율 (%) - 오른쪽에 적어주세요!!
③ 최근1년간 후보돈 도입 두수 - 오른쪽에 적어주세요!!
(2) 관리된 노출 - 교체 후보돈 및 모돈에 대한 PRRSV노출
① 교체 후보돈은 입식 후 중부사로 입식 전에 격리 후보돈사 등에서 PRRS 바이러스에 어떤 방법으로 노출되는가?
a. 음성 농장이므로 노출시키지 않음 (0) b. 농장내의PRRS바이러스로만들어진자가혈청(SI)에의해노출됨(0) c. 생독백신과PRRS바이러스를배설하는돼지에의해자연노출이병행됨(0) d. PRRS바이러스를배설하는돼지에의해자연노출됨(2) e. PRRS바이러스를배설하는돼지가사육되는돈사의분변또는장난감에의해노출됨(2) f. 생독백신의접종에의해서노출됨(5) g. 분만사분변및조직(태반,미라태아등)에의해노출됨(7) h. 도태모돈에의해노출됨(7) i. 양성농장이나특별히노출시키지않음(10)
② 교체 후보돈이 PRRS 바이러스에 노출 된 후 기존돈군으로(중부사) 입식되는 경우 노출 후 기간을 선택하시오.
a. 음성농장으로 해당사항없음 (0) b. 80일이상(0) c. 50-80일(5) d. 20-50일(7) e. 20일이하(10)
③ 모돈은 PRRS 바이러스에 의해서 정기적으로 어떤 방법으로 노출됩니까?
a. 음성이므로 노출되지 않음 (0) b. 생독백신에의해서정기적으로노출됨(3-4개월간격반복접종)(0) c. 생독백신에의해서비정기적으로노출됨(문제발생시접종)(2) d. 양성이나노출시키지않음(5)
④ PRRS가 급성 발생하는 경우 자연노출 또는 혈청집중(SI) 또는 생독백신 접종에 의해서 즉시 전체 모돈은 노출되어 왔다.
a. 예 - 혈청집중 (0) b. 예-생독백신(3) c. 예 - 자연노출(5) d. 아니오(5)
⑤ 사용하는 백신의 회사이름/백신명을 적으시오, Ex) A회사 / B백신 - 적어주세요!!!
⑥ 옹돈에 생독백신을 사용하는 경우 대답하세요?
a. 음성이므로 노출되지 않음 (0) b. 생독백신에의해서정기적으로노출됨(3-4개월간격반복접종)(0) c. 생독백신에의해서비정기적으로노출됨(문제발생시접종)(2) d. 양성이나노출시키지않음(5)
(3) 사양/위생 관리
① 1두 1침 준수?
a. 번식돈에 1두 1침, 분만사에서서는 복당 1침, 자돈~육성사에서서는 돈방당 1침 이상을 실시 (0) b. 번식돈에1두1침을실시하고있지않음(2)
② 농장 [분만사, 자돈사, 육성사 (육성사 없는 경우 통과), 비육사]의 돼지 사육 흐름, 즉 울인/울아웃을 실행하고 있는가?
a. 모든 돈사에서 실시 (0) b. 세개돈사(분만사,자돈사,육성사)이상에서실시(0) c. 두개돈사(분만사,자돈사)에서만실시(5) d. 한개돈사(분만사또는자돈사)에서만실시(10) e. 모든돈사에서실시하지않음(15)
③ 환돈사 또는 환돈방 운영?
a. 환돈을 위한 격리돈사를 운영함 (0) b. 환돈을위한농장내격리돈사를운영하고있으며,기존돈군에편입되지않음(0) c. 환돈을위한농장내격리사운영하고있으며,회복돈이기존돈군에편입되고있음(0.5) d. 환돈을위한격리돈방(펜스)이운영되고있음(1) e. 환돈을위한격리사또는격리돈방(펜스)이운영되고있지않음(2)
④ 환돈 도태 원칙이 있고 원칙에 따라 회복불능돈을 도태하고 있는가?
a. 예 (0) b.아니오(2)
⑤ 분만사 양자?
a. 분만후 24시간이후 양자 실시하지 않음 (0) b. 분만후24시간이후에도필요에따라양자를실시하고있음(2)
⑥ 돈사별 장화?
a. 돈사별 장화(고무신 포함)를 비치하고 갈아 신고 출입하고 있음 (0) b. 돈사별장화가비치되어있지않음(2)
⑦ 장화는 청결하게 유지되는가?
a. 적절(정기적인 세척) (0) b. 부적절(유기물이잔뜩묻어있음)(2)
⑧ 슬러리 퍼트는 낮은 수위를 유지하는가?
a. 예 (돼지 울아웃 및 세척 후 슬러리를 비움) (0) b. 아니오(2)
⑨ 문제 발생 시 전문 주치 수의사의 방문과 조치가 단시간(2일 이내)에 가능한가?
a. 예 (0) b. 아니오(2)
⑩ 효과적인 백신 접종 프로그램이 적절히 수행되는가?
a. 예 (0) b. 아니오(2)
⑪ 약품은 적절하고 안전하게 보관되는가? (약품 보관함, 백신 보관 상태 등)
a. 예 (0) b. 아니오(1)
⑫ 사체 처리는 방법은 어떠한가?

a. 농장 내부에서 소각, 매몰, 분해 (0)	b. 외부에서사체수거(2)
⑬ 사체 처리는 적절하게 수행되는가?	
a. 외부에 방치되지 않고, 매일 퇴근 전 적절하게 처리 (야생동물 접근 못함) (0)	
b. 부적절(몇일씩돈사내외부에방치하여야생동물이접근함)(2)	
⑭ 사체를 처리장(퇴비장등)에서 처리 후, 착용한 옷, 장화를 교체하고 손을 씻은 후 돈사에 출입하는가?	
a. 예 (0)	b. 아니오(2)
III. 외부 위험 요소	
1. 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송	
(1) 상하차 시설(출하대 등)의 위치는?	
a. 농장 울타리 경계 또는 외부 (외부 차량이 농장 내부로 진입하지 않음) (0)	
b. 농장내부(외부차량이농장내부로진입함)(5)	
(2) 상하차 시설이 돼지가 되돌아 오지 못하도록 설계, 건축되었는가?	
a. 예 (0)	b. 아니오(2)
(3) 상하차 시설의 형태가 세척 시 분뇨가 돈사 및 농장 내로 역류되지 않는가?	
a. 예 (0)	b. 아니오(1)
(4) 상하차 절차 및 운송 상태는?	
a. 청결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험 없음 (0)	
b. 청결/오염 구역의 경계가 명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험없음(1)	
c. 청결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험낮음(1)	
d. 청결/오염 구역의 경계가 불명확하고, 직원/운송기사의 접촉위험높음(2)	
(5) 상하차 작업 후에 세척/소독/건조 절차는?	
a. 즉시 세척→ 소독→ 건조 실시 (0)	b. 분변제거만 실시(2)
c. 소독만 실시(1)	d. 분변제거, 세척, 소독 모두 하지 않음(2)
(6) 농장 내부에서만 돼지 수송용으로 사용하는 차량의 관리는?	
a. 돼지 수송 후 마다 세척/소독/건조 (0)	b. 매주 1회 세척/소독/건조(0)
c. 세척을 제대로 하지 않고 계속 사용(1)	
(7) 돼지 전출 시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈 판매, 비육돈 판매, 번식돈 판매 등 돼지 전출 시 이용하는 차량은 무엇인가?	
a. 농장 소유 차량(다른 용도로도 사용) (0)	b. 제삼자차량(타농장돼지접촉없음)(1)
c. 제삼자차량(타농장돼지접촉)(5)	
(8) 돼지 전출시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈 판매, 비육돈 판매, 번식돈 판매 등을 위해 농장에 진입하기 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?	
a. 세척, 소독 및 건조 다운 타임 8시간 이상 준수 (0)	b. 세척및소독후다운타임없음(4)
c. 세척및건조(건조시간8시간이상준수)(2)	d. 위와같은절차없음(6)
(9) 돼지 전입시의 위생 절차 - 후보돈, 자돈 입식 등에 사용되는 차량의 농장 진입 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?	
a. 세척, 소독 및 건조 다운 타임 8시간 이상 준수 (다른 양돈장 들르지 않음) (0)	
b. 세척, 소독 및 건조 다운 타임 8시간 이상 준수 (다른 양돈장을 방문 후 진입) (4)	
c. 세척 및 소독 후 다운 타임 없음 (4)	d. 세척 및 건조 (다운 타임 8시간 준수) (2)
e. 위와 같은 절차 없음 (6)	
2. 차량 방역	
※ 오염구역: 농장 울타리 외부	
※ 준청결구역: 농장 울타리와 돼지가 사육 중인 돈사 내부 사이의 공간이며, 농장에 의해 관리가 이루어지는 구역	
※ 청결구역: 돼지가 사육 중인 돈사 내부. 무장돈사인 경우 복도 및 사무실의 공간도 모두 청결구역으로 설정될 수 있음.	
(1) 차량소독조는 농장 경계에서 운영되고 있는가?	
a. 예 (0)	b. 아니오(5)
(2) 차량소독은 PRRS 및 악성전염병(구제역, 돼지열병)에 효과적인 소독제를 유효한 농도로 희석하여 사용하고 있는가?	
a. 예 (0)	b. 아니오(5)
(3) 차량을 위한 소독시설은 잘 작동되고, 보온이 되는가?	
a. 예 (0)	b. 아니오(2)
(4) 농장 내 진입하는 차량 기사는 샤워 후 지정된 의복, 장화로 갈아입는가?	
a. 샤워 후 지정된 의복, 장화 착용 (0)	b. 샤워는 하지 않고, 지정된 의복, 장화만 착용(0.5)
c. 위의 것 모두 하지 않음(1)	
(5) 사료 차량이 농장 내 준청결구역으로 진입하는가?	
a. 예 (1)	b. 아니오(0)
(6) 분뇨 차량이 농장 내 준청결구역으로 진입하는가?	
a. 예 (3)	b. 아니오(0)
(7) 출하 차량(비육, 종돈, 도태돈)이 농장 내 준청결구역으로 진입하는가?	
a. 예 (5)	b. 아니오(0)
(8) 사료 운송 차량의 이용 형태는?	
a. 농장 전용 차량 및 기사 (0)	
b. 외부 차량이 용하나, 첫 번째로 해당 농장으로 입고(3)	
c. 외부 차량을 이용하고, 다른 농장을 방문 후 입고(5)	
(9) 돈사 간 이동 통로(돼지, 사람 동선)은 차량 동선과 구분되는가?	
a. 명확하게 구분 (0)	b. 교차됨(2)
c. 해당없음(내부통로, 단일시설)(0)	
(10) 농장 안팎에서 함께 사용되는 차량, 기계, 장비는 농장 재진입 때마다 세척 및 소독을 하는가? (예: 트랙터, 로더, 리프트 트럭)	
a. 예 (0)	b. 아니오(1)
c. 해당없음(차량, 장비 등이 없음)(0)	

3. 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역실의 설치 및 운영

(1) 샤워실 또는 방역실(샤워실 없고, 옷과 신발 만 비치된 공간)의 존재와 실행 여부?

- a. 샤워실이 있으며, 진입하는 모든 사람은 항상 샤워하고, 환복 함 (0)
- b. 샤워실이있으나,샤워및환복이잘지켜지지않음(1)
- c. 방역실이있으며,진입하는모든사람은신발과옷을갈아입음(0)
- d. 방역실이있으나,환복절차가잘지켜지지않음(2)
- e. 샤워실과방역실모두없음(2)

(2) 샤워실 또는 방역실은 경계지역에 있는가?

- a. 예 - 샤워실이 경계지역 (0) b. 예 - 방역실이경계지역(1) c. 아니오(2)

(3) 샤워실 또는 환복실은 탈의 구역(오염) / 샤워 구역 또는 이동(중립) 구역 / 환복 구역(청결)으로 교차오염되지 않도록 구분되어 있는가?

- a. 예 - 샤워실 구분 (0) b. 예-방역실구분(1) c. 아니오(2)

(4) 샤워장의 샤워기가 잘 작동되고 온수, 샴푸, 비누 등의 공급이 원활히 되고 있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(1) c. 샤워실없음(1)

(5) 샤워실 또는 방역실은 청결하게 관리되는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(1)

(6) 샤워실 내부의 환복실 또는 방역실에 갈아입을 작업복이 잘 준비되어 있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(1)

(7) 방문자를 위해 샤워실 또는 방역실 환복 절차에 대한 알립판이 잘 보이도록 게시되어 있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(1)

(8) 내부 작업복의 세탁은 어디에서 하는가?

- a. 샤워실 내부 (0) b. 농장내부(0)
- c. 농장외부(1) d. 통제없음(1)

(9) 농장 작업복 및 신발은 농장 내부에서만 착용하는가?

- a. 농장 내 청결 구역에서만 착용 (0) b. 울타리외부밖에서도착용(1)

(10) 개인 소지품의 돈사 내 반입을 허용하는가? (시계, 장신구, 휴대전화, 노트북 등)

- a. 예 (아무런 소독절차 없이) (2) b. 예(알코올소독및자외선소독후허용)(1) c. 아니오(0)

(11) 농장을 진입하는 모든 사람에게 권장 다운타임을 준수하게 하는가? (예, 다른 농장의 돼지 또는 오염물질 접촉 후의 24시간 동안의 출입 제한 시간 준수)

- a. 예 (0) b. 아니오(3)

(12) 농장 직원이 다른 오염 원인과 접촉하는가?

- a. 아래와 같은 사항 없음 (접촉 없음) (0)
- b. 돼지이외의다른가축과접촉(1)
- c. 타양돈농장에서일하는사람과접촉(3)
- d. 타양돈농장에접촉또는집에서돼지사육(3)

4. 농장 입구 및 주변 울타리

(1) 농장 입구(정문)는 항상 닫아두고 잠겨있는가?

- a. 항상(주야간, 24시간) (0) b. 열어놓음(2)

(2) 방명록에는 이전 방문농장과 다운타임을 기록하는가?

- a. 항상 기록 (0) b. 기록하지않음(1) c. 방명록없음(2)

(3) 농장 내부 출입하는 모든 사람은 허가된 다운타임을 준수한 사람 만 입장하는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(2)

(4) 방문자 알립판(출입절차 등)과 진입금지 표지가 잘 보이도록 설치되었는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(0.5)

(5) 농장외부에 방문자 차량 주차장이 있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(0.5)

(6) 방문자가 돈사 밖 주변을 (준청결 구역) 다니게 될 때 그 절차는 어떠한가?

- a. 샤워 / 환복 후 진입 (0) b. 환복(옷/신발)후진입(0) c. 절차없음(0.5)

(7) 돈사 출입문은 항상 닫혀있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(0.5)

(8) 주변 울타리가 오염지역과 청결지역을 명확히 구분하고 차량, 사람, 동물의 이동을 제한하는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(2)

5. 물품 방역

(1) 외부에 물품반입창고가 운영되고 있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(2)

(2) 물품반입창고는 농장 경계에 위치하고 있는가?

- a. 예 (0) b. 아니오(1)

(3) 물품반입창고에 입고 된 물품은 소독과(자외선등) 계류 시간을 가지는가?

- a. 물품보관창고에 입고 후 소독과 다운타임(24시간 계류)을 거친 후 사용 (0)
- b. 물품보관창고에입고후소독후바로반입(다운타임없음)하여사용(0.5)
- c. 물품보관창고에입고후소독은없으나다운타임(24시간계류)을거친후사용(0.5)
- d. 물품보관창고를거치지않으나,소독후바로사용(1)
- e. 물품보관창고를거치지않고,소독없이바로반입하여사용(1)

(4) 정액보관고는 농장 경계의 적절한 위치에서 운영되는가?

a. 예 (0) b. 아니오(1)
(5) 돼지고기가 농장 내로 반입되지 않고, 관리자가 외부의 생돈육을 다루지 않는가?
a. 예 (0) b. 아니오(1)
(6) 지대사료창고는 농장 경계에 위치하고 있는가?
a. 예 (0) b. 아니오(2)
(7) 지대사료창고에 입고 된 사료는 소독과 (자외선 등) 계류 시간을 가지는가?
a. 물품보관창고에 입고 후 소독과 다운타임을 거친 후 사용 (0)
b. 물품보관창고에 입고 후 소독 후 바로 반입(다운타임없음)(0.2)
c. 물품보관창고에 입고 후 소독은 하지 않으나, 다운타임(24시간 계류)을 거친 후 사용(0.2)
d. 물품보관창고를 거치지 않으나, 소독 후 바로 지대사료 사용(0.5)
e. 물품보관창고를 거치지 않고, 소독도 없으며 돈사 내부로 바로 반입하여 사용(0.5)
(8) 다른 농장의 물품/장비를 돈군 내로 반입하는가? (임신진단기, 부검도구, 공기 등)
a. 예 (1) b. 아니오(0)
(9) 깔짚 (톱밥 등)은 안전한 원재료를 사용하는가?
a. 사용하지 않음 (0)
b. 안전한 원재료이며, 돈사의 부에서만 사용(예, 퇴비장)(0)
c. 안전하지 않거나 알 수 없는 원재료이며, 돈사 내외부에서 사용(0.5)
I. 양돈장의 위치 및 시스템
1. 양돈장의 위치
(1) 가장 가까운 PRRS 양성 양돈장까지의 거리는?
a. 3km 이상 (0) b. 2-3km(8)
c. 1~2km(12) d. 500m~1km(16) e. 500m이하(20)
(2) 가장 가까운 양돈장까지의 거리는?
a. 3km 이상 (0) b. 2-3km(4) c. 1~2km(6) d. 500m~1km(8) e. 500m이하(10)
(3) 농장 반경 3km 이내의 양돈장 숫자는?
a. 없음 (0) b. 2개이하(4) c. 4개이하(8)
d. 6개이하(12) e. 8개이하(16) f. 10개이상(20)
(4) 농장 반경 3-10km 이내의 양돈장 숫자는?
a. 없음 (0) b. 5개이하(2) c. 10개이하(4)
d. 20개이하(6) e. 30개이하(8) f. 30개이상(10)
(5) 농장 주위에 잠재 오염원이 존재합니까? (예 - 도축장, 육가공공장, 공동분뇨처리장, 사료공장 또는 집하센터, 돼지 운송차량 차고지 등)
a. 오염원 있음 (3) b. 오염원 없음(0)
(6) 농장에서 주 도로까지의 거리는? (공용도로에서 농장 입구까지의 거리)
a. 100m 이상 (0) b. 20~100m(0.5) c. 20m이하(1)
(7) 농장에서 가장 인접한 공용도로를 함께 이용하는 양돈장의 수는? (사료, 출하 등)
a. 없다 (0) b. 1개(2) c. 2개이상(4)
(8) 농장이 위치한 특징적인 형태를 선택하시오?
a. 산 (0) b. 계곡(0.5) c. 바다(1) d. 언덕(0.5) e. 평야(0)
(9) 농장 지역 기후?
a. 건조 - 따뜻 (0) b. 건조 - 추운(0.5) c. 습하고 - 더운(0.5) d. 습하고 - 추움:적용할수없음(1)
2. 사육시스템의 형태는?
a. 3-SITE - 번식농장에 분만사까지만 있음 (0) b. 2-SITE - 번식농장에 분만사까지만 있음(0)
c. 2-SITE - 번식농장에 70일령자돈까지 사육(10) d. 일괄사육농장(20)
3. 돈사의 형태
(1) 돈사의 형태는?
a. 모든 돈사는 무창이며, 각 돈사는 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있음 (0)
b. 모든 돈사는 무창이며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있지 않음(4)
c. 모든 돈사는 원치이며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있음(2)
d. 모든 돈사는 원치이며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있지 않음(4)
e. 무창, 원치 돈사 함께 있으며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있음(2)
f. 무창, 원치 돈사 함께 있으며, 각 돈사가 내부 이동 통로에 의해 연결되어 있지 않음(8)
(2) 돈사의 방조망 설치
a. 농장에 모든 입기구에 바이러스 필터가 설치되고 적절하게 운영되고 있다. (0)
b. 농장의 전 돈사 무창 돈사이며 입기구에는 방충망이 설치되어 있다.(0.5)
c. 원치 돈사가 있지만 방조망이 설치되어 있다.(1) d. 원치 돈사이며, 방충망이 설치되어 있지 않다.(2)

(1) PRRS 위험도 평가문항 중요도 분석 (로지스틱 회귀 단변량, 다변량 분석)

1. 분석내용

PRRS감염에 기여하는 위험요인(risk factor)을 분석하였다. 총 147개 농장에 대한 PRRS 발생 위험도 평가 설문서 중 현재 PRRS 상황(실험실 진단 결과 기준)이 음성(지금까지 한 번도 감염되

지 않았거나, 과거에 감염되었으나 현재는 음성)인 20개 농가와 양성(모든군 불안정, 이유 시에 자돈이 PRRS 항원 양성)인 20개 농가에 대한 자료를 대상으로 분석하였다.

2. 분석방법

▪ 종속변수

종속변수는 실험실 진단 결과를 기준으로 현재 PRRS 상황이 음성이므로 한 번도 감염되지 않은 농장을 음성농장, 현재 PRRS 상황이 양성으로써 모든군 불안정인 상태로 이유 시 자돈이 PRRS 항원 양성을 보이는 농장을 양성농장으로 구분하였다.

▪ 독립변수

위험요인 분석에 사용한 독립변수는 PRRS 발생 위험도 평가 설문서 문항이었으며 다변량 분석 시 각 문항은 설문지 구성에 따라 후보종돈, 내부위험요소, 외부위험요소 그리고 양돈장의 위치 및 시스템 관련 문항으로 구분하여 분석을 진행하였다.

▪ 분석모형

PRRS 발생 위험요인은 감염에 기여하는 독립변수를 확인할 수 있도록 계획하였으며, 분석에 사용한 로지스틱 회귀모형(logistic regression model)은 다음과 같다.

$$P(Y=1|X) = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n)}}$$

여기에서 β_0 와 β_n 은 모형의 회귀계수이고 X 는 독립변수다.

로지스틱 회귀분석을 이용한 단변량 분석(univariate analysis)에서 유의수준(P-value)이 0.25 보다 작은 변수를 선정하여 최종 다변량 분석(multivariate analysis)에 투입하였다. 로지스틱 회귀 모형은 일반화선형모형(generalized linear model)이며, 다변량 분석에서 최종모형의 적합성은 Hosmer-Lemeshow 적합성 검정결과(goodness-of-fit test)로 판정하였다. 본 분석에서 연속형 자료의 경우 결측치가 많아 분석에서 제외하였으며, 범주형 자료의 경우 빈도분포를 고려하여 적절한 범주로 구분한 뒤 모형에 투입하였다. 독립변수 간 상호작용 효과(interaction effect) 및 혼란 효과(confounding effect)의 경우 분석결과 해석의 용이성을 위해 제외하였다. 모든 자료는 통계 패키지 R(version 3.2, R Core team, Vienna, Austria)를 사용하여 분석하였다.

3. 단변량 분석

▪ 후보종돈 (후보돈, 후보 웅돈, 정액)

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 6개 변수로 나타났다 (표1). 외부에서 후보돈 도입, 외부에서 웅돈 도입하여 정액 자가채취, 외부에서 도입된 후보돈을 격리후 후보돈사에 입식하지 않음, 격리 후보돈사에서 체류기간이 60일 미만, 격리 후보돈사없음, 혹은 도입한 후보종돈을 순치하지 않을 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 1. 단변량분석에서 후보종돈과 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.250$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
후보돈 도입 및 사용방법	외부도입안함	2	7	0.21	0.073
	외부도입	18	13		
정액의 도입 및 사용방법	외부정액	4	18	0.02	0.002
	외부용돈	16	2		
외부도입 후보돈 입식장소	격리	10	2	9.00	0.012
	비격리	10	18		
격리 후보돈사에서 체류기간	60일 이상	7	3	3.05	0.154
	60일 미만	13	17		
격리 후보돈사 출입 절차 ¹⁾	격리돈사	10	1	19.00	0.001
	격리돈사없음	10	19		
도입 후보종돈 순치	순치	15	7	5.57	0.014
	비순치	5	13		

내부 위험 요소

▪ 돈사/내부 인원/기타 관리

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 4개 변수로 나타났다(표2). 최근 3년 이내 직원 교육이 부정기적이거나 교육프로그램이 없음, 차단방역 자체점검리스트 활용하지 않음, 위해 요소로 생각되는 해충 및 동물 3개 이상, 혹은 농장의 물을 정기적인 검사와 음수소독을 실시하지 않는 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 2. 단변량분석에서 내부 위험 요소 중 돈사/내부 인원/기타 관리 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.250$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
직원 교육	정기적	15	8	4.50	0.029
	부정기적	5	12		
차단방역	활용	15	2	27.00	<0.000
자체점검리스트	미활용	5	18		
위해 요소인	3개 이하	13	2	16.71	0.001
해충 및 동물	3개 이상	7	18		
농장 물	실시	19	15	6.33	0.108
정기검사 및 음수소독	미실시	1	5		

▪ PRRS 순환 위험 요소

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 6개 변수로 나타났다(표3). 분만사 양자 실시하지 않음, 돈사별 장화 비치되어 있지 않음, 높은 슬러리 피트 수위, 비효율적인 백신프로그램, 부적절한 사체처리, 혹은 사체 처리후 착용한 의복을 교체하지 않고 돈사에 출입하는 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 3. 단변량분석에서 내부 위험 요소 중 PRRS 순환 위험 요소 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인(p≤0.250)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
분만사 양자	실시하지 않음	5	11		
	실시	15	9	0.27	0.057
돈사별 장화	비치	19	14		
	미비치	1	6	8.14	0.065
슬러리 피트 수위	낮음	18	14		
	높음	2	6	4.50	0.130
백신프로그램	효율적 수행	19	14		
	비효율적 수행	1	6	8.14	0.064
사체처리	적절한 방법	19	15		
	부적절한 방법	1	5	6.33	0.108
사체 처리 후 의복교체	실시	18	7		
	미실시	2	13	16.71	<0.000

외부 위험 요소

- 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수(p≤0.250)는 총 3개 변수로 나타났다 (표4). 상하차 시설이 돼지가 되돌아오지 못하도록 설계되지 않음, 상하차 작업후에 세척/소독/건조 등의 절차를 실시하지 않음, 그리고 후보돈, 자돈 입식 등에 사용되는 차량의 농장 진입 전 위생 절차가 없을 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 4. 단변량분석에서 외부 위험 요소 중 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인(p≤0.250)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
상하차 시설 돼지	예	18	6		
되돌아오지 못하게 설계됨	아니오	2	14	21.0	<0.000
상하차 작업 후	있음	17	5		
세척/소독/건조 절차	없음	3	15	17.0	<0.000
돼지진입 운송차량	있음	19	6		
위생절차	없음	1	14	44.3	<0.000

- 차량방역

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수(p≤0.250)는 총 2개 변수로 나타났다 (표5). 분뇨차량의 농장 내 준청결구역 진입 그리고 돈사 간 이동 통로가 차량 동선과 구분되지 않을 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 5. 단변량분석에서 외부 위험 요소 중 차량방역 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.250$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
분뇨차량 농장 내	진입	4	16		
준청결구역 진입여부	진입금지	16	4	0.7	<0.000
돈사 간 이동통로와	구분되지 않음	14	2		
차량동선 구분여부	구분됨	6	18	21.0	<0.000

▪ 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역실의 설치 및 운영

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 8개 변수로 나타났다 (표6). 샤워실 또는 환복실이 교차오염되지 않도록 구분되지 않음, 샤워장 시설 작동하지 않음, 샤워실 또는 방역실이 청결하게 관리되지 않음, 샤워실 내부 혹은 환복실에 갈아입을 작업복이 비치되어 있지 않음, 방문자를 위한 환복 알람판이 게시되어 있지 않음, 내부 작업복 세탁이 샤워실 외부에서 이루어짐, 농장 작업복 및 신발을 울타리 외부 밖에서도 착용함, 그리고 농장을 진입하는 모든 사람에게 권장 다운타임을 준수하게 하지 않는 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 6. 단변량분석에서 외부 위험 요소 중 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역실의 설치 및 운영 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.250$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
샤워실 또는 환복실	구분됨	16	10		
교차오염 방지 구분	구분되지 않음	4	10	4.0	<0.000
샤워장 시설 작동유무	작동함	16	3		
	작동하지 않음	4	17	22.7	<0.000
샤워실 또는 방역실	관리됨	15	5		
청결관리	관리하지 않음	5	15	9.0	0.002
샤워실 내부 환복실에	비치함	18	8		
갈아입을 작업복 비치	비치하지 않음	2	12	13.5	0.002
방문자용 환복알람판	게시함	12	2		
게시	게시하지 않음	8	18	13.5	0.002
내부 작업복 세탁장소	샤워실 내	10	5		
	샤워실 외	10	15	3.0	0.108
농장 작업복 및 신발	농장 내부	18	5		
착용장소	농장 내/외부	2	15	27.0	<0.000
농장진입 사람	준수함	18	7		
다운타임 준수	준수하지 않음	2	13	16.7	0.001

▪ 농장 입구 및 주변 울타리

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 4개 변수로 나타났다 (표7). 농장 입구(정문)가 열려있음, 방명록에 이전 방문농장과 다운타임을 기록하지 않음, 허가된 다운타임을 준수하지 않은 사람도 농장 내 입장가능, 그리고 돈사 출입문이 열려 있는 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 7. 단변량분석에서 외부 위험 요소 중 농장 입구 및 주변 울타리 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.250$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
농장 입구 시건	잠겨있음	12	7	2.8	0.117
	열어놓음	8	13		
방명록에 이전 방문농장 및 다운타임 기록	기록함	16	3	22.7	<0.000
	기록하지 않음	4	17		
농장 내부 출입자 다운타임 준수여부	준수함	18	6	21.0	<0.000
	준수하지 않음	2	14		
돈사출입문 시건	잠겨있음	17	12	3.8	0.086
	열어놓음	3	8		

▪ 물품 방역

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 4개 변수로 나타났다 (표8). 물품반입창고가 농장 외부에서 운영되지 않음, 농장 내부에 물품반입창고 위치함, 정액보관고가 농장 경계의 적절한 위치에서 운영되지 않음 그리고 돼지고기가 농장 내로 반입되거나 관리자가 외부의 생돈육을 다루는 경우 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 8. 단변량분석에서 외부 위험 요소 중 물품 방역 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.25$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
외부에서 물품반입창고 운영	예	19	14	8.1	0.065
	아니오	1	6		
물품반입창고 농장 경계 위치	예	18	12	6.0	0.040
	아니오	2	8		
정액보관고 농장 경계 위치	예	15	5	9.0	0.002
	아니오	5	15		
돼지고기 농장내 반입금지 및 관리자 외부 생돈육 취급 금지	예	18	2	81.0	<0.000
	아니오	2	18		

▪ 양돈장의 위치 및 시스템

단변량 분석에서 PRRS 감염위험에 기여하는 변수($p \leq 0.250$)는 총 8개 변수로 나타났다 (표9). 가장 가까운 PRRS 양성 양돈장까지의 거리 3km 이내, 가장 가까운 양돈장까지 거리 3km 이내, 농장 반경 3-10km 이내 양돈장 숫자 6개 이상, 경우, 농장에서 주 도로까지 거리 100m 이상, 농장에서 가장 인접한 공용도로를 함께 이용하는 양돈장의 수 1개 이상, 사육시스템이 일괄사육농장임, 각 돈사 내부가 이동통로에 의해 연결되어 있음, 그리고 돈사의 방조망 설치는 원치돈사일 경우 무창돈사에 비해 PRRS 감염위험이 높은 것으로 분석되었다.

표 9. 단변량분석에서 양돈장의 위치 및 시스템 중 양돈장의 위치 관련하여 PRRS 감염과 관련된 요인($p \leq 0.250$)

문항	수준	음성	양성	교차비 (OR)	p-value
가장 가까운 PRRS 양성 양돈장까지 거리	3km 이상	14	2		
가장 가까운 양돈장까지 거리	3km 이내	6	18	21.0	<0.000
가장 가까운 양돈장까지 거리	3km 이상	10	2		
농장 반경 3-10km 이내 양돈장 숫자	3km 이내	10	18	9.0	0.011
농장에서 주 도로까지 거리	5개 이내	17	4		
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	5개 이상	3	16	22.7	<0.000
농장에서 주 도로까지 거리	100m 이상	11	5		
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	100m 이내	9	15	3.7	0.057
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	없음	14	9		
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	1개 이상	6	11	2.9	0.114
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	2-site	6	2		
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	일괄사육농장	14	18	3.9	0.130
돈사 내부 이동통로에 의한 연결여부	연결되지 않음	4	1		
돈사 내부 이동통로에 의한 연결여부	연결되어 있음	16	19	4.8	0.182
돈사 방조망 설치	무창돈사	14	6		
돈사 방조망 설치	원치돈사	6	14	5.4	0.014

4. 다변량 분석

다변량 분석결과는 표 10에 나타나 있으며, PRRS 감염위험이 증가하는 변수($p \leq 0.050$)를 요약하면 다음과 같다. 후보종돈과 관련해서는 외부에서 웅돈 도입하여 정액 자가채취, 내부위험요소 중 돈사/내부인원/기타 관리에서는 차단방역 자체점검리스트 미활용, PRRS 순환요소에서는 사체 처리 후 의복교체 미실시, 외부위험요소 중 돼지 상하차 시설 및 돼지수송에서는 상하차 작업 후 세척/소독/건조 미실시, 차량방역에서는 분뇨차량의 농장 내 준청결구역 진입 및 돈사 간 이동통로와 차량동선 미구분, 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역실 관련해서는 농장 작업복 및 신발 착용 장소가 농장 내부에 위치, 농장 입구 및 주변 울타리 관련 농장 내부 출입자 다운타임 미준수, 물품 방역 관련 돼지고기 농장 내 반입 및 관리자 외부 생돈육 취급, 양돈장의 위치 및 시스템에서는 농장 반경 3-10km 이내 양돈장 숫자 5개 이상일 경우 각각 PRRS 감염위험이 증가하

는 것으로 나타났다.

표 10. 각 요소별 다변량 분석결과

변수	회귀계수	표준오차	z-value	p-value
I. 후보종돈				
후보돈 도입 및 사용방법	-3.3414	1.9048	-1.754	0.079
정액의 도입 및 사용방법*	-3.7912	1.3376	-2.864	0.005
외부도입 후보돈 입식장소	-14.5649	23.5450	-0.006	0.995
격리 후보돈사에서 체류기간	-0.2102	1.2003	-0.175	0.861
격리 후보돈사 출입 절차1	16.6246	23.5455	0.007	0.994
도입 후보종돈 순치	1.0306	1.2994	0.793	0.428
II. 내부위험요소				
II-1. 돈사/내부인원/기타 관리				
직원 교육	-0.5529	1.1077	-0.499	0.6177
차단방역 자체점검리스트*	3.0551	1.3396	2.281	0.0226
위해 요소인 해충 및 동물	1.9386	1.3832	1.402	0.1610
농장 물 정기검사 및 음수소독	3.3525	1.9378	1.730	0.0836
II-2. PRRS 순환 위험 요소				
분만사 양자	-1.4603	1.1076	-1.318	0.1874
돈사별 장화	0.2697	1.6969	0.159	0.8737
슬러리 피트 수위	1.5993	1.4718	1.087	0.2772
백신프로그램	1.5258	1.3862	1.101	0.2710
사체처리	0.9519	1.4572	0.653	0.5136
사체 처리 후 의복교체*	2.2191	1.0202	2.175	0.0296
III. 외부위험요소				
III-1. 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송				
상하차 시설 돼지 되돌아오지 못하게 설계됨	1.7044	1.2883	1.323	0.1858
상하차 작업 후 세척/소독/건조 절차*	2.6850	1.0704	2.508	0.0121
돼지진입 운송차량 위생절차	2.6838	1.4148	1.897	0.0578
III-2. 차량 방역				
분뇨차량 농장 내 준청결구역 진입여부*	-2.5500	0.9438	-2.702	0.0069
돈사 간 이동통로와 차량동선 구분여부*	2.8230	1.0266	2.750	0.0060

III-3. 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역실

샤워실 또는 환복실 교차오염 방지 구분	1.1046	1.8470	0.598	0.5498
샤워장 시설 작동유무	17.4801	34.0364	0.005	0.9959
샤워실 또는 방역실 청결관리	-16.6051	34.0369	-0.005	0.9961
샤워실 내부 환복실에 갈아입을 작업복 비치	2.2266	1.6104	1.383	0.1668
방문자용 환복알림판 게시	-0.6372	1.7981	-0.354	0.7231
내부 작업복 세탁장소	-0.8910	2.2476	-0.396	0.6918
농장 작업복 및 신발 착용장소*	4.0005	1.6191	2.471	0.0135
농장진입 사람 다운타임 준수	2.6567	1.7076	1.556	0.1197

III-4. 농장 입구 및 주변 울타리

농장 입구 시건	-17.549	34.2510	-0.005	0.9960
방명록에 이전 방문농장 및 다운타임 기록	20.092	32.2242	0.006	0.9954
농장 내부 출입자 다운타임 준수여부*	3.042	1.3490	2.255	0.0241
돈사출입문 시건	-1.200	1.4870	-0.807	0.4197

III-5. 물품 방역

외부에서 물품반입창고 운영	-1.3270	2.4913	-0.533	0.5943
물품반입창고 농장 경계 위치	2.8034	1.7981	1.559	0.1190
정액보관고 농장 경계 위치	0.8646	1.1568	0.747	0.4548
돼지고기 농장내 반입금지 및 관리자 외부 생돈육 취급 금지*	4.5536	1.3079	3.482	0.0005

IV. 양돈장의 위치 및 시스템

가장 가까운 PRRS 양성 양돈장까지 거리	17.1536	31.4660	0.005	0.9960
가장 가까운 양돈장까지 거리	-16.1169	30.4371	-0.005	0.9959
농장 반경 3-10km 이내 양돈장 숫자*	3.0137	1.4055	2.144	0.0320
농장에서 주 도로까지 거리	1.8155	1.6258	1.117	0.2641
인접 공용도로 함께 이용하는 양돈장 수	-0.3465	1.6006	-0.216	0.8293
사육시스템	3.0281	1.8426	1.643	0.1008
돈사 내부 이동통로에 의한 연결여부	0.5931	2.2778	0.260	0.7957
돈사 방조망 설치	2.4703	1.8257	1.353	0.1764

* P값이 0.05보다 작은 항목

각 다변량 모형에 대한 적합도 판정결과는 표 11과 같으며, 통계적으로 유의한 다변량 모형(p>0.050)은 내부위험요소 중 PRRS 순환 위험요소, 외부위험요소 중 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역실, 그리고 양돈장의 위치 및 시스템으로 나타났다.

표 11. 다변량 분석에 사용한 모형의 적합도

Model	χ^2	df	p-value
I. 후보종돈	10.4	6	0.110
II. 내부위험요소			
II-1. 돈사/내부인원/기타 관리	10.2	4	0.037
II-2. PRRS 순환 위험 요소	12.2	6	0.059
III. 외부위험요소			
III-1. 돼지 상하차 시설 및 돼지 수송	11.0	3	0.012
III-2. 차량 방역	12.1	2	0.002
III-3. 대인 방역을 위한 샤워실 또는 방역 실	9.6	8	0.300
III-4. 농장 입구 및 주변 울타리	9.7	4	0.048
III-5. 물품 방역	14.1	4	0.007
IV. 양돈장의 위치 및 시스템	9.1	8	0.340

df(degree of freedom, 자유도)

(2) 평가문항 중요도 분석, 평가모형 수정과 수정된 모형의 판별 성능 검토 및 PRRS 위험도 분석

1. PRRS 위험도 평가 연구 개요

■ 단계별 분석 내용 및 기법

○ PRRS 발생 위험도 평가문항 중요도 분석

- Group Lasso 회귀분석 및 Random Forest 기법을 이용하여 기존에 부여된 문항별 가중치를 고려하지 않았을 때의 문항별 PRRS 양성 불안정에 영향을 미치는 중요도를 분석
- 중요도가 높은 문항은 가중치를 상향조정하고, 중요도가 낮은 문항은 평가 문항에서 제외하기 위한 근거자료로 활용

○ 수정 가중치 적용 및 하위문항 삭제에 따른 판별 정확도 검토

- 앞서 새롭게 수정된 가중치 및 제거 문항들을 적용할 경우의 판별 정확도 개선을 확인하기 위해 Random Forest, Support Vector Machine, Logistic 회귀분석을 이용한 판별 정확도 분석 평가
- 최적 성능 개선을 위한 가중치 수정안 및 제거 문항 리스트 도출

○ 기존 및 수정 가중치를 고려한 PRRS 위험도 분석

- Logistic 회귀분석을 이용하여 후보종돈 위험요소, 내부 위험요소, 외부 위험요소, 양돈장 특성의 4 가지 요인이 PRRS 양성 불안정에 미치는 영향을 분석
- 기존 가중치와 수정 가중치 적용시 분석 결과 비교
- 최종 분석 모형을 이용하여 각 농가별 PRRS 양성 위험 확률을 산출

○ PRRS 위험도 평가 서비스 제안

- 위험도 단계 도입 등 적절한 농가별 위험도 평가를 위한 적용 방안

- 농가별 PRRS 양성 위험 확률을 산출하고 시스템에 자동화하기 위한 R code
- 문항별 PRRS 위험도 평가 점수를 농가별 개선포인트 제시 기능
- GIS 정보를 이용한 지역별 위험도 평가 시스템



그림 1 PRRS 위험도 평가 연구의 단계별 분석내용 및 기법

2. PRRS 발생 위험도 평가 문항 중요도 분석

■ Group Lasso 회귀분석 및 Random Forest를 이용한 문항별 중요도 분석

□ Group Lasso 회귀분석 및 Random Forest 개요

○ Group Lasso 회귀분석

- Lasso(least absolute shrinkage and selection operator)는 예측 정확도와 통계 모형의 설명력을 높이기 위해 회귀분석에서 변수선별 및 정규화를 수행하는 방법으로 많이 사용됨
- 샘플수에 비해서 독립변수의 수가 훨씬 많은 경우에도 사용될 수 있는 방법으로 패널티 파라미터인 λ 값이 0에서부터 큰 값으로 변화시켜 가면서 영향력이 낮은 회귀계수들을 0으로 수렴하도록 하여 종속변수에 영향을 미치는 중요한 독립변수들을 선별할 수 있도록 함
- Group Lasso는 독립변수들을 특정한 그룹으로 묶어서 패널티에 의한 영향을 동일하게 받도록 하는 방법으로 PRRS 위험도 평가 문항이 가중치가 없다고 가정할 때 한 문항의 선택지를 개별 더미 변수로 두고 그룹화하여 Lasso 회귀분석을 적용하게 됨
- 따라서 범주형 선택지를 가지는 문항에 대해서도 중요도를 평가할 수 있음

○ Random Forest

- 의사결정나무(Decision Tree)의 개념에서 진화한 방법으로 의사결정나무가 하나의 훈련 데이터를 학습하여 하나의 트리를 생성하는 것에 반해 Random Forest는 하나의 샘플 데이터에서 임의의 복원 샘플링을 통해 다수의 훈련용 데이터를 만들고 다수의 트리를 생성한 후 이를 결합한 결과를 사용함
- 따라서 단일 의사결정나무를 사용하는 것과 비교하여 결과의 분산이 감소하기 때문에 보다 안정적이고 정확도를 높일 수 있음
- Random Forest는 종속변수에 영향을 미치는 독립변수들의 중요도를 측정할 수 있으며, 이를 이용하여 변수선별에 활용할 수 있음

□ Group Lasso Logistic 회귀분석을 이용한 중요도 분석

○ 변수 설정

- Group Lasso Logistic 회귀분석의 종속변수는 PRRS 양성 불안정 유무에 따라 0과 1값을 가지는 선택형 binary 변수이기 때문에 일반 회귀분석이 아닌 Logistic 회귀분석을 수행함
- 독립변수는 위험도 평가문항 중 범주형 변수로 이루어진 모든 문항 99개를 사용하였음 (후보종돈 위험요소 11개, 내부 위험요소 28개, 외부 위험요소 48개, 양돈장 특성 12개)

○ 패널티 파라미터 λ 값에 따른 회귀계수 변화 도식

- 패널티 파라미터 λ 값을 25에서 1까지 작은 값으로 변화시키면 특정 독립변수의 회귀계수 값이 0이 아닌 값을 가지기 시작하는데, 더 큰 λ 값에서 0이 아닌 계수값을 가지는 독립변수일 수록 종속변수에 미치는 영향력이 더 큰 것으로 해석할 수 있음
- λ 값 25~15 사이에서는 문항 B3_12, B3_6, C5_5 등의 회귀 계수값이 0이 아닌 유의미한 값을 가지기 시작함 (B3_121과 같이 문항번호 끝에 붙는 1은 범주형 변수를 더미변수화하면서 만들어진 신규 변수의 순서를 의미함)
- 하단의 -0.8에서부터 점차 큰값으로 변화하는 검정색 실선은 절편의 계수 값을 의미함

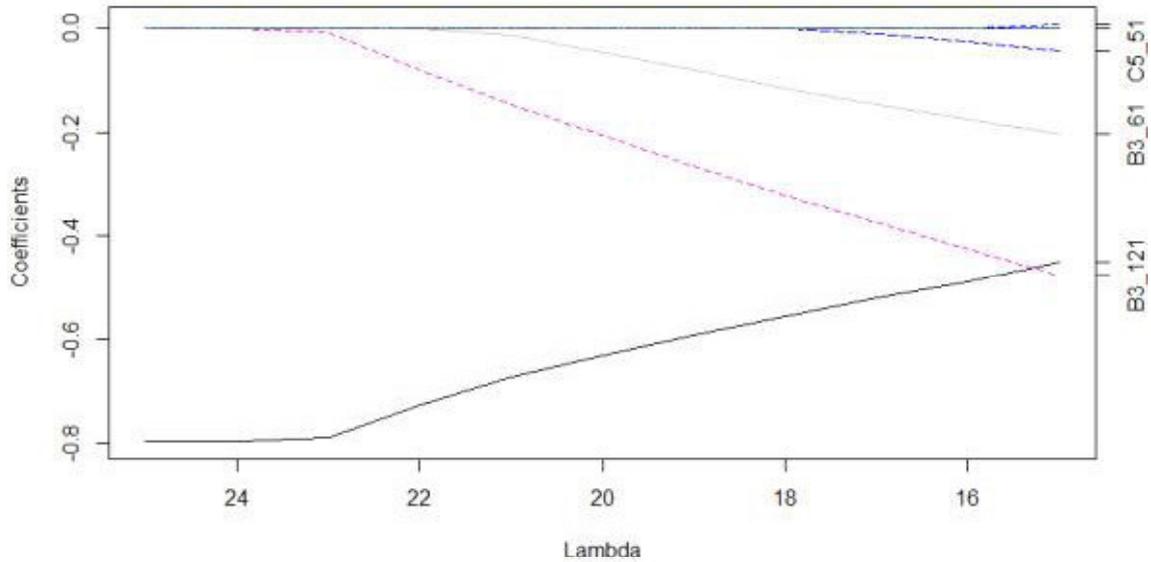


그림 2 Group Lasso Logit 회귀분석의 회귀계수 그래프 (λ 범위: 25~15)

- 유사한 방법으로 λ 값 15~5 사이에서는 문항 A2, A9, C3_1, C3_8, D1_4 등의 회귀 계수값이 0이 아닌 유의미한 값을 가지기 시작하는 것으로 해석할 수 있음
- λ 값 5~1 사이에서는 도식으로는 확인이 어려우므로 하단 표의 λ 값별 유의미한 독립변수 리스트를 참고

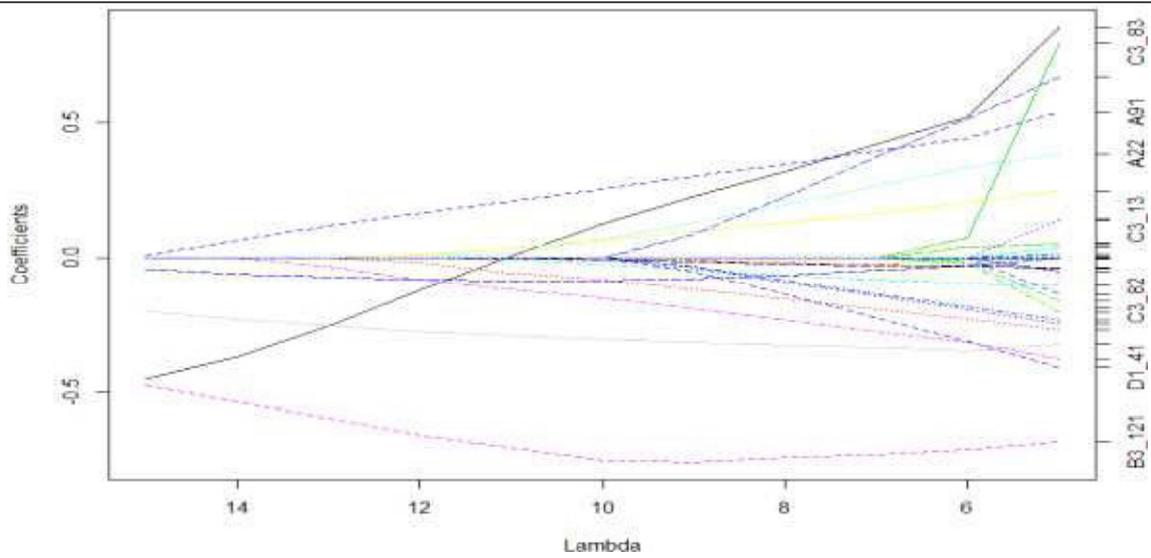


그림 3 Group Lasso Logit 회귀분석의 회귀계수 그래프 (λ 범위: 15~5)

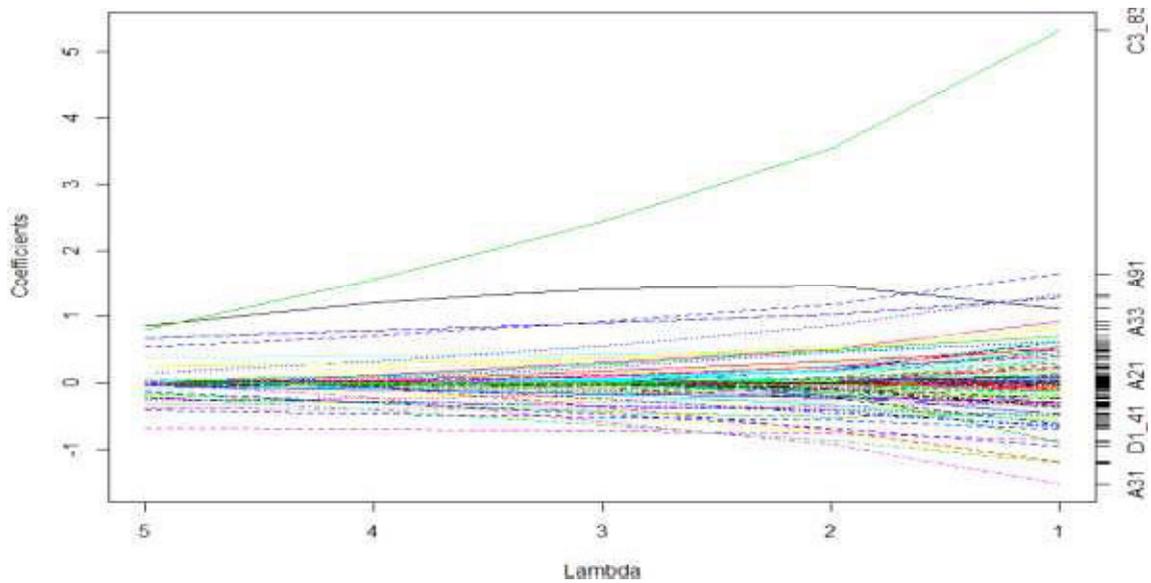


그림 4 Group Lasso Logit 회귀분석의 회귀계수 그래프 (λ 범위: 5~1)

○ 패널티 파라미터 λ 값별 유의한 독립변수 리스트

- 패널티 파라미터 λ 값별 유의한 회귀계수를 가지는 독립변수를 아래 표와 같이 정리하였음
- 전체 99개 변수 중 42개 변수가 유의미한 것으로 나타났으며 문항 C5_5, C2_10, C3_5, D1_6의 경우 다른 문항과 높은 상관관계를 가지고 있어 회귀계수가 다시 0으로 수렴하는 것으로 나타났음
- λ 값이 높은 문항일수록 종속변수인 PRRS 양성 불안정 유무에 더 큰 영향을 미치는 것으로 해석할 수 있음
- 예: 사체 처리방법(B_12), 돈사별 강화 관리(B_6), 후보돈의 외부돼지 도입여부(A9), 환돈 도태원칙 준수(B3_4) 등의 문항에서 높은 영향력을 보임

λ	문항 번호	공선성 유무	개수
23	B3_12		1
21	B3_6		1
17	C5_5	C5_5	1
15	A9		1
13	B3_4		1
12	B1_6, C5_8		2
11	A2, C1_1		2
9	D1_4		1
7	C2_6		1
6	B3_3, C2_10, C3_8, C5_11	C2_10	4
5	C3_1, C4_6		2
4	A3, B1_3, C2_4, C3_5, C5_3, D1_3, D2_2	C3_5	7
3	A7, B2_3, B3_7, B3_11, C1_5, C3_2, C4_7		7
2	B2_4, B3_2, C1_3, C1_7, C2_2, C2_9, C4_2, C4_8, D1_1, D1_6, D2_1	D1_6	11
총 계			42

표 1 Group Lasso Logistic 회귀분석 선별 변수 리스트

□ Random Forest를 이용한 중요도 분석

○ 변수 설정

- Group Lasso Logistic 회귀분석에서와 동일하게 종속변수는 PRRS 양성 불안정 유무에 따라 0과 1값을 가지는 binary 변수로 정의함
- 독립변수도 동일하게 위험도 평가문항 중 범주형 변수로 이루어진 모든 문항 99개를 사용하였음 (후보중돈 위험요소 11개, 내부 위험요소 28개, 외부 위험요소 48개, 양돈장 특성 12개)

○ 모형 적합도

- Tree의 수를 500개로 지정하여 Random Forest를 최적화 시킨 결과 노드 분기시 9개의 변수를 랜덤 추출할 경우 오차율이 최소가 되는 것으로 나타남
- 전체 오차율은 21.97%이고, 실제 PRRS 양성을 음성으로 잘못 판별한 오차율은 43.9%, 음성을 양성으로 잘못 판별한 오차율은 12.1%로 나타나 실제 양성을 양성으로 판별하는 것이 더 어려운 것으로 분석되었음

Type of random forest: classification
 Number of trees: 500
 No. of variables tried at each split: 9

OOB estimate of error rate: 21.97%

Confusion matrix:

		pred		
		0	1	class.error
true	0	80	11	0.1208791
	1	18	23	0.4390244

표 2 Random Forest 모형 적합도

○ 문항별 중요도 분석

- 다음 그림은 y축을 중요도 지수, x축을 독립변수 문항을 순서로 두었을 때의 문항별 중요도를 도식화 한 것으로 다수의 문항들은 중요도가 0.5 이하로 나타났고 최대 3.5 수준의 중요도를 보이는 문항도 있는 것으로 나타남

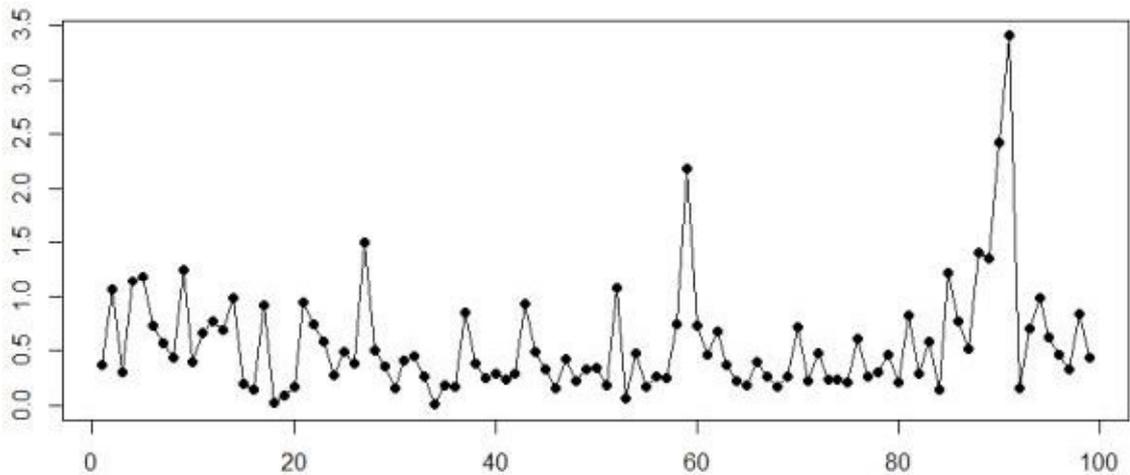


그림 5 Random Forest 중요도 분석 결과

- 다음 표는 중요도 지수순으로 정렬한 결과로 중요도 3점대 1개, 2점대 2개, 1점대 10개, 0.5 이상 1미만이 27개로 조사되었음

문항	중요도								
D1_4	3.37	C1_4	0.784	D2_2	0.493	B3_4	0.331	B1_4	0.219
D1_3	2.647	A9	0.779	C5_1	0.477	C3_9	0.312	B2_4	0.218
C3_1	2.181	B3_12	0.766	B3_3	0.476	D2	0.307	C4_4	0.217
B3_2	1.393	C3_12	0.758	C1_8	0.47	B3_1	0.306	C1_7	0.211
A2	1.339	A4	0.756	C5_9	0.467	C2_2	0.279	C4_5	0.202
D1_1	1.338	D1_6	0.75	B3_6	0.434	C1_9	0.27	C2_9	0.201
B1_6	1.21	C3_2	0.709	C3_5	0.427	C4_3	0.257	C4_1	0.199
A1_2	1.18	D1_8	0.686	B3_13	0.403	C1_3	0.257	C3_6	0.197
D1_7	1.156	B1_1	0.677	C1_5	0.395	B3_8	0.242	B3_10	0.191
C5_7	1.151	C4_6	0.649	C3_8	0.395	C2_1	0.242	B3_11	0.181
D1_2	1.114	A5	0.646	A1_1	0.385	C3_11	0.239	B1_9	0.174
A3	1.067	B2_6	0.644	A8	0.381	C2_8	0.235	C5_6	0.151
A7	1.057	C3_3	0.639	C4_8	0.377	C3_7	0.233	C2_3	0.145
C2_10	0.972	C3_4	0.633	C1_6	0.363	B3_14	0.229	C2_7	0.132
C5_3	0.932	B2_2	0.62	B3_7	0.359	C5_2	0.228	D1_5	0.131
D2_1	0.907	B1_2	0.587	D1_9	0.357	B3_5	0.228	B1_8	0.08
B1_3	0.863	B2_3	0.577	A6	0.356	B1_5	0.227	C2_5	0.077
B2_1	0.862	C2_6	0.551	A1_3	0.351	C3_10	0.225	B1_7	0.018
C5_8	0.815	C5_5	0.543	C1_1	0.349	C1_2	0.22	B3_9	0.007
C2_4	0.812	C4_2	0.516	C4_7	0.346	C5_4	0.22		

표 3 Random Forest 중요도순 문항 정렬

■ 문항별 중요도를 고려한 가중치 조정

□ 문항별 중요도 순위 정의

○ Group Lasso Logistic 회귀분석 선별 변수 순위 정의

- Group Lasso 회귀분석에서 선별된 42개 변수 중 λ 값 13 이상의 5개 변수를 1순위, 7~12 사이의 6개 변수를 2순위, 4~6 사이의 13개 변수를 3순위, 나머지 변수를 4순위로 정의하였음

순위	λ 값	문항	개수
1순위	23	B3_12	1
	21	B3_6	1
	17	C5_5	1
	15	A9	1
	13	B3_4	1
2순위	12	B1_6, C5_8	2
	11	A2, C1_1	2
	9	D1_4	1
	7	C2_6	1
3순위	6	B3_3, C2_10, C3_8, C5_1	4
	5	C3_1, C4_6	2
	4	A3, B1_3, C2_4, C3_5, C5_3, D1_3, D2_2	7
4순위	3	A7, B2_3, B3_7, B3_11, C1_5, C3_2, C4_7	7
	2	B2_4, B3_2, C1_3, C1_7, C2_2, C2_9, C4_2, C4_8, D1_1, D1_6, D2_1	11

표 4 Group Lasso Logistisc 회귀분석 선별 변수 순위 정의

○ Random Forest 중요도를 고려한 순위 정의

- Random Forest 중요도 지수를 고려하여 1~4순위까지 새로운 순위 선별 규칙을 다음 표와 같이 정의하였고 선별된 변수는 1순위 3개, 2순위 10개, 3순위 14개, 4순위 21개, 총 48개가 선별되었음

순위	중요도 기준	선정 문항
1순위	2 이상	D1_4, D1_3, C3_1
2순위	1이상 ~ 2미만	B3_2, A2, D1_1, B1_6, A1_2, D1_7, C5_7, D1_2, A3, A7
3순위	0.7이상 ~ 1미만	C2_10, C5_3, D2_1, B1_3, B2_1, C5_8, C2_4, C1_4, A9, B3_12, C3_12, A4, D1_6, C3_2
4순위	0.42이상 ~ 0.7미만	C3_2, D1_8, B1_1, C4_6, A5, B2_6, C3_3, C3_4, B2_2, B1_2, B2_3, C2_6, C5_5, C4_2, D2_2, C5_1, B3_3, C1_8, C5_9, B3_6, C3_5

표 5 Random Forest 중요도에 따른 선별 변수 순위

○ Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 순위를 종합 고려한 변수 선별

- 표 6은 Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 순위를 비교할 수 있도록 정리한 것임
- 전반적으로 Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 순위가 일치하지 않는 것으로 나타

났음

- Random Forest 중요도 0.7 이상에서는 Group Lasso에서 선별된 변수와 일치하는 비율이 상대적으로 높은 편이나 λ 값에 의해 정해진 영향도 순서대로 Random Forest 중요도 순위가 이어지지 않는 것임
- Group Lasso 순위를 Random Forest 중요도 지수를 고려하여 1~4순위까지 새로운 순위 선별 규칙을 표 7과 같이 정의하였고 선별된 변수는 1순위 6개, 2순위 9개, 3순위 9개, 4순위 11개, 총 25개가 선별되었음

Ques	imprt								
D1_4	3.37	C1_4	0.784	D2_2	0.493	B3_4	0.331	B1_4	0.219
D1_3	2.647	A9	0.779	C5_1	0.477	C3_9	0.312	B2_4	0.218
C3_1	2.181	B3_12	0.766	B3_3	0.476	D2	0.307	C4_4	0.217
B3_2	1.393	C3_12	0.758	C1_8	0.47	B3_1	0.306	C1_7	0.211
A2	1.339	A4	0.756	C5_9	0.467	C2_2	0.279	C4_5	0.202
D1_1	1.338	D1_6	0.75	B3_6	0.434	C1_9	0.27	C2_9	0.201
B1_6	1.21	C3_2	0.709	C3_5	0.427	C4_3	0.257	C4_1	0.199
A1_2	1.18	D1_8	0.686	B3_13	0.403	C1_3	0.257	C3_6	0.197
D1_7	1.156	B1_1	0.677	C1_5	0.395	B3_8	0.242	B3_10	0.191
C5_7	1.151	C4_6	0.649	C3_8	0.395	C2_1	0.242	B3_11	0.181
D1_2	1.114	A5	0.646	A1_1	0.385	C3_11	0.239	B1_9	0.174
A3	1.067	B2_6	0.644	A8	0.381	C2_8	0.235	C5_6	0.151
A7	1.057	C3_3	0.639	C4_8	0.377	C3_7	0.233	C2_3	0.145
C2_10	0.972	C3_4	0.633	C1_6	0.363	B3_14	0.229	C2_7	0.132
C5_3	0.932	B2_2	0.62	B3_7	0.359	C5_2	0.228	D1_5	0.131
D2_1	0.907	B1_2	0.587	D1_9	0.357	B3_5	0.228	B1_8	0.08
B1_3	0.863	B2_3	0.577	A6	0.356	B1_5	0.227	C2_5	0.077
B2_1	0.862	C2_6	0.551	A1_3	0.351	C3_10	0.225	B1_7	0.018
C5_8	0.815	C5_5	0.543	C1_1	0.349	C1_2	0.22	B3_9	0.007
C2_4	0.812	C4_2	0.516	C4_7	0.346	C5_4	0.22		

표 6 Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 변수 순위 비교

순위	선별규칙	선정 문항
1순위	Lasso 1순위 중요도 0.7이상 & Lasso 2순위 중요도 0.8이상	D1_4, A2, B1_6, C5_8, A9, B3_12
2순위	Lasso 1순위 중요도 0.7이하 & Lasso 3순위 중요도 0.8 이상	C5_5, B3_4, D1_3, C3_1, A3, C2_10, C5_3, B1_3, C2_4
3순위	Lasso 2순위 중요도 0.8이하 & Lasso 3순위 중요도 0.5~0.8 & Lasso 4순위 중요도 0.7이상	C2_6, C1_1, B3_2, D1_1, A7, D2_1, D1_6, D3_2, C4_6
4순위	Lasso 3순위 중요도 0.5이하 & Lasso 4순위 중요도 0.3~0.7	D2_2, C5_1, B3_3, C3_5, C3_8, B2_3, C4_2, C1_5, C4_8, B3_7, C4_7

표 7 Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 순위를 고려한 순위 재정의

○ Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 순위를 고려한 변수 삭제

- PRRS 평가 문항 중 일부 문항의 경우 양성 불안정 농장 판별에서 변별력을 가지지 않을 가능성이 존재함
- Group Lasso에서 선별된 변수를 제외하고 Random Forest 중요도 순위가 낮은 순서부터 문항을 제거하여 판별력을 평가한 결과 중요도 0.22 이하의 17개 문항을 제거했을 때 판별 오차율이 가장 낮아지는 것이 확인되었음

Ques	imprt								
D1_4	3.37	C1_4	0.784	D2_2	0.493	B3_4	0.331	B1_4	0.219
D1_3	2.647	A9	0.779	C5_1	0.477	C3_9	0.312	B2_4	0.218
C3_1	2.181	B3_12	0.766	B3_3	0.476	D2	0.307	C4_4	0.217
B3_2	1.393	C3_12	0.758	C1_8	0.47	B3_1	0.306	C1_7	0.211
A2	1.339	A4	0.756	C5_9	0.467	C2_2	0.279	C4_5	0.202
D1_1	1.338	D1_6	0.75	B3_6	0.434	C1_9	0.27	C2_9	0.201
B1_6	1.21	C3_2	0.709	C3_5	0.427	C4_3	0.257	C4_1	0.199
A1_2	1.18	D1_8	0.686	B3_13	0.403	C1_3	0.257	C3_6	0.197
D1_7	1.156	B1_1	0.677	C1_5	0.395	B3_8	0.242	B3_10	0.191
C5_7	1.151	C4_6	0.649	C3_8	0.395	C2_1	0.242	B3_11	0.181
D1_2	1.114	A5	0.646	A1_1	0.385	C3_11	0.239	B1_9	0.174
A3	1.067	B2_6	0.644	A8	0.381	C2_8	0.235	C5_6	0.151
A7	1.057	C3_3	0.639	C4_8	0.377	C3_7	0.233	C2_3	0.145
C2_10	0.972	C3_4	0.633	C1_6	0.363	B3_14	0.229	C2_7	0.132
C5_3	0.932	B2_2	0.62	B3_7	0.359	C5_2	0.228	D1_5	0.131
D2_1	0.907	B1_2	0.587	D1_9	0.357	B3_5	0.228	B1_8	0.08
B1_3	0.863	B2_3	0.577	A6	0.356	B1_5	0.227	C2_5	0.077
B2_1	0.862	C2_6	0.551	A1_3	0.351	C3_10	0.225	B1_7	0.018
C5_8	0.815	C5_5	0.543	C1_1	0.349	C1_2	0.22	B3_9	0.007
C2_4	0.812	C4_2	0.516	C4_7	0.346	C5_4	0.22		

표 8 Random Forest 중요도 순위와 Group Lasso 순위를 고려한 변수 제거 리스트

3. 변수선택 방법 및 예측 알고리즘별 판별 성능 비교

■ 위험요인별 점수 합산 미적용시 판별 성능 평가

- 본 절에서는 PRRS 양성 불안정 농장 판별을 위한 방법으로 먼저 위험요인별 점수 합산을 하지 않고 99개 문항 모두를 독립변수로 사용하는 경우에 대한 판별 성능을 검증하였음
- 점수 합산 미적용 경우에 대한 판별 성능 평가의 첫 번째 목적은 99개 평가 문항의 선택지를 범주형으로 가정하였을 때와 전문가들이 선택지별 위험도를 고려하여 점수를 부여한 연속형 변수로 가정하였을 때의 예측 성능을 비교하는 것으로 선택지별 점수를 부여한 것이 얼마나 판별 성능을 높일 수 있는지를 평가할 수 있게 함
- 두 번째 목적은 위험요인별 점수 합산을 할 경우 영향력이 높은 문항과 낮은 문항의 점수가 합산되어 정보손실이 발생하게 되는 문제가 발생하므로 판별 성능 향상을 위해서 합산을 하지 않고 모든 문항 독립변수로 활용하는 것이 어느 정도 판별 성능 향상에 기여하는지를 평가하는 것임
- 세 번째 목적은 앞서 제시된 문항 축소 방안을 적용했을 때 판별 성능이 어느 정도 개선되는지를 확인하는 것임
- 판별에 사용된 기법은 분류 알고리즘으로 가장 성능이 좋은 것으로 알려진 Random Forest와 Support Vector Machine 알고리즘을 사용하여 비교하였음

□ 문항 선택지별 점수 미적용시 (범주형 변수 경우) 판별 성능 비교

○ Random Forest와 Support Vector Machine 성능 비교

순번	모형	Random Forest			Support Vector Machine		
		전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율	전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율
1	기본 모형	22.0%	18/41	11/91	25.0%	33/41	0/91
2	문항축소 모형	21.2%	16/41	12/91	23.5%	31/41	0/91

표 9 점수 미적용시 판별 알고리즘별 기본모형과 문항축소 모형의 판별 성능 비교

- 독립변수의 선택지를 범주형으로 둔 경우 Random Forest가 22.0%의 오차율을 보여서 Support Vector Machine보다 더 나은 판별 성능을 보여줌
- 17개 문항을 축소한 모형에서는 두 알고리즘 모두 1%p 내외의 성능 개선 효과가 나타났음

□ 문항 선택지별 점수 적용시 (연속형 변수 경우) 판별 성능 비교

○ 판별 알고리즘별 성능 및 문항 축소 전후 성능 비교

순번	모형	데이터	Random Forest			Support Vector Machine		
			전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율	전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율
1	기본 모형	전체 ¹⁾	21.2%	19/41	9/91	6.8%	9/41	0/91
2		훈련 ²⁾	24.8%	17/34	9/71	5.7%	5/34	1/71
3		예측 ³⁾	25.9%	2/7	5/20	22.2%	3/7	3/20
4	문항 축소 모형	전체	25.8%	23/41	11/91	6.1%	8/41	0/91
5		훈련	22.9%	16/34	8/71	3.8%	3/34	1/71
6		예측	22.2%	2/7	4/20	14.5%	2/7	2/20

표 10 점수 적용시 판별 알고리즘별 기본모형과 문항축소 모형의 판별 성능 비교

※ 데이터: 1)전체데이터로 모델링, 2)80%데이터로 모델링, 3)2)의 모델로 20%로 예측

- 독립변수의 선택지에 점수를 부여한 경우에는 Support Vector Machine의 전체 데이터 적합시와 훈련 데이터 적합시의 판별 오차가 현저하게 낮아졌으나 평가 데이터로 예측시에는 Random Forest 대비 4%p 가량의 판별 성능 향상 효과만 있었음
- 17개 문항을 축소한 모형에서는 Random Forest에서는 성능 개선 효과가 뚜렷하게 나타나지 않았으나 Support Vector Machine에서는 전반적으로 개선효과가 큰 것으로 나타났음

□ 문항 선택지별 점수 적용/미적용에 따른 알고리즘별 차이 해석

- Random Forest의 경우 기본적으로 의사결정나무 알고리즘을 기반으로 하기 때문에 범주형 변수를 이용한 판별에 특화되어 있으며, 판별모형을 만드는 과정이 수백개의 트리에서 나온 결과를 일반화하기 때문에 판별 성능의 안정화가 특징임
- 반면 Support Vector Machine의 경우 연속형 변수를 독립변수로 사용할 때에 판별 성능이 더 좋아지는 기법이며, 데이터가 가진 특성에 최대한 적합한 모형을 만드는 것이 특징임
- 따라서 Random Forest는 범주형일때와 연속형일때의 판별 성능 차이가 거의 나지 않는 반면, Support Vector Machine은 독립변수가 연속형일때의 판별 성능이 개선되는 것을 확인할 수 있음
- 문항 축소 모형에 대해서 Random Forest에서 성능 개선이 되지 않는 것은 안정적인 성능을 위해 일반화하는 과정에서 중요도가 낮은 문항들이 판별 과정에 영향을 미치지 않기 때문인 반면 Support Vector Machine에서는 성능 개선효과가 큰 이유는 데이터 특성에 최대한 적합시키는 Support Vector Machine의 특성상 변별력이 떨어지는 문항이 제거될 경우 더 나은 판별 성능을 보여주게 됨

■ 위험요인별 점수 합산 적용시 판별 성능 평가

□ 가중치 적용 방법별 판별 성능 비교

○ Group Lasso, Random Forest 방법 및 혼합 방법 비교

- 높은 순위의 변수 그룹에 높은 가중치를 적용하여 후보종돈, 내부위험, 외부위험, 양돈장 특성 4개의 요인별 합산 점수로 PRRS 양성 불안정 농장 판별 성능을 평가하였음
- 가중치 적용 방법은 1) Group Lasso 순위, 2) Random Forest 순위, 3) Group Lasso와 Random Forest 결합 순위의 3가지 방법에 대하여 판별 성능을 비교하였음
- 합산 점수를 이용할 경우 독립변수가 연속형 변수이고 변수의 수가 4개로 적기 때문에 판별

알고리즘으로 Random Forest보다는 Support Vector Machine이나 Logistic Regression이 더 적합함

순번	모형		Support Vector Machine			Logistic Regression		
			전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율	전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율
1	기본	전체	18.9%	18/41	7/91	25.8%	23/41	11/91
2		훈련	20.0%	15/34	6/71	22.2%	17/34	12/71
3		예측	18.5%	3/7	2/20	18.5%	3/7	2/20
4	Lasso	전체	14.4%	15/41	4/91	20.5%	19/41	9/91
5		훈련	17.1%	13/34	5/71	23.8%	15/34	10/71
6		예측	18.5%	3/7	2/20	18.5%	3/7	2/20
7	RF	전체	17.4%	17/41	6/91	24.2%	23/41	9/91
8		훈련	17.1%	14/34	4/71	23.8%	17/34	8/71
9		예측	14.8%	3/7	1/20	22.2%	3/7	3/20
10	Lasso+RF	전체	14.4%	15/41	4/91	22.0%	21/41	8/91
11		훈련	16.2%	13/34	4/71	23.8%	15/34	10/71
12		예측	14.8%	3/7	1/20	22.2%	3/7	3/21

표 11 점수합산 경우의 판별 알고리즘별, 가중치 순위 적용 방법별 판별 성능 비교

- 표 11은 가중치 적용 방법별 판별 성능을 비교한 것으로 가중치는 1순위:2순위:3순위:4순위 변수들에 대하여 5:4:3:2의 가중치를 부여하였음
- 전반적으로 Support Vector Machine이 Logistic Regression보다 판별 성능이 우수한 편으로 Logistic Regression은 가중치 적용에 의한 성능 개선이 크게 나타나지 않았음
- Support Vector Machine의 경우 가중치 적용에 의한 판별 성능이 개선되었으며 Group Lasso 순위와 Random Forest 순위를 종합적으로 고려한 경우가 판별 성능에서 개선효과가 컸으며 그 다음으로 Group Lasso 순위, Random Forest 순위 순으로 나타났음
- Lasso+RF 가중치 적용 모형의 예측데이터 판별 성능은 14.8%로 앞서 점수 합산을 적용하지 않은 경우와 비교하여 유사한 수준까지 개선되었음

□ 문항 축소 및 가중치 동시 적용 효과 검증

○ 문항 축소 및 문항 축소와 가중치 동시 적용시 판별 성능 비교

- 점수 합산 경우에서도 문항축소에 의한 판별 성능 개선 효과가 있는지와 앞서 도출된 최적 가중치와 문항축소가 동시에 적용되었을 때의 판별 성능 개선효과를 비교하였음
- 가중치는 Group Lasso와 Random Forest 종합 순위 방법에서의 5:4:3:2를 적용하였으며 문항 축소는 17개 문항 삭제 방법을 적용하였음

순번	모형	데이터	Support Vector Machine			Logistic Regression		
			전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율	전체 오차율	양성판별 오차율	음성판별 오차율
1	기본 모형	전체	18.9%	18/41	7/91	25.8%	23/41	11/91
2		훈련	20.0%	15/34	6/71	22.2%	17/34	12/71
3		예측	18.5%	3/7	2/20	18.5%	3/7	2/20
4	문항축소 모형	전체	18.9%	18/41	7/91	24.2%	23/41	9/91
5		훈련	20.0%	15/34	6/71	27.6%	17/34	12/71
6		예측	18.5%	3/7	2/20	22.2%	4/7	2/20
4	가중치+문항축소 모형	전체	14.4%	15/41	4/91	22.2%	19/41	10/91
5		훈련	16.2%	13/34	4/71	22.9%	14/34	10/71
6		예측	14.8%	3/7	1/20	22.2%	3/7	3/20

표 12 점수합산 경우의 판별 알고리즘별, 문항축소 및 가중치 적용시 판별 성능 비교

- 점수 합산의 경우에는 문항축소에 의한 성능 개선 효과가 크지 않은 것으로 나타남
- 가중치와 문항축소를 동시에 적용한 모형에서도 문항축소 없이 가중치만 적용된 모형과 판별 성능이 동일한 것으로 나타나 위험요인별 합산 점수를 이용하는 판별 모형에서는 문항축소에 의한 효과가 나타나지 않는 것으로 판단됨

4. 기존 및 수정 가중치를 고려한 PRRS 위험도 분석

■ PRRS 위험도 분석

□ Binary Logit 모형을 활용하여 PRRS 발병률 추정

- 종속변수가 이항(Binary)인 경우에 사용하며, 이항변수끼리 통계적으로 배반적이고 확실적인 선택을 따르며, 다음과 같은 관계를 가정함.

$$y^* = \sum_{k=1}^K \beta_k x_k + \epsilon \quad (1)$$

- y^* 는 관찰 불가능한(Unobservable) 응답변수로 잠재변수임.
- y^* 가 어떠한 수준 이상에서 이항 선택항 범주인 사건 A가 일어나며, 이하에서는 일어나지 않는 경우로 할당하여 더미변인(dummy variable)으로 처리

- 이산분포에서 이항분포화하는 과정을 통해 더미변인화를 거침

$$y = \begin{cases} 1 & \text{if } y^* > 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (2)$$

- y^* 을 이항으로 구분짓는 기준으로 0으로 보고 $y^* > 0$ 의 경우 관찰 가능한 응답변수 $y=1$ 로 나타나게 되며, 본 분석에서는 PRRS 감염여부로 판단함.
- 수의사의 실험 진단결과를 기준으로, 현재 PRRS 상황이 양성으로써 모돈군이 불안정한 상태를 양성($y=1$), 이외는 음성($y=0$)으로 처리함.

○ 식 (1)과 식(2)로부터 다음과 같은 식을 유도함.

$$\begin{aligned} \text{Prob}(y=1) &= \text{Prob}\left(\sum_{k=1}^K \beta_k x_k + \epsilon > 0\right) \quad (3) \\ &= \text{Prob}\left(\epsilon > -\sum_{k=1}^K \beta_k x_k\right) \\ &= 1 - F\left(-\sum_{k=1}^K \beta_k x_k\right) \\ &= F\left(-\sum_{k=1}^K \beta_k x_k\right) \end{aligned}$$

○ 로짓분포는 연속확률분포함수에서 정의되는 형태로 함수는 다음과 같음.

$$F(\theta) = \frac{1}{1+e^{-\theta}} = \frac{1}{1+\frac{1}{e^\theta}} = \frac{e^\theta}{e^\theta+1} = \frac{e^\theta}{1+e^\theta} \quad (4)$$

○ 임의의 확률변수로 정의된 θ 는 다음과 같은 독립변수들의 선형 결합으로써 선형 변환을 하면 다음 식과 같음.

$$\text{Prob}(y=1) = F(\theta) = F\left(\sum_{k=1}^K \beta_k x_k\right) \quad (5)$$

$$e^\theta = e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k} = \frac{P(y=1)}{1-P(y=1)} \quad (6)$$

$$\log\left(\frac{P(y=1)}{1-P(y=1)}\right) = \sum_{k=1}^K \beta_k x_k \quad (7)$$

- 식(6)은 Odds로서 이항 선택의 경우에 있어 임의의 사건 A가 일어날 확률을 $P(y=1)$ 로 정의했을 때, 사건 A가 일어날 확률을 A가 일어나지 않을 확률($1-P(y=1)$)로 나누어 준 것을 의미함.
- Odds는 단순한 확률 또는 비율이 아니며 한 사건이 일어나지 않을 경우의 확률에 대비해 일어날 사건의 확률의 비율로 해석되어야 함.

□ 변수의 설정

○ PRRS의 양성/음성 여부를 종속으로 설정하고 사전에 구조화된 설문 문항의 요소별 문항 가중치를 합산하여 독립변수를 4가지로 구분

변수명		설명
종속	PRRS	PRRS 양성/음성 여부 (양성 1/음성 0)
독립	Breed_Pig	후보종돈 요소 (가중치 처리된 각 문항별 점수 합산)
	In_F	내부위험 요소 (가중치 처리된 각 문항별 점수 합산)
	Ex_F	외부위험 요소 (가중치 처리된 각 문항별 점수 합산)
	Infra	양돈장 요소 (가중치 처리된 각 문항별 점수 합산)

표 1 변수설정

■ 기존 문항 적용 PRRS 위험도 분석

□ 구조화된 설문을 통해 수집된 4개의 요인(후보종돈, 내부위험, 외부위험, 양돈장)의 문항별 결과 값을 합산하여 분석

□ 분석결과

변수	추정치	Odds Ratio	한계효과	표준편차	z	P>z
Breed_Pig	0.050	1.051	0.96%	0.016	3.03	0.002
In_F	0.051	1.052	0.97%	0.024	2.15	0.032
Ex_F	-0.013	0.987	-0.25%	0.017	-0.77	0.440
Infra	0.030	1.031	0.58%	0.013	2.33	0.020
constant	-5.878	0.003		1.129	-5.21	0.000
obs.	130					
LL	-61.39					
LR chi2	39.3	(0.0000)				
Pseudo R2	0.243					

표 1 기본 문항 Logit 모형 추정결과

- PRRS 발병에 내부위험, 후보종돈, 양돈장, 외부위험 요인의 순으로 영향을 미치는 것으로 나타남.
- 5% 유의수준에서 외부위험 요인인 유의미하지 않음.
- 분석결과를 토대로, 주어진 설명변수들에 대한 PRRS의 발병확률을 추정하면 다음 식에 의해 26.1%의 발병률을 도출.

$$\begin{aligned}
 Prob(y=1) &= 1 - L\left(-\sum_{k=1}^K \beta_k x_k\right) = L\left(-\sum_{k=1}^K \beta_k x_k\right) = \frac{e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k}}{1 + e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k}} \quad (8) \\
 &= 26.1\%
 \end{aligned}$$

- 각 변수의 한 단위 변화에 따른 확률변화인 한계효과는 식(5)를 특정 설명변수에 대하여 1계 편미분하여 얻을 수 있으며, 한계효과의 방정식은 다음과 같음.

$$\frac{\partial \text{Prob}(y=1)}{\partial x_k} = \frac{\partial \left(\frac{e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k}}{1 + e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k}} \right)}{\partial x_k} = \frac{e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k}}{\left(1 + e^{\sum_{k=1}^K \beta_k x_k} \right)^2} \beta_k \quad (9)$$

- 5% 유의수준에서 유의미한 결과를 가지는 내부위험, 후보종돈, 양돈장 요인들의 1 수준 변화에 PRRS발병률은 각각 0.97%, 0.96%, 0.58% 상승하는 것으로 분석됨.

■ 기존 문항 축소 전후 판별 예측력 비교

- Group Lasso 순위와 Random Forest 중요도 지수를 고려하여 PRRS발병에 영향력이 떨어지는 문항을 제거하여 요인별 변수를 구성하여 Binary Logit 모형으로 분석

분석결과

변수	추정치	Odds Ratio	한계효과	표준편차	z	P>z
Breed_Pig	0.051	1.052	0.96%	0.017	2.95	0.003
In_F	0.044	1.045	0.83%	0.025	1.75	0.081
Ex_F	-0.017	0.983	-0.33%	0.023	-0.74	0.461
Infra	0.034	1.035	0.66%	0.014	2.55	0.011
constant	-6.029	0.002		1.178	-5.12	0
obs.	130					
LL.	-61.85					
LR chi2	38.36	(0.0000)				
Pseudo R2	0.237					

- PRRS 발병에 후보종돈, 내부위험, 양돈장, 외부위험 요인의 순으로 영향을 미치는 것으로 나타남.
- 10% 유의수준에서 외부위험 요인인 유의미하지 않음.
- 분석결과를 토대로, 주어진 설명변수들에 대한 PRRS의 발병확률을 추정하면 다음 식에 의해 25.6%의 발병률을 도출.
- 10% 유의수준에서 유의미한 결과를 가지는 후보종돈, 내부위험, 양돈장 요인들의 1 수준 변화에 PRRS 발병률의 변화는 각각 0.96%, 0.83%, 0.66% 상승하는 것으로 분석됨.
- 기존 모형에 비해 모형의 적합도가 다소 떨어지고 각 변수들의 유의수준 또한 떨어짐.

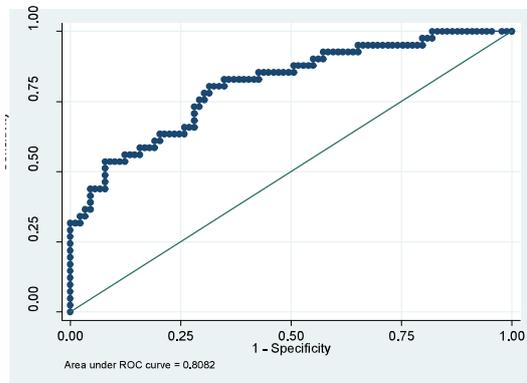
■ 문항별 가중치 조정 전후 판별 예측력 비교

- Group Lasso, Random Forest 방법을 혼합하여 높은 순위의 변수 그룹에 높은 가중치를 적용하여 후보종돈, 내부위험, 외부위험, 양돈장 특성 4개의 요인별 합산 점수로 PRRS 발병률 분석

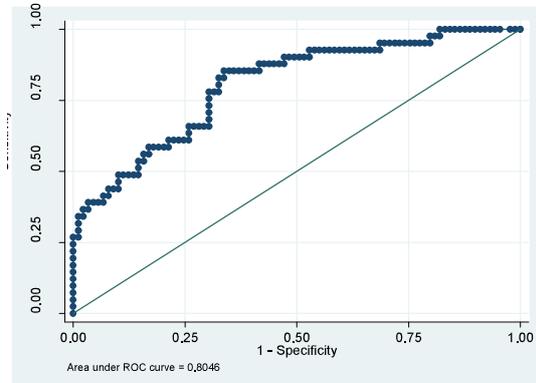
□ 분석결과

변수	기준	축약	가중치	축약-가중치
Breed_Pig	0.050***	0.051***	0.018***	0.018***
In_F	0.051**	0.044*	0.017	0.016
Ex_F	-0.013	-0.017	-0.007	-0.006
Infra	0.030**	0.034**	0.014***	0.014***
constant	-5.878	-6.029	-5.308***	-5.333***
L.L.	-61.39	-61.85	-58.77	-58.44
LR chi2	39.3***	38.36***	44.53***	44.39***
Pseudo R2	0.243	0.237	0.275	0.274
Prob(PRRS=양성)	26.1%	25.6%	25.1%	25.0%

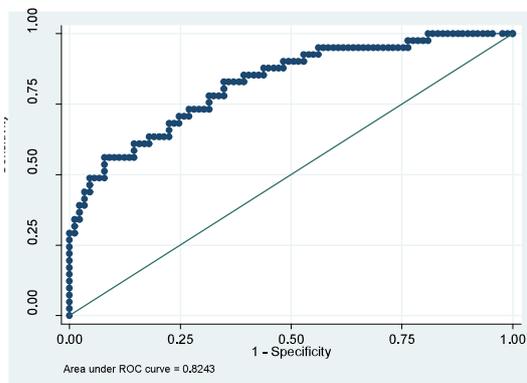
- 모형의 적합도 측면에서 가중치 적용 모형이 가장 좋지만, 각 설명변수의 유의수준을 고려할 경우, 기준 모형이 전반적으로 PRRS 발병예측에 유리함.
- 설문문항을 설계할 때, 요인별 문항의 가중치를 고려하였기 때문에, 각 요인별 배점이 100점으로 구성된 설문문항이므로, 각 합산한 요인별 가중치를 고려하는 것이 모형의 적합도에 필요한 부분으로 사료됨.



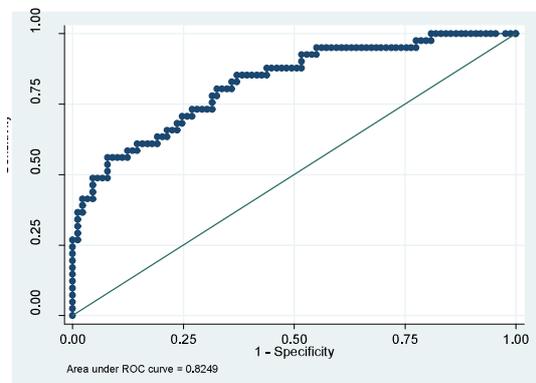
(a) 기준 모형 (0.8082)



(b) 축약 모형 (0.8046)



(c) 가중치 모형 (0.8243)



(d) 축약-가중치 모형 (0.8249)

<그림1> 각 모형별 ROC 커브

※PRRS 위험도 평가 문항의 변수명 리스트

구분	변수명	문항
종속 변수	PRRS	(1)현재PRRS상황(실험실진단결과를기준)
후보돈	A1_1	(1) 후보돈 도입 및 사용 방법은?
	A1_2	(2) 외부 후보돈 도입 방법은?
	A1_3	(3) 정액의 도입 및 사용 방법은?
	A2	2. 외부에서 도입된 후보돈의 입식 장소는?
	A3	3. 격리 후보돈사에서의 체류기간은?
	A4	4. 격리 후보돈사 출입 절차 1은?
	A5	5. 격리 후보돈사 출입 절차 2은?
	A6	6. 외부 도입 후보돈 PRRS 검사는?
	A7	7. 도입 후보종돈(후보돈, 후보웅돈)에 대한 PRRS 순치는?
	A8	8. 격리 후보돈사의 올인/올아웃 실행 여부는?
A9	9. 최근 3년 이내에 후보돈 이외에 외부(질병 상황이 차이가 나는 다른 농장의 이유모돈, 임신돈, 웅돈, 자돈 등)에서 도입한 돼지가 있는가?	
내부 위험	B1_1	(1) 최근 3년 이내에 담당 수의사와 계약하여 자문을 받고 있는가?
	B1_2	(2) 최근 3년 이내에 직원 교육이 정기적으로 이루어 지고 있는가?
	B1_3	(3) 차단방역 자체 점검이 이루어 지고 있는가?
	B1_4	(4)농장에차단방역상위해요소로생각되는해충및동물은?
	B1_5	(5) 농장 울타리 내부에서 나온 쓰레기는 청결하게 처리되는가?
	B1_6	(6) 농장의 물은 정기적인 검사와 음수소독을 실시 하는가?
	B1_7	(7)농장에공급되는물의공급처는?
	B1_8	(8) 주관정 및 돈사 내 물 탱크는 어떻게 관리되는가?
	B1_9	(9) 소독
	B2_1	① 교체 후보돈은 입식후 종부사로 입식전에 격리후보돈사 등에서 PRRS 바이러스에 어떤 방법으로 노출되는가?
	B2_2	② 교체 후보돈이 PRRS 바이러스에 노출 된 후 기존돈군으로(종부사) 입식되는 경우 노출 후 기간을 선택하시오.
	B2_3	③ 모돈은 PRRS 바이러스에 의해서 정기적으로 어떤 방법으로 노출됩니까?
	B2_4	④ PRRS가 급성 발생하는 경우 자연노출 또는 혈청접종(SI) 또는 생독백신 접종에 의해서 즉시 전체 모돈은 노출되어 왔다.
	B2_6	⑥ 웅돈에 생독백신을 사용하는 경우 대답하세요?
	B3_1	① 1두 1침 준수?
	B3_2	② 농장 [분만사, 자돈사, 육성사 (육성사 없는 경우 통과), 비육사]의 돼지 사육 흐름, 즉 올인/올아웃을 실행하고 있는가?
	B3_3	③ 환돈사 또는 환돈방 운영?

	B3_4	④ 환돈 도태 원칙이 있고 원칙에 따라 회복불능돈을 도태하고 있는가?	
	B3_5	⑤ 분만사 양자?	
	B3_6	⑥ 돈사별 장화?	
	B3_7	⑦ 장화는 청결하게 유지되는가?	
	B3_8	⑧ 슬러리 피트는 낮은 수위를 유지하는가?	
	B3_9	⑨ 문제 발생 시 전문 주치 수의사의 방문과 조치가 단시간(2일 이내)에 가능한가?	
	B3_10	⑩ 효과적인 백신 접종 프로그램이 적절히 수행되는가?	
	B3_11	⑪ 약품은 적절하고 안전하게 보관되는가? (약품 보관함, 백신 보관 상태 등)	
	B3_12	⑫ 사체 처리는 방법은 어떠한가?	
	B3_13	⑬ 사체 처리는 적절하게 수행되는가?	
	B3_14	⑭ 사체를 처리장(퇴비장등)에서 처리 후, 착용한 옷, 장화를 교체하고 손을 씻은 후 돈사에 출입하는가?	
외부 위험	C1_1	(1) 상하차 시설(출하대 등)의 위치는?	
	C1_2	(2) 상하차 시설이 돼지가 되돌아 오지 못하도록 설계, 건축되었는가?	
	C1_3	(3) 상하차 시설의 형태가 세척 시 분뇨가 돈사 및 농장 내로 역류되지 않는가?	
	C1_4	(4) 상하차 절차 및 운송 상태는?	
	C1_5	(5) 상하차 작업 후에 세척/소독/건조 절차는?	
	C1_6	(6) 농장 내부에서만 돼지 수송용으로 사용하는 차량의 관리는?	
	C1_7	(7) 돼지 전출 시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈 판매, 비육돈 판매, 번식돈 판매 등 돼지 전출 시 이용하는 차량은 무엇인가?	
	C1_8	(8) 돼지 전출시의 위생 절차 - 도태, 이유자돈 판매, 비육돈 판매, 번식돈 판매 등을 위해 농장에 진입하기 전 운송차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?	
	C1_9	(9) 돼지전입시의 위생절차-후보돈, 자돈입식 등에 사용되는 차량의 농장진입전 운송 차량의 위생 절차 및 상황은 어떠한가?	
	C2_1	(1) 차량소독조는 농장 경계에서 운영되고 있는가?	
	C2_2	(2) 차량소독은 PRRS 및 악성전염병(구제역, 돼지열병)에 효과적인 소독제를 유효한 농도로 희석하여 사용하고있는가?	
	C2_3	(3) 차량을 위한 소독시설은 잘 작동되고, 보온이 되는가?	
	C2_4	(4) 농장 내 진입하는 차량 기사는 샤워 후 지정된 의복, 장화로 갈아입는가?	
	C2_5	(5) 사료 차량이 농장 내 준청결구역으로 진입하는가?	
	C2_6	(6) 분뇨 차량이 농장 내 준청결구역으로 진입하는가?	
	C2_7	(7) 출하 차량(비육, 종돈, 도태돈)이 농장 내 준청결구역으로 진입하는가?	
	C2_8	(8) 사료 운송 차량의 이용 형태는?	
	C2_9	(9) 돈사 간 이동 통로(돼지, 사람 동선)은 차량 동선과 구분되는가?	
	C2_10	(10) 농장안팎에서함께사용되는차량,기계,장비는농장재진입때마다세척및소독을하는가?	
		C3_1	(1) 샤워실 또는 방역실(샤워실 없고, 옷과 신발만 비치된 공간)의 존재와 실행 여부?
		C3_2	(2) 샤워실 또는 방역실은 경계지역에 있는가?
	C3_3	(3) 샤워실 또는 환복실은 탈의 구역(오염) / 샤워 구역 또는 이동(중립) 구역 / 환복	

		구역(청결)으로 교차오염되지 않도록 구분되어 있는가?
	C3_4	(4) 샤워장의 샤워기가 잘 작동되고 온수,삼푸,비누 등의 공급이 원활히 되고 있는가?
	C3_5	(5) 샤워실 또는 방역실은 청결하게 관리되는가?
	C3_6	(6) 샤워실 내부의 환복실 또는 방역실에 갈아입을 작업복이 잘 준비되어 있는가?
	C3_7	(7) 방문자를 위해 샤워실 또는 방역실 환복 절차에 대한 알림판이 잘 보이도록 게시되어 있는가?
	C3_8	(8) 내부 작업복의 세탁은 어디에서 하는가?
	C3_9	(9) 농장 작업복 및 신발은 농장 내부에서만 착용하는가?
	C3_10	(10) 개인 소지품의 돈사 내 반입을 허용하는가? (시계, 장신구, 휴대전화, 노트북 등)
	C3_11	(11) 농장을 진입하는 모든 사람에게 권장 다운타임을 준수하게 하는가? (예. 다른농장의 돼지 또는 오염물질 접촉후의 24시간 동안의 출입 제한시간 준수)
	C3_12	(12) 농장직원이 다른 오염원인과 접촉하는가?
	C4_1	(1) 농장 입구(정문)는 항상 닫아두고 잠겨있는가?
	C4_2	(2) 방명록에는 이전 방문농장과 다운타임을 기록하는가?
	C4_3	(3) 농장 내부 출입하는 모든 사람은 허가된 다운타임을 준수한 사람 만 입장하는가?
	C4_4	(4) 방문자 알림판(출입절차 등)과 진입금지 표지가 잘 보이도록 설치되었는가?
	C4_5	(5) 농장외부에 방문자 차량 주차장이 있는가?
	C4_6	(6) 방문자가 돈사 밖 주변을 (준청결 구역) 다니게 될 때 그 절차는 어떠한가?
	C4_7	(7) 돈사 출입문은 항상 닫혀있는가?
	C4_8	(8) 주변 울타리가 오염지역과 청결지역을 명확히 구분하고 차량, 사람, 동물의 이동을 제한하는가?
	C5_1	(1) 외부에 물품반입창고가 운영되고 있는가?
	C5_2	(2) 물품반입창고는 농장 경계에 위치하고 있는가?
	C5_3	(3) 물품반입창고에 입고 된 물품은 소독과(자외선등) 계류 시간을 가지는가?
	C5_4	(4) 정액보관고는 농장 경계의 적절한 위치에서 운영되는가?
	C5_5	(5) 돼지고기가 농장 내로 반입되지 않고, 관리자가 외부의 생돈육을 다루지 않는가?
	C5_6	(6) 지대사료창고는 농장경계에 위치하고 있는가?
	C5_7	(7) 지대사료창고에 입고 된 사료는 소독과 (자외선 등) 계류 시간을 가지는가?
	C5_8	(8) 다른 농장의 물품/장비를 돈군내로 반입하는가?(임신진단기, 부검도구, 공구등)
	C5_9	(9) 깔짚 (톱밥 등)은 안전한 원재료를 사용하는가?
양돈장 특성	DL_1	(1) 가장 가까운 PRRS 양성 양돈장까지의 거리는?
	DL_2	(2) 가장 가까운 양돈장까지의 거리는?
	DL_3	(3) 농장 반경 3km 이내의 양돈장 숫자는?
	DL_4	(4) 농장 반경 3-10km 이내의 양돈장 숫자는?
	DL_5	(5) 농장 주위에 잠재 오염원이 존재하는가? (예 - 도축장, 육가공공장, 공동분뇨처리장, 사료공장 또는 집하센터, 돼지운송차량 차고지 등)
	DL_6	(6) 농장에서 주 도로까지의 거리는? (공용도로에서 농장 입구까지의 거리)

D1_7	(7) 농장에서 가장 인접한 공용도로를 함께 이용하는 양돈장의 수는? (사료, 출하 등)
D1_8	(8) 농장이 위치한 특징적인 형태를 선택하시오?
D1_9	(9) 농장 지역 기후?
D2	2. 사육시스템의 형태는?
D2_1	(1) 돈사의 형태는?
D2_2	(2) 돈사의 방조망 설치

※ Naive Bayes Classifier를 이용한 문항별 발병영향 확률

Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
A1_1	neg	0.1	0.67	0.23						
	pos	0.15	0.71	0.15						
	diff	0.05	0.04	-0.08						
A1_2	neg	0.16	0.76	0.04	0.01		0	0.02		
	pos	0.24	0.56	0.02	0.12		0.02	0.02		
	diff	0.08	-0.2	-0.02	0.11		0.02	0		
A1_3	neg	0.62	0	0.35	0.03					
	pos	0.78	0.02	0.15	0.05					
	diff	0.16	0.02	-0.2	0.02					
A2	neg	0.7	0.19	0.11						
	pos	0.37	0.54	0.1						
	diff	-0.33	0.35	-0.01						
A3	neg	0.04	0.55	0.32		0.09				
	pos	0	0.34	0.37		0.29				
	diff	-0.04	-0.21	0.05		0.2				
A4	neg	0.02	0.33	0.35	0.3					
	pos	0	0.15	0.2	0.66					
	diff	-0.02	-0.18	-0.15	0.36					
A5	neg	0.11	0.14	0.08	0.38	0.29				
	pos	0.02	0.05	0.02	0.29	0.61				
	diff	-0.09	-0.09	-0.06	-0.09	0.32				
A6	neg	0.15	0.03	0.15		0.66				
	pos	0.07	0.02	0.05		0.85				
	diff	-0.08	-0.01	-0.1		0.19				
A7	neg	0.14	0.36	0.33	0.16					
	pos	0.02	0.1	0.41	0.46					
	diff	-0.12	-0.26	0.08	0.3					
A8	neg	0.34	0.26	0.4						
	pos	0.34	0.1	0.56						
	diff	0	-0.16	0.16						
A9	neg	0.05	0.95							
	pos	0.22	0.78							
	diff	0.17	-0.17							

Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
B1_1	neg	0.56	0.32	0.1	0.02					
	pos	0.29	0.51	0.15	0.05					
	diff	-0.27	0.19	0.05	0.03					
B1_2	neg	0.42	0.35	0.23						
	pos	0.17	0.49	0.34						
	diff	-0.25	0.14	0.11						
B1_3	neg	0.12	0.12	0.36	0.4					
	pos	0.02	0.12	0.15	0.71					
	diff	-0.1	0	-0.21	0.31					
B1_4	neg	0.24	0.76							
	pos	0.12	0.88							
	diff	-0.12	0.12							
B1_5	neg	0.95	0.05							
	pos	0.85	0.15							
	diff	-0.1	0.1							
B1_6	neg	0.59	0.37	0.03						
	pos	0.22	0.63	0.15						
	diff	-0.37	0.26	0.12						
B1_7	neg	0.99	0.01							
	pos	1	0							
	diff	0.01	-0.01							
B1_8	neg	0.96	0.04							
	pos	0.98	0.02							
	diff	0.02	-0.02							
B1_9	neg	0.32	0.66	0.02						
	pos	0.15	0.8	0.05						
	diff	-0.17	0.14	0.03						

Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
B2_1	neg	0.16	0.1	0.1	0.02	0.03	0.52	0.01	0.03	0.02
	pos	0.02	0.07	0.05	0	0.05	0.8	0	0	0
	diff	-0.14	-0.03	-0.05	-0.02	0.02	0.28	-0.01	-0.03	-0.02
B2_2	neg	0.16	0.11	0.32	0.4	0.01				
	pos	0	0.02	0.46	0.46	0.05				
	diff	-0.16	-0.09	0.14	0.06	0.04				
B2_3	neg	0.16	0.63	0.07	0.14					
	pos	0	0.76	0.17	0.07					
	diff	-0.16	0.13	0.1	-0.07					
B2_4	neg	0.14	0.74	0.03	0.09					
	pos	0	0.95	0.02	0.02					
	diff	-0.14	0.21	-0.01	-0.07					
B2_6	neg	0.16	0.59	0.11	0.13					
	pos	0	0.73	0.17	0.1					
	diff	-0.16	0.14	0.06	-0.03					

Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
B3_1	neg	0.63	0.37							
	pos	0.59	0.41							
	diff	-0.04	0.04							
B3_2	neg	0.16	0.32	0.3	0.08	0.14				
	pos	0.02	0.15	0.34	0.29	0.2				
	diff	-0.14	-0.17	0.04	0.21	0.06				
B3_3	neg	0.04	0.05	0.08	0.74	0.09				
	pos	0.02	0.02	0.02	0.73	0.2				
	diff	-0.02	-0.03	-0.06	-0.01	0.11				
B3_4	neg	0.97	0.03							
	pos	0.83	0.17							
	diff	-0.14	0.14							
B3_5	neg	0.15	0.85							
	pos	0.27	0.73							
	diff	0.12	-0.12							
B3_6	neg	0.46	0.54							
	pos	0.1	0.9							
	diff	-0.36	0.36							
B3_7	neg	0.9	0.1							
	pos	0.76	0.24							
	diff	-0.14	0.14							
B3_8	neg	0.74	0.26							
	pos	0.63	0.37							
	diff	-0.11	0.11							
B3_9	neg	0.99	0.01							
	pos	1	0							
	diff	0.01	-0.01							
B3_10	neg	0.96	0.04							
	pos	0.85	0.15							
	diff	-0.11	0.11							
B3_11	neg	0.93	0.07							
	pos	0.93	0.07							
	diff	0	0							
B3_12	neg	1	0							
	pos	0.8	0.2							
	diff	-0.2	0.2							
B3_13	neg	0.93	0.07							
	pos	0.83	0.17							
	diff	-0.1	0.1							
B3_14	neg	0.47	0.53							
	pos	0.24	0.76							
	diff	-0.23	0.23							

Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
C1_1	neg	0.47	0.53							
	pos	0.17	0.83							
	diff	-0.3	0.3							
C1_2	neg	0.58	0.42							
	pos	0.66	0.34							
	diff	0.08	-0.08							
C1_3	neg	0.53	0.47							
	pos	0.46	0.54							
	diff	-0.07	0.07							
C1_4	neg	0.33	0.37	0.15	0.14					
	pos	0.12	0.29	0.29	0.29					
	diff	-0.21	-0.08	0.14	0.15					
C1_5	neg	0.62	0.3	0.09						
	pos	0.54	0.41	0.05						
	diff	-0.08	0.11	-0.04						
C1_6	neg	0.52	0.37	0.11						
	pos	0.32	0.54	0.15						
	diff	-0.2	0.17	0.04						
C1_7	neg	0.24	0.07	0.69						
	pos	0.1	0	0.9						
	diff	-0.14	-0.07	0.21						
C1_8	neg	0.4	0.43	0.18						
	pos	0.2	0.68	0.12						
	diff	-0.2	0.25	-0.06						
C1_9	neg	0.73	0.22	0.04		0.01				
	pos	0.61	0.39	0		0				
	diff	-0.12	0.17	-0.04		-0.01				

Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
C2_1	neg	0.91	0.09							
	pos	0.76	0.24							
	diff	-0.15	0.15							
C2_2	neg	0.78	0.22							
	pos	0.68	0.32							
	diff	-0.1	0.1							
C2_3	neg	0.62	0.38							
	pos	0.44	0.56							
	diff	-0.18	0.18							
C2_4	neg	0.15	0.69	0.15						
	pos	0.07	0.54	0.39						
	diff	-0.08	-0.15	0.24						
C2_5	neg	0.8	0.2							
	pos	0.9	0.1							
	diff	0.1	-0.1							
C2_6	neg	0.43	0.57							
	pos	0.66	0.34							
	diff	0.23	-0.23							
C2_7	neg	0.65	0.35							
	pos	0.78	0.22							
	diff	0.13	-0.13							
C2_8	neg	0.14	0.67	0.19						
	pos	0.07	0.73	0.2						
	diff	-0.07	0.06	0.01						
C2_9	neg	0.32	0.67	0.01						
	pos	0.27	0.73	0						
	diff	-0.05	0.06	-0.01						
C2_10	neg	0.42	0.49	0.09						
	pos	0.1	0.9	0						
	diff	-0.32	0.41	-0.09						

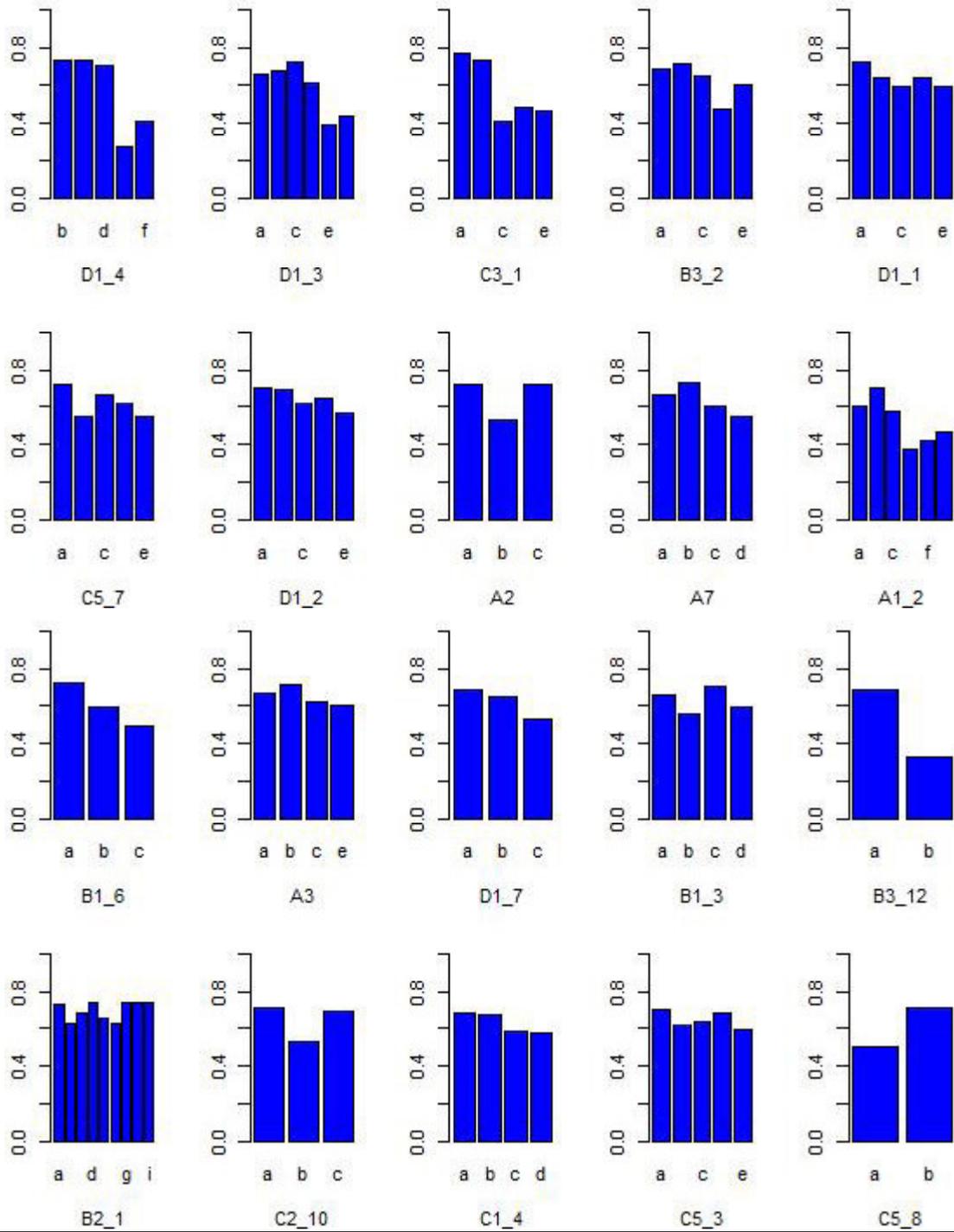
Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
C3_1	neg	0.54	0.13	0.13	0.16	0.03				
	pos	0.15	0.05	0.39	0.29	0.12				
	diff	-0.39	-0.08	0.26	0.13	0.09				
C3_2	neg	0.57	0.34	0.09						
	pos	0.22	0.54	0.24						
	diff	-0.35	0.2	0.15						
C3_3	neg	0.43	0.22	0.35						
	pos	0.12	0.27	0.61						
	diff	-0.31	0.05	0.26						
C3_4	neg	0.69	0.04	0.26						
	pos	0.37	0.05	0.59						
	diff	-0.32	0.01	0.33						
C3_5	neg	0.73	0.27							
	pos	0.41	0.59							
	diff	-0.32	0.32							
C3_6	neg	0.71	0.29							
	pos	0.51	0.49							
	diff	-0.2	0.2							
C3_7	neg	0.37	0.63							
	pos	0.17	0.83							
	diff	-0.2	0.2							
C3_8	neg	0.48	0.46	0	0.05					
	pos	0.39	0.56	0.02	0.02					
	diff	-0.09	0.1	0.02	-0.03					
C3_9	neg	0.73	0.27							
	pos	0.46	0.54							
	diff	-0.27	0.27							
C3_10	neg	0.58	0.33	0.09						
	pos	0.8	0.2	0						
	diff	0.22	-0.13	-0.09						
C3_11	neg	0.49	0.51							
	pos	0.32	0.68							
	diff	-0.17	0.17							
C3_12	neg	0.82	0.13	0.04						
	pos	0.85	0.07	0.07						
	diff	0.03	-0.06	0.03						

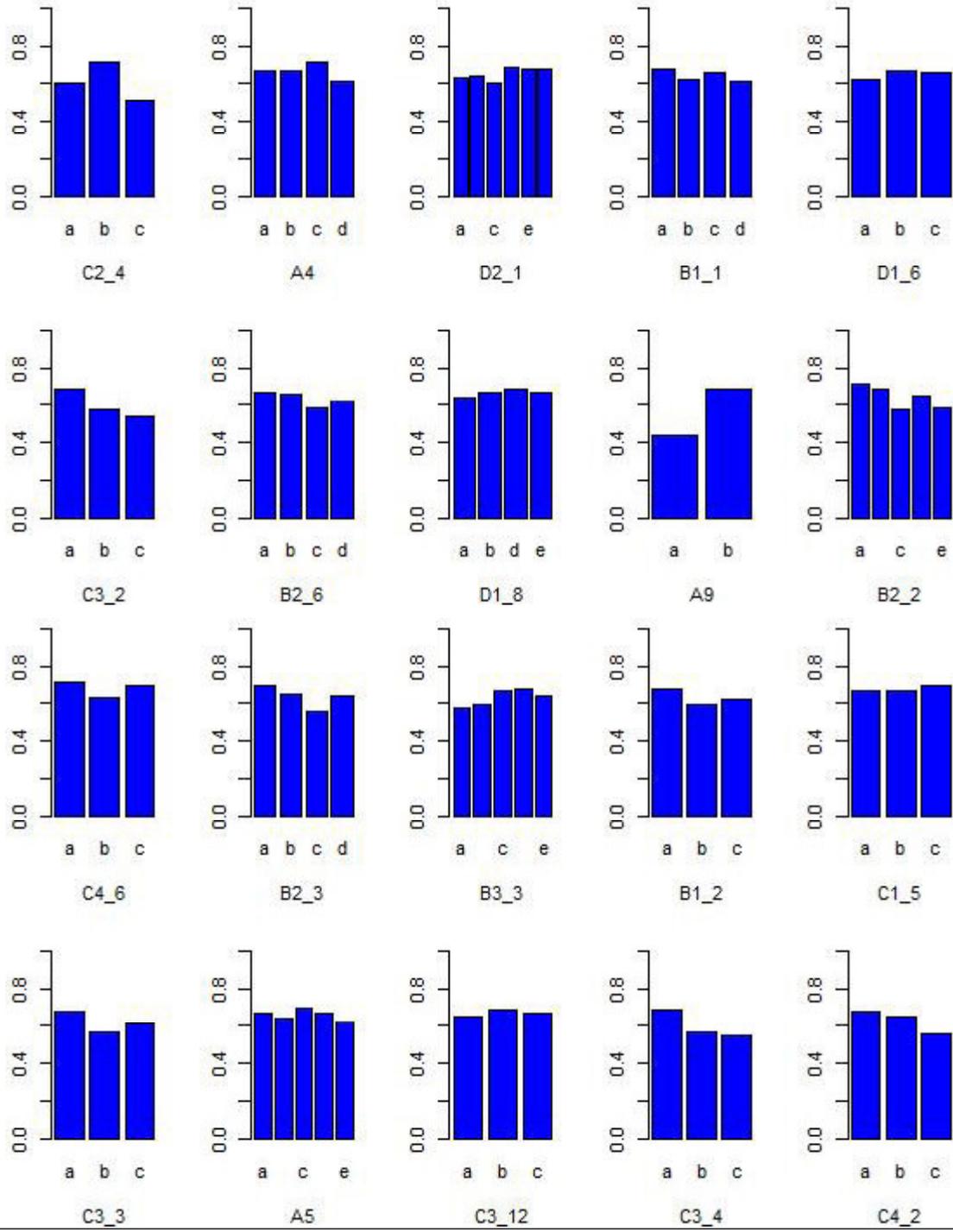
Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
C4_1	neg	0.66	0.34							
	pos	0.44	0.56							
	diff	-0.22	0.22							
C4_2	neg	0.66	0.3	0.04						
	pos	0.44	0.41	0.15						
	diff	-0.22	0.11	0.11						
C4_3	neg	0.45	0.55							
	pos	0.24	0.76							
	diff	-0.21	0.21							
C4_4	neg	0.76	0.24							
	pos	0.66	0.34							
	diff	-0.1	0.1							
C4_5	neg	0.85	0.15							
	pos	0.73	0.27							
	diff	-0.12	0.12							
C4_6	neg	0.43	0.46	0.11						
	pos	0.12	0.78	0.1						
	diff	-0.31	0.32	-0.01						
C4_7	neg	0.82	0.18							
	pos	0.78	0.22							
	diff	-0.04	0.04							
C4_8	neg	0.62	0.38							
	pos	0.46	0.54							
	diff	-0.16	0.16							

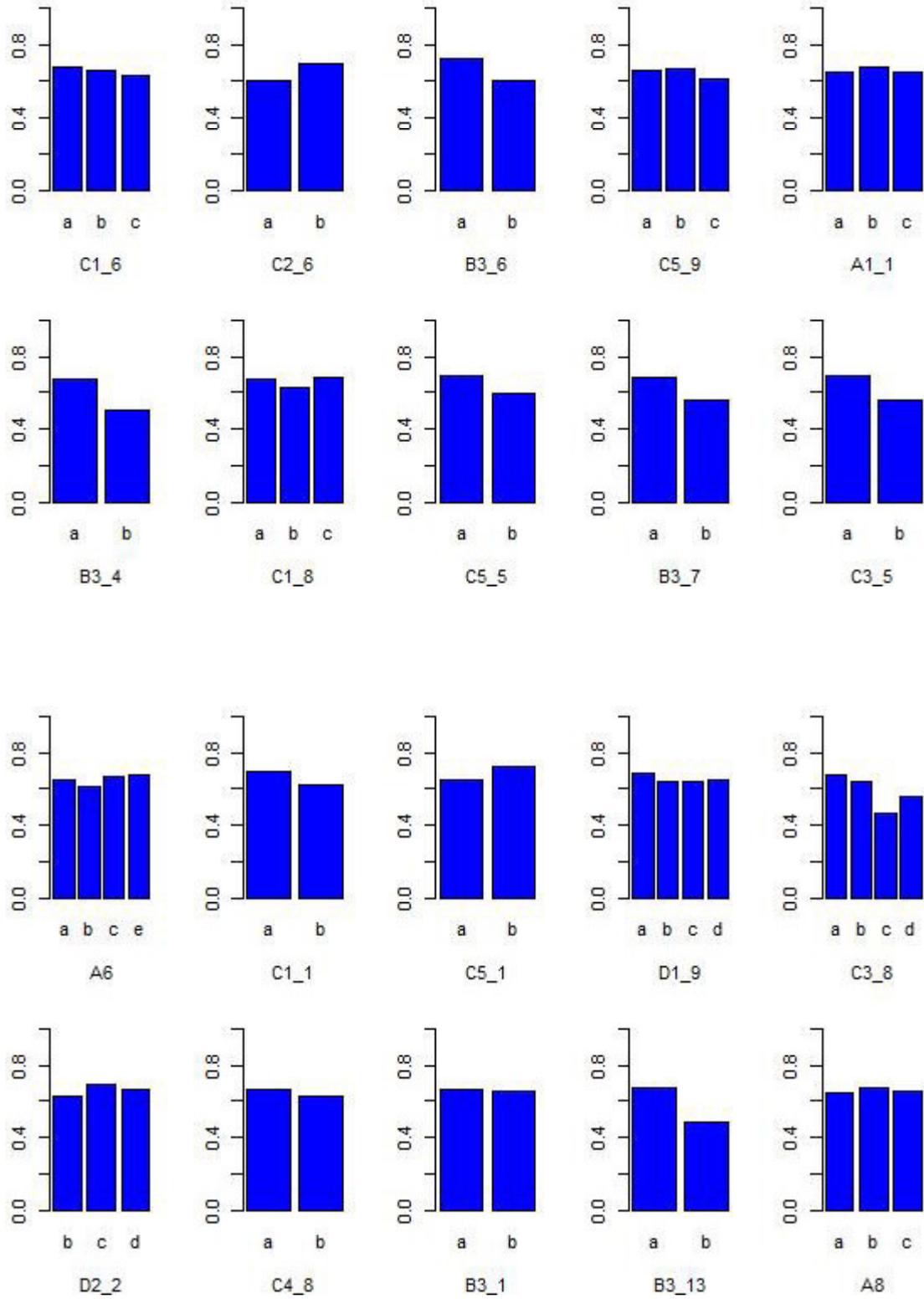
Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
C5_1	neg	0.79	0.21							
	pos	0.83	0.17							
	diff	0.04	-0.04							
C5_2	neg	0.79	0.21							
	pos	0.76	0.24							
	diff	-0.03	0.03							
C5_3	neg	0.43	0.36	0.03	0.04	0.13				
	pos	0.12	0.56	0.02	0.02	0.27				
	diff	-0.31	0.2	-0.01	-0.02	0.14				
C5_4	neg	0.69	0.31							
	pos	0.54	0.46							
	diff	-0.15	0.15							
C5_5	neg	0.6	0.4							
	pos	0.24	0.76							
	diff	-0.36	0.36							
C5_6	neg	0.45	0.55							
	pos	0.22	0.78							
	diff	-0.23	0.23							
C5_7	neg	0.38	0.25	0.12	0.05	0.19				
	pos	0.07	0.39	0.07	0.05	0.41				
	diff	-0.31	0.14	-0.05	0	0.22				
C5_8	neg	0.1	0.9							
	pos	0.37	0.63							
	diff	0.27	-0.27							
C5_9	neg	0.43	0.44	0.13						
	pos	0.56	0.29	0.15						
	diff	0.13	-0.15	0.02						

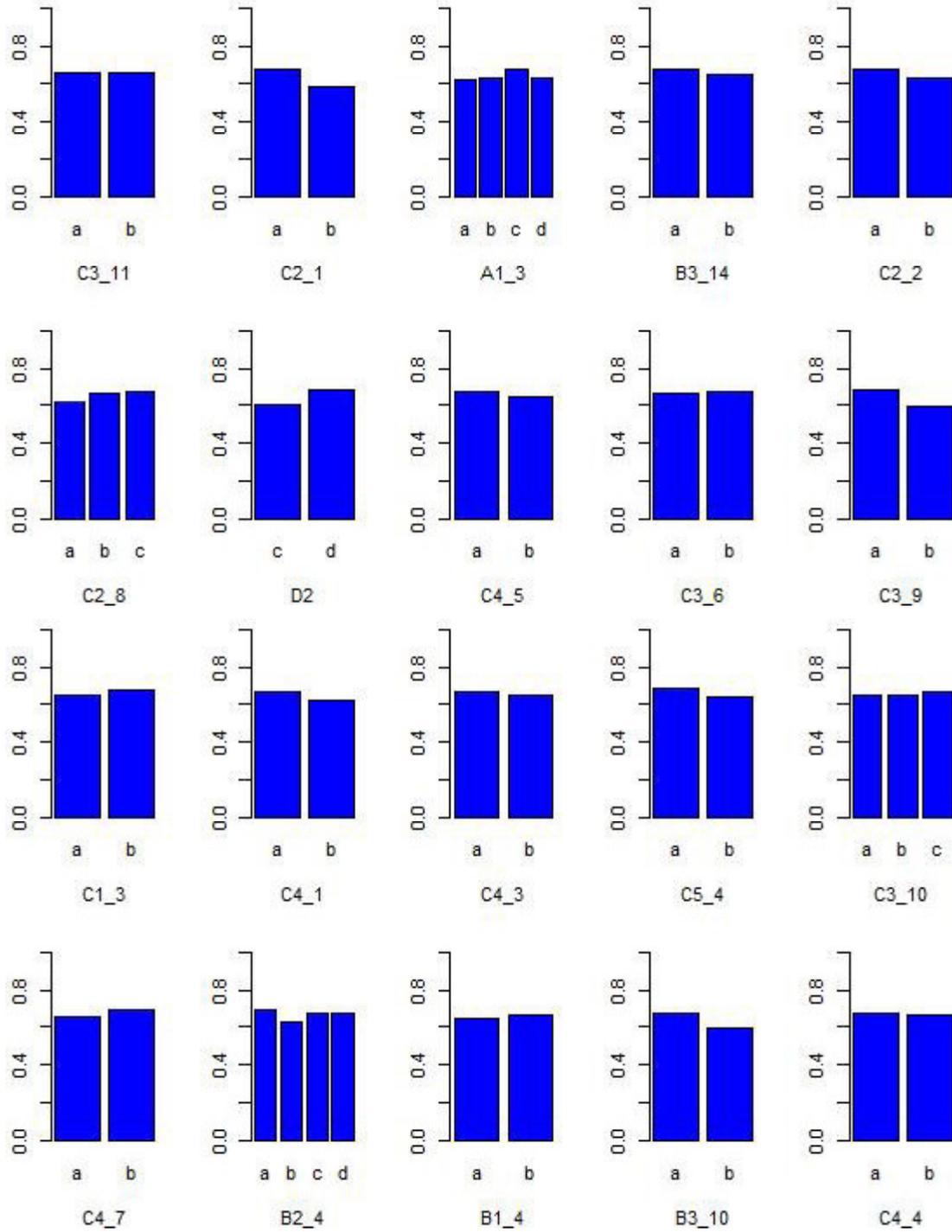
Ques	PRRS	a	b	c	d	e	f	g	h	i
D1_1	neg	0.24	0.22	0.16	0.16	0.21				
	pos	0.05	0.22	0.2	0.15	0.39				
	diff	-0.19	0	0.04	-0.01	0.18				
D1_2	neg	0.2	0.22	0.2	0.16	0.22				
	pos	0.05	0.2	0.2	0.15	0.41				
	diff	-0.15	-0.02	0	-0.01	0.19				
D1_3	neg	0.16	0.31	0.24	0.15	0.07	0.07			
	pos	0.05	0.24	0.12	0.15	0.17	0.27			
	diff	-0.11	-0.07	-0.12	0	0.1	0.2			
D1_4	neg		0.31	0.38	0.21	0.07	0.03			
	pos		0.12	0.24	0.15	0.39	0.1			
	diff		-0.19	-0.14	-0.06	0.32	0.07			
D1_5	neg	0.07	0.93							
	pos	0.2	0.8							
	diff	0.13	-0.13							
D1_6	neg	0.31	0.45	0.24						
	pos	0.29	0.39	0.32						
	diff	-0.02	-0.06	0.08						
D1_7	neg	0.42	0.26	0.32						
	pos	0.27	0.15	0.59						
	diff	-0.15	-0.11	0.27						
D1_8	neg	0.24	0.04		0.19	0.53				
	pos	0.17	0.02		0.22	0.59				
	diff	-0.07	-0.02		0.03	0.06				
D1_9	neg	0.21	0.2	0.48	0.11					
	pos	0.12	0.1	0.76	0.02					
	diff	-0.09	-0.1	0.28	-0.09					
D2	neg			0.2	0.8					
	pos			0.2	0.8					
	diff			0	0					
D2_1	neg	0.12	0.3	0.01	0.01	0.04	0.52			
	pos	0.07	0.27	0.05	0	0.02	0.59			
	diff	-0.05	-0.03	0.04	-0.01	-0.02	0.07			
D2_2	neg		0.35	0.09	0.56					
	pos		0.29	0.07	0.63					
	diff		-0.06	-0.02	0.07					

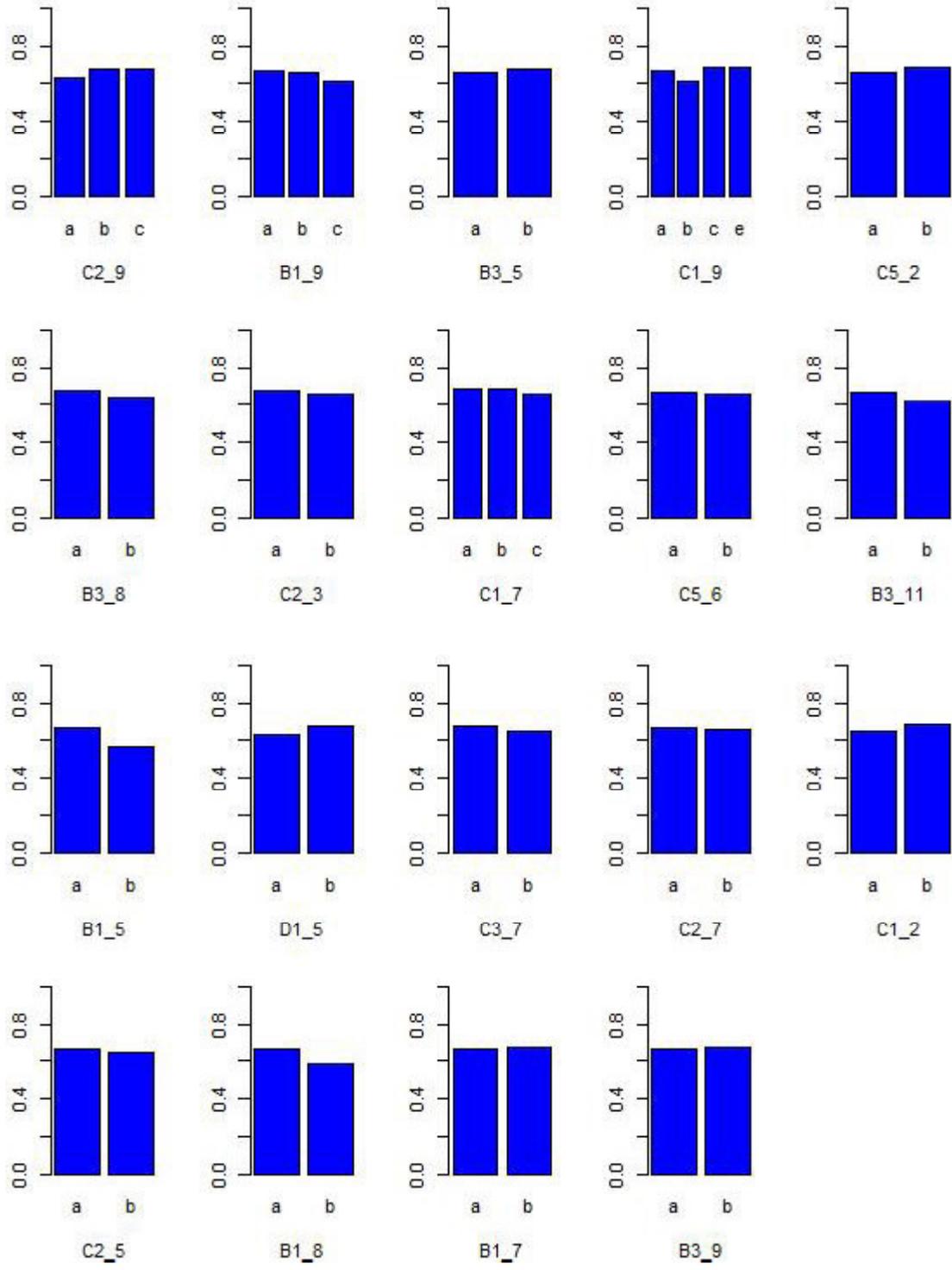
※ Random Forest를 이용한 문항별 선택지별 중요도











다. PRRS 위험도 평가 프로그램과 양돈생산관리프로그램 연계 사업화

(1) 피그플랜 PRRS 위험도 평가 서비스 개시

(가) 피그플랜 사용자가 설문을 통해 PRRS 위험도를 자가진단하고 PRRS 발병을 예측하는 서비스를 개시함

(나) ‘평가모형의 타당성 검증을 위한 양돈장 대상 실증 연구’ 결과를 바탕으로 설문 문항과 가중치를 점진적이고 지속적으로 개선하여, 신뢰성 있고 판별 예측력이 높은 설문 프로그램의 기반 마련



[피그플랜 PRRS 위험도 평가 서비스 배너 등록 및 공지사항 게시]



[피그플랜 PRRS 위험도 평가 서비스 공지 상세내용]

제 3절. PRRSV 감염 억제 천연물 유도체 및 합성물질 개발 및 평가와 현장 적용법 개발

1. PRRSV 치료 후보물질의 합성을 통한 라이브러리 구축 및 효능 평가 (1차년도)

가. 선도물질의 합리적 설계 및 설계된 선도물질의 유도체 합성

(1) 천연물질 검색을 통해 PRRSV 활성 가능 물질을 선별

(가) 항바이러스 효능을 보이는 천연물 기반 화합물의 자료검색 및 화합물 구조 선별

(나) 검색된 화합물을 구조를 기반으로 합성법 설계

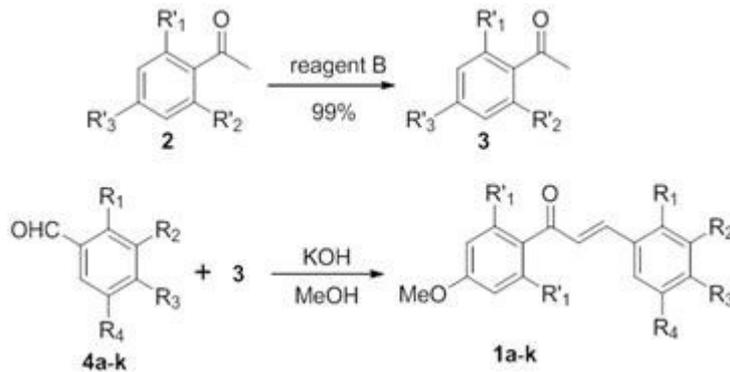


그림 3-1. 선도물질 유도체의 합성

(다) 설계된 화합물 기본구조 합성을 위한 유기합성법 검증

(라) 초기물질 2를 전처리하여 화합물 3을 합성함. 합성된 케톤 화합물 3을 알데하이드 4와 축합반응을 통해 최종 화합물 1a-k를 완성함

(마) 합성된 화합물들은 enone 구조를 가지면 완성된 enone의 C=C 이중결합은 예상되므로 trans C=C 이중결합을 나타냄

(바) 합성된 화합물 1a-k는 MPLC 또는 HPLC를 이용하여 순도 98% 이상으로 정제함

(2) 유기합성법을 이용한 선도물질 유도체 합성

(가) 설계된 선도물질의 합성 및 합성법 정립

(나) 유도체 합성의 중요 반응인 Aldol 축합반응의 최적화를 위해서 다수의 용매 (methanol, ethanol, DCM, water, THF, DMF)를 시도함

(다) 시도한 다수의 용매 중 methanol과 ethanol이 최적의 수율을 나타냄 (54~78%)

(라) 선별된 용매 methanol을 사용하여 산성 촉매 (염산, 황산)와 염기성 촉매 (NaOH, KOH)등을 이용하여 최적의 반응 조건을 검색함.

(마) 산성촉매에 비해 염기성 촉매에서 높은 수율은 화합물을 생성함

(바) 반응 온도 조건의 최적화를 위해 25, 45, 60°C 의 세가지 온도에서 반응을 진행함

(사) 반응을 진행한 25, 45, 60°C 세가지 온도 모두 좋은 수율의 화합물을 생성함

(아) 정립된 합성법을 이용하여 유도체 합성

(자) 아세트 페논 (3)과 벤질알데하이드 (4a-k)를 사용하여 aldol 축합반응을 진행하여 유도체 합성

(차) Aldol 축합반응은 methanol을 용매로 사용하여 염기 촉매하에 반응을 진행시킴

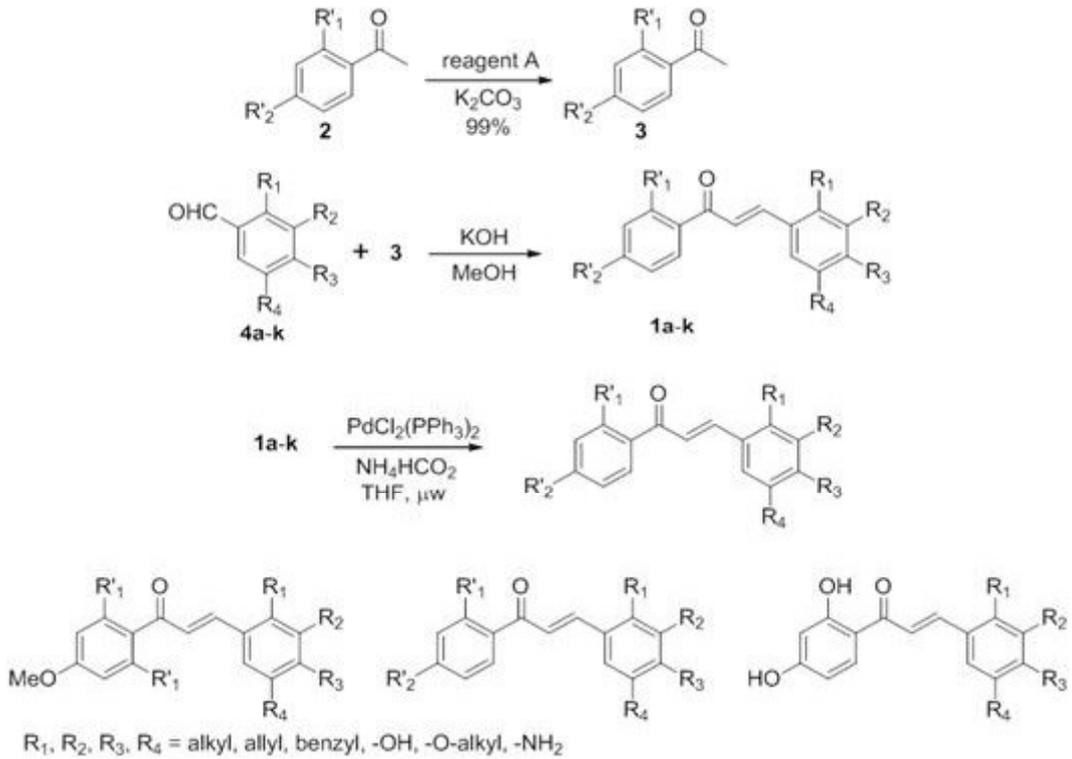


그림 3-2. 선도물질 유도체의 합성 및 합성된 화합물의 기본구조

- (카) 일부 유도체 합성을 위해 보호기 장착과 탈착의 반응을 사용
- (타) 보호기의 탈착반응을 효율을 높이기 위해서 Pd(2) 촉매 하에서 microwave를 조사하여 반응을 진행시킴
- (파) Microwave를 이용한 반응이 오일 반응기에 의한 고온 반응보다 뛰어난 효율을 나타냄

나. PRRSV 치료 후보물질의 합성을 통한 라이브러리 구축

(1) 천연물질을 기반으로한 PRRSV 치료 후보물질 합성

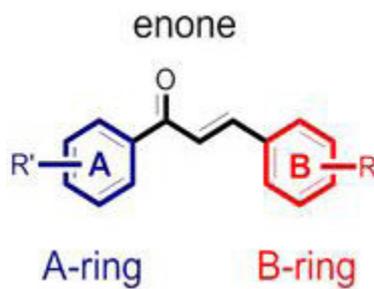


그림 3-3. 구조-활성 관계 구축

- (가) 우수한 PRRSV 치료제 개발을 위해서 구조-활성 관계 (SAR)를 구축

- (나) 개발된 화합물은 benzene을 기반으로 한 A-ring 과 B-ring으로 구성되어 있으며, A-ring 과 B-ring은 enone으로 연결되어 있음
- (다) 우수한 PRRSV 치료제 개발을 위해서 A-ring 과 B-ring의 치환기 (R'와 R)을 다양하게 변화시켜 다수의 화합물 합성
- (라) 구조-활성 관계 (SAR) 분석을 통해서 치환기 (R'와 R)의 변화에 따른 활성의 변화를 연구함
- (마) 구조-활성 관계로부터 A-ring에는 hydrogen bonding을 만들 수 있는 기능기들이 필요함을 확인함
- (바) B-ring에는 지용성을 나타내는 치환기들의 부착이 좋은 활성을 나타냄을 확인함
- (사) 구조-활성 관계 (SAR)를 바탕으로 천연물 유도체 합성 및 anti-PRRSV 화합물 라이브러리 구축
- (아) 설계된 화합물 기본구조 합성을 위한 유기합성법 검증

(2) 합성된 화합물의 고순도 정제

- (가) 합성된 화합물의 고순도 정제를 위해 150g의 silica gel 컬럼을 이용하여 MPLC 분리를 진행함
- (나) 분수물 제거의 위해 Ethyl acetate와 Hexane 이동상의 조성을 최적화 하여 최종 화합물을 정제
- (다) MPLC로 정제가 불가능한 화합물의 경우 HPLC를 이용한 정제를 추가로 진행함
- (라) HPLC의 경우 C18 역상 Prop 컬럼을 이용하여 고순도 정제를 진행함
- (마) HPLC의 경우 이동상을 Methanol (0.1% TFA)과 water(0.1% TFA)을 사용하여 진행함
- (바) 합성된 화합물의 HPLC/MPLC를 이용하여 순도 98% 이상의 정제된 화합물 구축
- (사) H-NMR, 13C-NMR, MS 등의 분석 기술을 이용하여 순도 및 구조 확인

다. 구축된 PRRSV 치료 화합물 라이브러리의 in vitro 효능 평가

(1) 구축된 라이브러리를 이용하여 제1세부 팀과의 협력을 통해 in vitro 효능 평가

- (가) MARC-145 세포주를 이용하여 활성평가 및 효능이 우수한 구조 선별
- (나) 선별된 화합물은 enone 구조를 바탕으로 각각의 말단에 benzene이 연결된 구조를 지님 (그림 3-3)
- (다) 선별된 구조는 플라보카바인, 뷰틴등의 천연물 등이 가지는 기본 구조로 이를 바탕으로 다양한 유도체 합성
- (라) 선별된 기본구조의 효능 향상을 위해 말단의 A-ring과 B-ring에 다양한 치환기를 변화시켜 다수의 화합물 라이브러리 구축
- (마) 활성평가를 바탕으로 선도물질 유도체의 재설계 및 재합성
- (바) Porcine alveolar macrophages(PAM) 세포주를 이용하여 활성평가
- (사) 정밀한 활성평가를 위해 활성을 보이는 화합물의 재합성

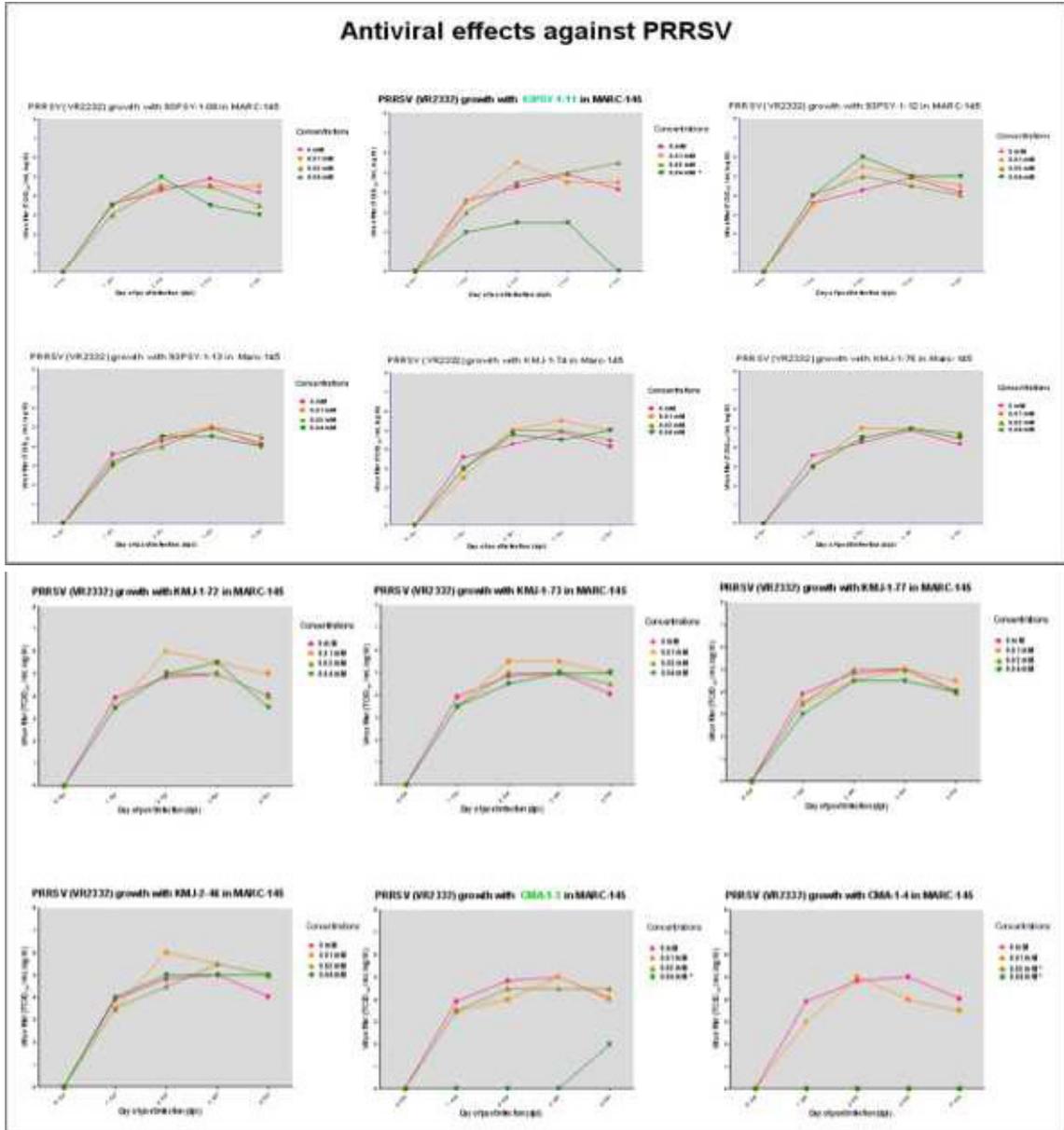
(2) 평가방법

- (가) MARC-145 세포에서 복미형 표준 바이러스 주인 VR2332 바이러스를 검사에 사용함
- (나) 물질은 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8 mg/ml의 농도로 준비하고 배양배지를 사용하여 80 µg/ml로 재차 희석하여 검사에 사용함
- (다) 검사를 위해 희석 물질은 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하여 40, 20, 10, 5, 2.5 µg/ml 농도에서 항바이러스 효능 및 세포독성을 검사함. 이때 2.5 µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함
- (라) VR2332(103 TCID50/ml) 바이러스 배양액 500 µl와 동량의 배양배지로 희석한 후보물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 40C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 배양배지와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함
- (마) 반응이 완료된 혼합액 100 µl를 MARC-145 세포 또는 PAM에 접종하고 37°C에서 1시간 동안 배양함. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 배양배지에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비함. 또한 검사물질 대신 배양배지로 희석한 바이러스만 접종한 양성대조군과 배양배지만 접종한 음성대조군을 같은 방법으로 준비함
- (바) 준비된 배양배지에 희석된 물질 200µl를 검사 well과 물질대조군에 분주하고 5일 동안 관찰함. 양성 및 음성대조군에는 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰함
- (사) 배양 5일 후 상층액을 수거하여 배양배지를 사용하여 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석하고, MARC-145 단층세포가 형성된 96-well plate에 희석배수 당 8-well에 중화된 반응액 100 µl를 접종함
- (아) 접종 후 37°C에서 5일 동안 배양하며, 접종 5일 후 PRRS 바이러스 특이 단클론항체를 이용하여 IFA를 실시한 후 바이러스의 존재유무를 최종 판정함

(3) 평가결과

- (가) 93PSY-1-08, 93PSY-1-11, 93PSY-1-12, 93PSY-1-13, KMJ-1-46, KMJ-1-72, KMJ-1-73, KMJ-1-74, KMJ-1-76, KMJ-1-77, CMA-1-3, CMA-1-4, JJH-2-50, JJH-3-51, JJH-3-52, BSA-1-22, BSA-1-23 및 BSA-1-32 등 총 18종의 합성물질 중 MARC-145에서 PRRSV의 억제효과를 평가하였을 때 93PSY-1-11, CMA-1-3, CMA-1-4, JJH-2-50, JJH-3-52, BSA-1-23 및 BSA-1-32 등 7종의 합성물질들이 0.02 또는 0.04 mM의 농도에서 높은 수준의 항바이러스 효과를 보였다 (그림 3-4).
- (나) 항바이러스 효과가 관찰된 물질들의 항바이러스 효과를 보이는 농도에서 물질 처리 후 24시간까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않아 안전성이 높은 것으로 판단되었다.
- (다) 현재 MARC-145 세포에서 유용한 항바이러스 효능과 안전성을 보인 물질 7종을 PRRSV의 주된 타겟 세포인 PAM 세포주를 이용하여 항바이러스 효능과 세포독

성에 대한 평가가 진행 중이며 93PSY-1-11와 CMA-1-3에 대한 평가가 완료되어 그중 높은 항바이러스 효능과 안전성을 보인 93PSY-1-11가 1차적으로 돼지를 이용한 평가를 위하여 선발되었다 (그림 3-5).



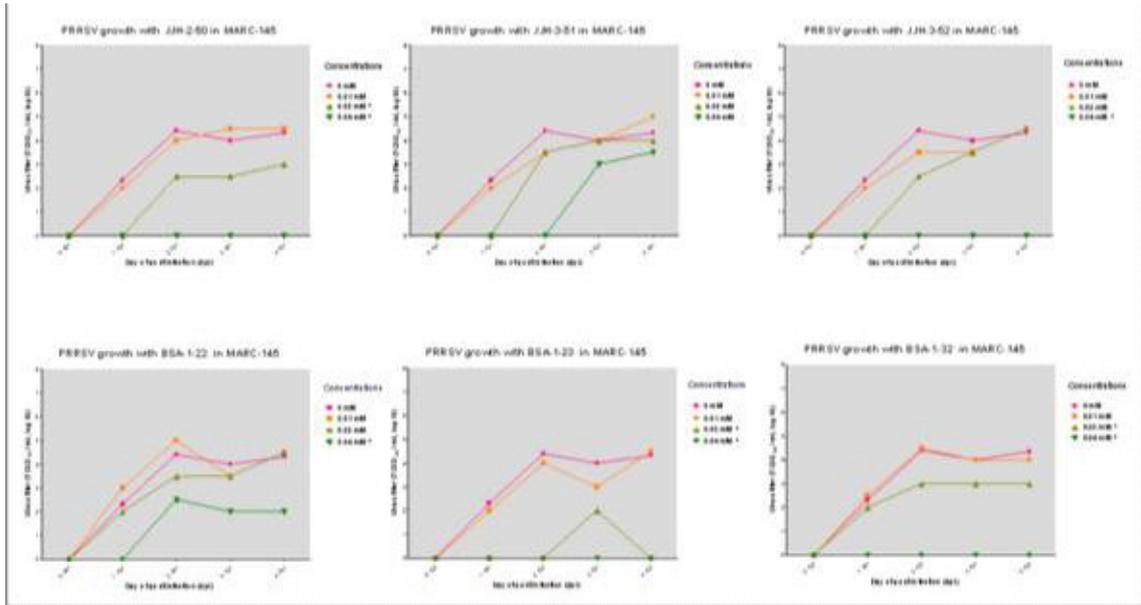


그림 3-4. 천연물질 기반 18종 PRRSV 치료 후보물질의 MARC-145 세포에서 PRRSV에 대한 항바이러스 효능 평가

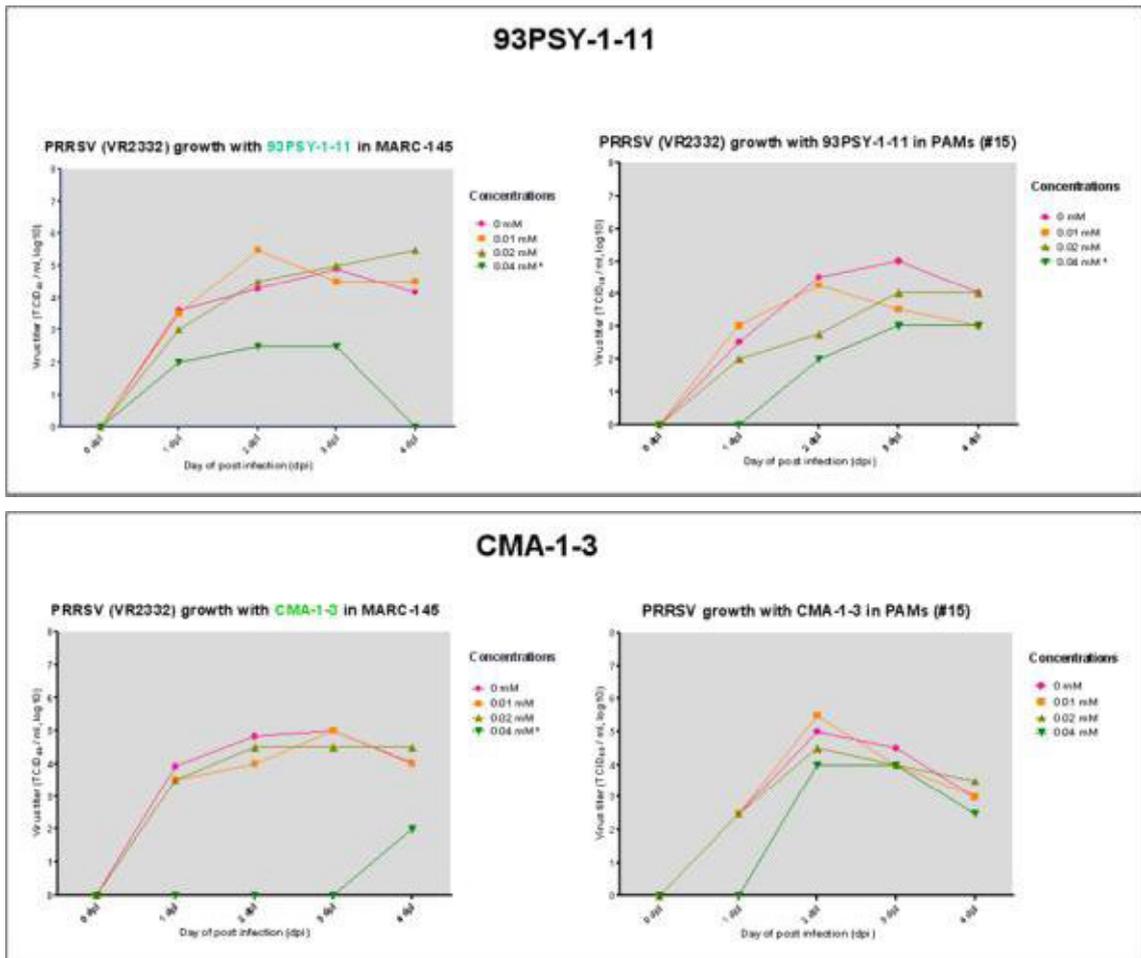


그림 3-5. MARC-145 세포에서 PRRSV에 대한 항바이러스 효능이 탁월한 합성물질의 PAM 세포에서의 효능 평가

라. PRRS 감염억제 물질의 동물 의약품 허가에 준하는 평가 방법 구축

(1) 후보물질의 평가기법 확립

(가) 항 PRRSV 후보물질의 효능 및 안전성 평가는 그림 3-6과 같은 흐름으로 진행한다.



그림 3-6. PRRS 치료 후보 물질의 평가 절차 흐름도

(2) 후보물질의 실험실적 항PRRSV 효능 평가

(가) 바이러스 배양

- ① MARC-145 세포를 배양배지 사용하여 계대 배양함
- ② VR2332 바이러스를 배양하여 TCID₅₀ 역가를 측정함
- ③ 바이러스 역가가 100 TCID₅₀/100 μ l가 되도록 배양배지에 바이러스를 희석하여 검사에 사용함

(나) 물질의 희석

- ① 물질의 희석은 조건에 맞게 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8 mg/ml의 농도로 준비함
- ② 희석한 물질은 배양배지를 사용하여 80 μ g/ml로 재차 희석함
- ③ 희석한 물질을 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하고 40, 20, 10, 5, 2.5 μ g/ml까지 희석하여 검사함. 이때 2.5 μ g/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 μ g/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함

(다) 물질의 반응

- ① 위에서 배양한 바이러스액 500 μ l와 ㉠에서 준비된 동량의 배양배지로 희석한 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 배양배지와 바

이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함

(라) 바이러스 증식여부 판정

- ① 위에서 반응이 완료된 혼합액 100 μ l를 MARC-145 세포 또는 PAM 세포에 접종하고 37°C에서 1시간 동안 배양함. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 배양배지에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비함. 또한 검사물질 대신 배양배지로 희석한 바이러스만 접종한 양성대조군과 배양배지만 접종한 음성대조군을 같은 방법으로 준비함
- ② 앞서 준비된 배양배지에 희석된 물질 200 μ l를 검사 well과 물질대조군에 분주하고 5일 동안 관찰함. 양성 및 음성대조군에는 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰함

(마) 바이러스 역가 측정

- ① 배양 5일 후 상층액을 수거하여 배양배지를 사용하여 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석하고, MARC-145 단층세포가 형성된 96-well plate에 희석배수 당 8-well에 중화된 반응액 100 μ l를 접종함
- ② 접종 후 37°C에서 5일 동안 배양하며, 접종 5일 후 PRRS 바이러스 특이 단클론항체를 이용하여 면역화학염색을 실시한 후 바이러스의 존재유무를 최종 판정함
- ③ Kaeber method에 준해 산정하며, 양성대조군과 비교하여 물질 처리군의 바이러스 감염량의 감소가 확인된 희석농도를 유효농도로 하고, 최종 희석배수는 3반복 시험결과 의 중위수(median)로 함

(바) MARC-145 배지조성

100ml	250ml	500ml	준비 배지량
88ml	220ml	440ml	RPMI1640(Sigma D5796 or equivalent)
10ml	25ml	50ml	Heat-inactivated Fetal Bovine Serum
1ml	2.5ml	5ml	Anti-, Antimycyco(Gibco or equivalent)
1ml	2.5ml	5ml	L-glutamine(Sigma G7513 or equivalent)

(3) 후보물질의 실험실적 독성 평가

(가) 후보물질의 MARC-145와 PAM 세포에서의 세포독성을 평가하였다. 즉, MARC-145 또는 PAM 세포를 위의 항바이러스 효능 평가를 위해 준비된 후보물질이 포함된 배지에 48시간 동안 배양하고 매 12시간 마다 상층액을 수거하여 -80°C에 보관하였다가 모두 함께 MTS assay나 cytotoxicity assay kit (Cytotox-GloTM, Promega)를 이용하여 세포독성을 측정함.

(4) 후보물질의 동물을 이용한 항PRRSV 효능 평가

(가) 사용동물: PRRS 음성인 4주령 자돈을 사용

(나) 후보물질 적용 방법

- ① 근육접종: 생리식염수에 준비한 후보물질을 0, 40, 200, 400 μ g/kg의 농도로 근육

접종한다. 필요에 따라 3회까지 접종한다.

- ② 비강접종: 생리식염수에 준비한 후보물질을 0, 40, 200, 400 µg/kg의 농도로 네블라이저를 이용하여 비강 접종한다. 필요에 따라 3회까지 접종한다.
- ③ 경구투여: 후보물질을 0, 0.4, 2, 4 µg/kg의 농도로 사료에 혼합한 뒤 2주간 급여한다. 필요에 따라 4주까지 급여기간을 조정한다.

(다) 바이러스 접종 및 평가

- ① 바이러스 접종은 현장 상황을 가장 잘 반영할 수 있도록 감염동물에서 전파되는 저농도의 바이러스 감염을 막아내는 효과를 먼저 측정하고 효능이 증명된 물질을 대상으로 고농도의 개체별 바이러스 공격감염에 대한 방어 효능을 측정할 예정이다.
- ② 많은 선행 연구를 통해 병원성과 특성이 잘 분석된 복미형 표준균주인 VR2332를 $10^3\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 농도로 각 그룹의 자돈 5마리당 1마리에 2 ml씩 비강을 통해 접종한다. 접종 전과 후에 매주 채혈을 실시하여 바이러스의 전파와 증식을 분석하고 체중을 측정하여 일당증체율을 측정한다. 바이러스 접종 4주 후에 모든 동물을 안락사 시키고 부검을 실시하여 병리학적 평가를 실시한다.
- ③ 바이러스 전파를 효과적으로 방어해내는 물질을 대상으로 개별 공격감염실험을 진행한다. 즉, VR2332를 $10^3\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 농도로 각 그룹의 모든 자돈에 2 ml씩 비강을 통해 접종한다. 접종 전과 후에 매주 채혈을 실시하여 바이러스의 전파와 증식을 분석하고 체중을 측정하여 일당증체율을 측정한다. 바이러스 접종 4주 후에 모든 동물을 안락사 시키고 부검을 실시하여 병리학적 평가를 실시한다.

(5) 후보물질의 동물을 이용한 독성 평가

(가) 독성검사는 농림수산검역검사본부 고시 제2009-18호에 근거하여 동물용의약품 등 독성시험을 수행함

1) 일반 동물용의약품

① 급성독성시험, 아급성독성시험 및 만성독성시험

㉠ 시험동물 : 동일 검체에 대하여 급성독성시험, 아급성독성시험 및 만성독성시험 실시

㉡ 시험방법

급성독성시험

- 동물 : 2종 이상의 순조로이 발육한 암·수의 동물로 하되, 그 중 1종은 설치류, 1종은 비설치류로 함
- 동물 수 : 설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 5수 이상으로 하고 비설치류는 암·수 각각에 대하여 1군 2수 이상으로 함
- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로를 포함하여 경구 및 비경구 경로함
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 50% 치사량(LD₅₀) 또는 개략의 치사량을 구하기에 충분한 용량단계의 군수를 설정함. 독성이 약하여 치사량을 구할 수 없을 경우에는 기술적으로 투여 가능한 최대량을 최고용량으로 함

- 투여횟수 : 원칙적으로 1회
- 관찰기간 : 경구투여 시에는 2주간 이상, 비경구투여 시에는 1주간 이상으로 함
- 검색방법
 - LD₅₀(설치류) 또는 개략의 치사량(비설치류)을 구함
 - 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 관찰기간 중에 3회 이상 측정함
 - 관찰기간 종료 시(또는 사망 시)에 각 군의 전 예(또는 사망 예)를 부검하여 모든 기관·조직을 육안으로 관찰하고 필요시에는 병리조직학적 검사를 함
- 아급성독성시험
 - 동물 : 1종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 함. 일반적으로 소동물로서는 랫트 또는 마우스가 사용됨
 - 동물 수 : 암·수 각각에 대하여 1군 5수 이상으로 함
 - 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 투여함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있음
 - 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둠. 급성독성시험 또는 예비적인 단기간의 연속투여 시험결과를 참고로 유해반응을 종류와 강도를 명확히 하여 중독량, 최소중독량 및 무독성량(No Observable Adverse Effect Level : NOAEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수로 함. 중독량은 일부의 동물을 치사시키거나 또는 확실한 독성변화가 나타나는 양으로 하고, 최소중독량은 어떤 독성변화가 나타나는 최소량으로 함. 또한 무독성량(NOAEL)은 어느 동물에서도 독성변화가 나타나지 않는 양으로 함. 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체섭취량을 산출함
 - 대조군 : 음성대조는 검체투여 시에 각종 용매, 유효제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 함. 또한 기타 무처리 대조군을 둠
 - 투여기간 : 3주 이상으로 하여 투여는 주 7일로 함
 - 검색방법
 - 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 주 2회 이상 측정함
 - 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 주 2회 이상 측정함
 - 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대하여 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 하고, 검체의 화학구조, 약리작용 및 일반상태로부터 유추하여 적절한 임상검사를 추가함
 - 투여기간 중에 폐사한 예는 부검을 실시하여 기관·조직을 육안으로 관찰하고 필요시에는 병리조직학적 검사를 실시함
 - 투여종료 시의 생존 예에 대해서는 24시간 후에 도살 부검하여 전 예에 대해 기관·조직을 육안으로 관찰하고, 필요시에는 병리조직학적 검사를 함. 또한 도

살 시에 혈액을 채취하여 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사를 함

□ 만성독성시험

- 동물 : 1종 이상의 동일주령으로 순조로이 발육한 암·수의 동물로 함. 일반적으로 소동물로서는 랫트 또는 마우스가 사용됨
- 동물 수 : 암·수 각각에 대해서 1군 10수 이상으로 함. 동물에 큰 부담을 주는 특수검사, 중도 도살 또는 회복시험을 실시하는 경우에는 그에 소요되는 동물 수를 미리 추가함
- 투여경로 : 임상적용 경로 또는 경구투여로 함. 경구투여의 경우 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법 또는 강제투여 방법이 있음
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둠. 아급성독성시험의 결과를 참고로 어떤 독성변화가 나타나는 양 및 무독성량(NOEL)을 구할 수 있는 투여량 및 군수를 결정함. 시료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 사료섭취량 또는 음수량으로부터 검체섭취량을 산출함
- 대조군 : 음성대조는 검체투여 시에 각종 용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 함. 또한 기타 무처리 대조군을 둠
- 투여기간 : 3개월 이상으로 하며, 투여는 주 7일로 함
- 검색방법
 - 각 군의 전 예에 대해서 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함
 - 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료 및 검체 등의 섭취량을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정함
 - 투여기간 중 각 군의 전부 또는 일부의 예에 대해서 1회 이상 뇨검사, 안과적 검사를 하며, 필요시 기타 임상검사를 실시함
 - 투여기간 중의 사망 예에 대해서는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰, 중량측정 및 병리조직학적 검사를 실시함
 - 투여종료 시의 생존 예에 대해서는 도살 부검하여 각 군의 전 예에 대하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 중량을 측정함. 병리조직학적 검사는 원칙적으로 대조군 및 최고용량군의 전 예에 대해 실시하나, 다른 시험군에서 육안적 변화가 인정된 기관·조직이 있는 경우 또는 최고용량군에서 관찰된 변화로부터 고찰할 필요가 있는 경우에는 다른 시험군의 전 예에 대해서도 당해 기관·조직의 병리조직학적 검사를 함

② 생식독성시험

□ 원칙적으로 신 동물용의약품에 대해 「최기형성시험」을 실시함

□ 생식과정에 대해서 영향을 미치는 것이 의심되는 동물용의약품에 대해서는 「1세대 생식독성시험」을 실시함

□ 임신 전부터 이유기까지 걸친 생식과정을 3구분하여 각각을 투여기간으로 하여 「임신 전 및 임신초기 투여시험」 및 「주산기 및 수유기 투여시험」 을 실시함

㉠ 시험동물 : 종 및 계통의 선택에 있어서는 수태능력 등의 생식에 관한 지식, 자연발생 기형의 발생빈도, 생식발생에 악영향을 미치는 것이 확실히 알려져 있는 물질에 대한 감수성 등을 고려함

㉡ 시험방법

□ 최기형성시험

- 동물 : 랫트 또는 마우스 등의 설치류 및 토끼 등의 비설치류에서 각각 선택한 각 1종 이상의 암놈으로 함. 일반적으로는 시험이 비교적 용이하고 일반적인 대사 양식 등이 비교적 알려져 있는 동물종이 사용됨

- 동물 수 : 랫트 또는 마우스에서는 1군 20수 이상, 토끼에서는 1군 8수 이상으로 함

- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여를 원칙으로 하며 강제투여법은 확실하게 일정량을 투여할 수 있다는 점 등에서 사료 또는 음수에 혼입함

- 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둬. 최고용량은 사료섭취량의 저하, 체중 증가의 억제 등 어떤 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 함

- 대조군 : 음성대조를 둬. 또한 필요에 따라 양성대조 또는 비교대조를 둬. 양성대조에는 최기형성을 갖고 있는 것이 확실히 알려져 있는 물질을, 비교대조에는 화학구조 또는 약효가 유사한 기존약물을 사용함

- 투여기간 : 태자의 기관형성 기간에 매일 투여함

- 검색방법

● 시험기간 중 어미에 대하여는 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정함

● 어미는 전 예를 임신말기에 부검하여 황체수, 착상수 및 흡수수와 태자의 사망유무를 조사하고 한편 생존태자에 대하여는 성별, 체중 등의 측정 및 외형이상, 골격 및 내부장기의 기형 등 형태학적 검색을 함. 사망태자에 대하여는 가능한 사망 시기를 추정할 근거가 되는 소견을 기록함. 또한 어미에 대하여는 기관·조직의 육안적 관찰과 필요에 따라 병리조직학적 검사함

□ 1세대 생식독성시험

- 동물 : 설치류 등에서 선택한 1종 이상의 암·수 동물로 함. 일반적으로는 랫트 또는 마우스가 사용됨

- 동물 수 : 1군 20수 이상의 수놈과 임신 말기에서 원칙적으로 1군 20수 이상의 임신 동물을 확보하기 위하여 필요한 암놈으로 함

- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시킴

- 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둬. 최

고용량은 사료섭취량의 저하, 체중증가의 억제 등 어떤 뚜렷한 독성징후가 나타나는 최소량으로 함. 기술적으로 투여 가능한 최대용량에서도 독성징후가 나타나지 않는 경우에는 그 양을 최고용량으로 함. 최저용량은 부모동물, 태자 또는 출생새끼의 어느 것에도 장애가 나타나지 않는 양으로 함. 중간용량(복수인 것도 있음)은 원칙적으로 최고용량과 최저용량의 등비증향으로 함. 용량단계 중에는 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정 임상 상용량과 가까운 용량이 포함되는 것이 좋음

- 대조군 : 음성대조를 둬. 또 필요에 따라서 양성대조 또는 비교대조를 둬
- 투여기간 : 설치류의 경우 암·수 모두 8주령부터 8주간 이상 매일 투여한 후 교배시킴. 교배는 3주간을 한도로 하여 동일한 수놈과 암놈을 1 : 1로 동거시킴. 수놈에 대하여는 교배기간 중에도 연속투여하고, 암놈에 대하여는 교배기간 중, 임신기간 중 및 분만 후 신생자의 이유까지의 기간에 투여를 계속함
- 검색방법
 - 시험기간중 각 군의 전 예에 대하여 그의 생사 및 일반상태를 상세히 매일 관찰하고, 체중 및 사료섭취량을 측정함
 - 교배기간이 종료된 수놈은 도살 부검하여 기관·조직을 육안으로 관찰함. 교미가 성립하지 않은 암·수에 대하여는 그 원인을 조사함. 교미율 및 수태율을 함. 이들은 통상 다음의 산출법에 의함

$\text{교미율} = (\text{교미동물} / \text{동거동물}) \times 100$ $\text{수태율} = (\text{수태동물} / \text{교미동물}) \times 100$

- 각 군의 전 예를 분만포육 시킴. 분만 시에는 분만의 장애나 지연의 징후 등에 대하여 관찰하고, 어미의 수유·포육본능에 대한 영향 등을 조사함. 출산율을 구함. 이는 통상 다음의 산출법에 의함

$\text{출산율} = (\text{생자출산 암놈수} / \text{임신암놈수}) \times 100$
--

- 신생자에 대하여는 산자수, 그의 생사, 성별 및 외표에서의 변화 등을 검색하고 체중을 측정함. 동복생자수를 조절하는 경우에는 생후 비교적 빠른 시기에 어미 한 마리당 수놈과 암놈이 거의 동수가 되도록 일정 마리수를 무작위로 채취하고 여분의 새끼를 도태함. 랫트 또는 마우스에서는 통상 생후 4일령에서 8마리 정도로 함
- 출생자에 대하여는 성장 및 발달과 함께 특이한 증상의 유무나 행동의 이상 등에 관하여 검색함. 출생자에 이상소견이 보인 경우에는 필요에 따라 새로이 유모포육 시험을 실시하여 생후 어느 시기에서의 영향에 의한 것인가를 분석함. 성장 및 발달에 대하여는 형태, 기능 및 행동에 관하여 검색함. 또한 필요에 따라서 다시 장기간 관찰함. 출생으로부터 이유까지의 사이에 출생율, 생존율 및 이유율을 구함. 이들은 통상 다음의 산출법에 의함

$$\text{출생율} = (\text{출산생자수} / \text{착상두수}) \times 100$$

$$4\text{일 생존율} = (\text{생후 4일생자수} / \text{출산생자수}) \times 100$$

$$\text{이유율} = (\text{이유시생자수} / \text{생후 4일의 생자수 또는 도태직후의 생자수}) \times 100$$

- 처치된 어미는 적당한 시기에 부검하여 기관·조직을 육안으로 관찰함

③ 변이원성시험

- 원칙적으로 신 동물용의약품에 대하여 유전자 돌연변이 유발성을 지표로 하는 「세균을 이용하는 복귀변이시험」, 염색체이상 유발성을 지표로 하는 「포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험」 및 「설치류를 이용하는 소핵시험」을 실시함

㉠ 시험방법

- 세균을 이용하는 복귀변이 시험

- 균주 : *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1537, TA 98, TA 100등으로 함
- 용량단계 : 5~6단계의 시험용량을 설정하는 것과 함께 별도로 대조를 둠. 최고용량은 원칙적으로 5mg/plate를 한도로 하고 항균성을 나타내는 약물에서는 항균성을 나타내는 최소량으로 함
- 대조 : 음성 및 양성대조를 둠. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 함. 양성대조로서는 이미 알려진 변이원성 물질(S9mix를 필요로 하지 않는 물질과 필요로 하는 물질)을 사용함
- 대사활성화 : S9mix를 가한 시험과 가하지 않은 시험을 병행하여 실시함. 포유류(통상은 랫트)에 적절한 약물대사 효소계의 유도제를 투여한 후 간장으로부터 S9를 제조함. 이 S9에 보호소 등을 가한 S9mix를 사용함
- 시험방법 : preincubation법을 실시함
- 결과 : 복귀변이 colony수의 실측치와 그의 평균치를 표시(그림 포함)함. 복귀변이 colony수가 음성대조군의 2배 이상이거나 통계학적으로 유의성을 나타낼 때 양성으로 판정함

- 포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상 시험

- 세포 : 포유류의 초대 또는 계대 배양 세포를 사용함. Chinese hamster 섬유아세포(CHL, CHO)등 가능한 한 감수성이 높은 것을 사용하는 것이 바람직함
- 용량단계 : 3단계 이상의 시험용량을 설정함. 최고용량은 세포증식(또는 분열)이 50% 억제되는 농도를 지표로 하여 그 전·후의 용량을 사용함. 세포독성이 인정되지 않는 경우는 10mm상당 또는 5mg/ml 농도를 한도로 함
- 대조 : 음성 및 양성대조를 둠. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 함. 양성대조로서는 이미 알려진 염색체이상 유발물질을 사용함
- 대사활성화 : 적절한 대사활성화 방법을 병용하는 것이 바람직함. 포유류(통상은 랫트)에 적절한 약물대사효소계의 유도제를 투여한 후 간장으로부터 S9 제조함. 이 S9에 보호소 등을 가한 S9mix를 사용함
- 검색방법 : 검체처리 후 적절한 시기에 염색체 표본을 만듦. 농도당 100개의 분열중기상에 대하여 염색체의 형태이상 및 배수성 세포에 대하여 검색함. 형태이

상에서는 염색분체 또는 염색체에서 보이는 구조이상의 종류를 명기함

- 결과 : 염색체이상을 지닌 세포와 출현빈도 또는 세포당 염색체 이상빈도를 표시(그림 포함)함. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량의존적으로 증가하거나, 하나 이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 양성으로 판정함

□ 설치류를 이용하는 소핵시험

- 동물 : 원칙적으로 순계 또는 균일계의 수놈을 사용함. 일반적으로는 마우스가 사용됨
- 동물 수 : 1군 5수 이상으로 함
- 투여경로 : 복강 내, 임상적용경로 또는 경구투여로 함. 경구투여는 원칙적으로 강제투여로 함
- 용량단계 : 3단계 이상의 시험군을 설정함. 최고용량은 체중증가의 억제 등 어떤 독성징후가 나타나는 최소량(대체로 LD₅₀의 1/2)으로 함
- 대조군 : 음성 및 양성대조를 둬. 음성대조는 원칙으로 용매대조로 함. 양성대조로서는 이미 알려진 소핵유발물질을 사용함
- 투여횟수 : 1회 투여를 원칙으로 하며, 필요에 따라 24시간 간격으로 2~5회 연속투여함. 단, 연속투여하는 경우에는 적절한 단일용량을 설정함. 투여용량의 선정이유를 명기함
- 검색방법
 - 검체 투여 후 적절한 시기에 각 군의 전 예를 도살하여 골수도말 표본을 만듦. 표본제작은 일반적으로 검체 투여 후 18~72시간째에 하는 것이 바람직함
 - 원칙적으로 개체당 1,000개의 다염성적혈구에 대하여 소핵의 유무를 검색함. 동시에 전 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도를 구함. 다염성적혈구 대신에 망상적혈구의 빈도를 구함
- 결과 : 소핵을 갖는 다염성적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도 및 전 적혈구에 대한 다염성적혈구의 출현빈도를 표시함. 양성결과가 얻어진 경우에는 용량 의존성 대하여 그림으로 나타냄. 소핵을 가진 다염성적혈구의 수가 통계학적으로 유의성있게 용량 의존적으로 증가하거나, 하나이상의 용량단계에서 재현성있게 양성반응을 나타내는 경우 양성으로 판정함

④ 암원성 시험

□ 원칙적으로 다음의 어느 것에 의해 암원성이 의심되는 경우에는 암원성 시험을 실시함

- 화학구조 또는 약리작용
- 독성시험의 결과
- 기타

㉠ 시험동물

- 종 및 계통의 선택에 있어서는 감염성 질환에 대한 저항성, 수명, 자연발생 종양

의 발생빈도, 이미 알려진 암원성물질에 대한 감수성 등을 고려함

- 동일 검체에 대하여 암원성 예비시험 및 암원성 시험을 실시하는 경우에는 동일한 종 및 계통의 동물을 사용함

㉠ 시험방법

- 동물 : 2종 이상의 암·수 동물로 한다. 또 동일주령으로 순조로이 발육한 6주령까지의 동물을 사용함. 일반적으로는 랫트, 마우스 또는 햄스터가 사용됨. 이유 후 가능한 빠른 시기에 개시함
- 동물 수 : 암·수 각각에 대하여 1군 50수 이상으로 함. 각 군에의 동물의 배치에는 체중층별 등에 의한 적절한 무작위 추출법을 사용함
- 투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시킴. 검체를 사료에 혼입하여 투여하는 경우에는 검체농도는 최고 5%까지로 함
- 용량단계 : 암·수 각각에 대하여 3단계 이상의 시험군을 설정하는 것과 함께 별도로 대조군을 둬. 고용량은 독성증상을 나타내는 양으로서 동물이 장기 생존 가능하다고 생각되는 최대량으로 하고, 최저용량은 원칙으로 당해 사용동물에서 약리효과가 나타나는 양 또는 추정임상용량을 감안하여 설정함. 중간용량은 최고용량과 최저용량과의 등비중항을 취하는 것이 바람직함. 일반적으로는 최저용량은 최고용량의 10% 이상인 것이 바람직함. 단, 최저용량과 추정임상용량이 현저하게 떨어져 있는 경우에는 최고용량의 10% 미만의 용량을 별도로 설정함. 검체를 사료 또는 음수에 혼입하여 투여하는 경우에는 투여기간 중 개별 또는 군마다 사료섭취량 또는 음수량을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이상 측정하여 검체섭취량을 산출함. 또 시험 개시 전 및 시험 중에 필요에 따라 검체의 순도, 안정성 및 불순물을 가능한 한 정성적 또는 정량적으로 분석함
- 대조군 : 음성대조를 둬. 음성대조는 검체투여 시에 각종용매, 유화제 등을 필요로 하는 경우에는 그것만을 투여하는 군으로 함. 또한 기타 무처리 대조군을 둬
- 투여기간 : 랫트에서는 24개월 이상 30개월 이내, 마우스 및 햄스터에서는 18개월 이상 24개월 이내로 하고, 투여는 원칙적으로 주 7일로 함. 강제투여의 경우 주 5일 이상의 투여도 용인됨
- 시험기간 : 투여종료 시 또는 투여종료 후 1~3개월까지로 함. 단, 시험의 최장기간은 랫트에서는 30개월, 마우스 및 햄스터에서는 24개월로 하고, 최저용량군 또는 대조군의 누적 사망률이 75%가 되는 경우에는 그 시점에서 생존 예를 도살하여 시험을 종료함. 종양 이외의 원인에 의한 사망률이 투여 개시 후 랫트에서는 24개월, 마우스 및 햄스터에서는 18개월의 시점에서 50% 이내일 것이 요구됨
- 검색방법
 - 각 군의 전 예에 대하여 일반상태를 상세히 매일 관찰하고 체중을 투여개시 후 1개월까지는 주 2회 이상, 그 후 2개월간은 주 1회 이상, 그 후는 4주에 1회 이

상 측정함

- 시험기간 중의 사망 예에 대하여는 빨리 부검하여 기관·조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검사를 실시함. 병리조직학적 검사는 다음의 기관·조직에 대하여 실시함. [피부유선, 임파절, 타액선, 흉골, 추골 또는 대퇴골(골수를 포함), 흉선, 기관·폐 및 기관지, 심장, 갑상선 및 상피소체, 혀, 식도, 위 및 십이지장, 소장, 대장, 간장, 췌장, 비장, 신장, 부신, 방광, 정낭, 전립선, 정소, 난소, 자궁, 질, 안구, 뇌, 하수체, 척수, 기타 육안으로 종양성 병변이 인정된 기관·조직] 종양성 병변의 기재 시에는 종양발생에 이르는 각종변화(전암병변)의 소견도 부가할 필요가 있음
- 시험기간 중에 죽음이 임박한 예에 대하여는 빨리 격리 또는 도살 부검하여, 위와 같이 기관·조직의 육안적 관찰 및 병리조직학적 검색을 함. 또 도살시 필요에 따라 혈액을 채취하여 말초혈액의 적혈구 수 및 백혈구 수를 측정하는 것과 함께 도말표본을 만들어 빈혈, 임파절, 간장, 비장의 종대 등 혈액질환을 예상시키는 예에 대하여는 도말표본을 검사함
- 시험 종료 시의 생존 예는 빨리 부검하여 각 군의 전 예에 대하여 위와 같이 기관·조직을 육안으로 관찰함

⑤ 미생물학적 독성시험

- 원칙적으로 다음의 것에 모두 해당되는 경우에는 시험관내 또는 생체내에서 미생물학적 독성을 지표로 하는 ㉠ 장점막 균집락 방어벽교란성시험, ㉡ 내성유발성시험 또는 ㉢ 대사능이상시험을 실시함. 공시물질의 항균작용의 특징 등에 따라 시험해야 할 미생물학적 독성지표를 결정할 수 있으며 관련된 정보가 없는 경우 원칙적으로 장점막 균집락 방어벽교란성시험과 내성유발성시험 및 대사능이상시험을 실시함

⑥ 국소독성시험

- 원칙적으로 동물용의약품의 특성에 따라 우발적으로 또는 의도적으로 사람 및 동물의 피부 또는 점막에 접촉가능성이 있는 경우 백색토끼를 이용한 피부자극성시험을 실시함. 또한 접촉가능부위 및 다른 독성시험 결과로부터 필요하다고 인정되는 경우에 안점막자극성시험 등을 추가하여 실시함

㉠ 시험방법

□ 피부자극성시험

- 동물 : 원칙적으로 4개월령의 건강한 암컷 백색토끼가 사용됨
- 동물 수 : 원칙적으로 3마리 이상의 동물을 사용함. 단, 부식성이 의심되는 물질의 경우 우선 1마리의 토끼를 사용하여 시험을 수행하여 피부부식성이 나타나는 경우는 더 이상의 시험을 수행하지 않으며 의심되는 경우는 2마리의 토끼를 이용하여 추가시험을 수행함
- 투여량 : 시험물질이 액상인 경우는 일반적으로 0.5ml 그리고 고형상이거나 분말인 경우는 0.5g을 검체로 함. 이때 고형상인 경우 분쇄하여 증류수 또는 피부에

무해한 적절한 용매에 습윤시켜 균일하게 적용함

- 투여부위 : 약 24시간 전에 미리 등 부위의 털을 깎아 상처가 없는 것을 확인하고, 등 부위의 6cm²의 비찰과 피부 2개소 및 찰과 피부 2개소로 함
- 투여방법 : 6cm²의 비찰과 피부 및 찰과 피부 각 1개소에 시험물질을 적용한 후 거즈로 덮고, 테이프로 고정된 다음 시험물질의 증발을 막기 위해 침투성 및 반응성이 없는 고탄재질의 박지 등으로 덮은 후에 비자극성 테이프를 사용하여 고정함. 나머지 6cm²의 비찰과 피부 및 찰과 피부 각 1개소는 대조구획으로 생리 식염수나 거즈 등을 동일한 방법으로 적용함
- 투여기간 : 원칙적으로 4시간동안 적용한 후 거즈를 제거한 후 투여부위에 시험물질이 남아 있지 않도록 증류수나 식염수로 가볍게 씻어냄
- 관찰기간 : 시험물질을 증류수나 식염수로 세척하여 제거한 후 홍반과 부종의 정도 등 피부반응을 24, 48, 72시간에 관찰하여 찰과 및 비찰과 부위의 피부반응을 대조구획과 비교하여 관찰함
- 검색방법
 - 개별동물의 찰과 및 비찰과 부위의 피부 반응을 평가 등급표(표 1)에 의해 점수화함. 각 관찰 시기별로 모든 투여동물의 홍반 및 부종 점수를 더해서 그 평균값을 일차피부자극지수로 함
 - 시험물질에 대한 자극성은 가장 높은 일차피부자극지수를 가지고 표 2에 의해 구분하여 평가함. 이때 시험물질의 자극성은 일차피부자극지수 외에도 시험기간 중에 관찰된 임상증상 등을 고려하여 평가하여야 함

표 1. 피부반응의 평가 등급표

홍반과 가피형성	등급
홍반이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
분명한 홍반	2
중등도 및 심한 홍반	3
심한 홍반(홍당무색의 발적)과 가피형성으로 홍반의 관찰이 어려움	4
부종 형성	등급
부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 부종(육안으로 겨우 식별할 정도)	1
가벼운 부종(뚜렷하게 부어 올라서 변연부가 분명히 구별될 경우)	2
보통의 부종(약 1mm 정도 부어 올랐을 경우)	3
심한 부종(1mm 이상 부어오르고 노출부위 밖에까지 확장된 상태)	4

표 2. 피부자극성 판정 지표

일차피부자극지수	분 류
0.0~0.5	비자극성
0.6~2.0	약한 자극성
2.1~5.0	중등도 자극성
5.1~8.0	강한 자극성

⑦ 면역계이상시험

아급성·만성 독성시험 결과 면역반응이상이 의심되거나 생체내에서 항원으로 작용할 수 있는 경우에 면역계에 미치는 영향을 검사하는 시험으로서 이에 는 면역 독성시험, 항원성시험, 피부감작성시험이 있음. 피부감작성시험의 경우 기니픽을 이용한 피부감작성시험 또는 마우스를 이용한 국소임파절중식성시험 및 기타 피부감작성시험 등을 포함함

㉠ 면역독성시험

시험동물 : 병원체 및 기생충 등 특정병원체 부재(SPF) 마우스 또는 랫트로서 암컷과 수컷 중 시험물질에 대하여 좀 더 예민한 반응이 예상되는 하나의 성을 선택할 수 있음. 암컷을 사용하는 경우에는 임신이 되지 않은 상태이며 출산경험이 없는 동물을 사용함. 어리고 건강한 동물을 선택하며 체중은 시험개시 시점 평균체중 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 함. 투여는 6~8주령에 개시함

동물 수

- 시험물질 투여군은 원칙적으로 1군당 10수 이상으로 하며 각 면역독성 지표에 대한 대조군에도 10수 이상의 동물을 사용함
- 대조군에는 용매대조군, 무처치군, 양성대조군을 둠. 용매대조군에는 면역독성의 회복성, 지속성 또는 지발성 시험을 추가적으로 시행하는 경우를 대비하여 충분한 수의 동물을 배치함. 용매의 독성이 불확실한 경우에는 무처치군을 배치함. 양성대조군에는 최소한 5수 이상을 두며 기히 확인된 면역억제제를 선택하여 면역독성이 확실히 유발되는 용량으로 투여함
- 위성군(Satellite group)에는 20수 이상의 시험동물을 배치하며 시험물질 고용량 투여군과 동일 용량으로 하여 30일간 투여한 후 이후 최소 30일간 면역독성의 회복성, 지속성 또는 지발성 등을 관찰함

투여경로 : 원칙적으로 임상적용 경로를 포함하여 경구 및 비경구 경로로 투여함. 임상적용 경로가 특수하여 시험동물에서의 실시가 불가능한 경우에는 다른 적절한 경로로 함. 경구투여의 경우에는 강제투여 또는 사료나 음수에 혼입하여 자유로이 섭취시키는 방법이 있음

용량설정 : 용량-반응성을 확인하고 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)을 구할 수 있도록 최소 3단계 이상의 용량 시험군을 두며 이와 함께 별도의 대조군을 둠. 최고용량은 유의한 수준의 스트레스, 영양결핍 및 치사를 유발

하지 않으나 측정 가능한 수준의 일반 독성을 유발하는 양으로 함. 최저용량은 어떤 면역독성이 나타나지 않는 양으로 함

- 투여기간 : 최소 30일 이상으로 하며 투여는 주 7일로 함
- 관찰기간 : 시험동물의 관찰은 최소 30일 이상으로서 투여기간 내내 이루어짐. 위성군의 경우 투여중지 후 30일간 회복성 또는 지속성 또는 지발성을 관찰함
- 검색방법
 - 임상증상 검사 : 시험물질 투여기간 동안 각 시험동물에 대하여 최소 1일 1회 이상 관찰하여 특이적인 임상증상이 관찰되면 기록함. 기록사항으로는 증상발현 시기, 증상의 심한 정도 및 지속기간을 포함하며 다음의 항목을 주요 관찰대상으로 함
 - 피부 및 피모
 - 안구 및 점막
 - 호흡기계
 - 자율신경계 및 중추신경계 관련 이상
 - 순환계 이상
 - 운동성
 - 행동양식
 - 감염 저항성
 - 사료 및 음수 섭취량은 매주 확인함
 - 체중 측정은 투여 전, 투여 후 매주 및 시험종료 시에 실시함
 - 빈사 상태의 시험동물은 발견 즉시 안락사를 시행하며, 부검은 빈사 상태의 시험동물과 시험기간 중 폐사한 동물 전체에 대하여 시행함
 - 혈액학적, 생화학적 검사 : 다음의 항목은 각 용량군 및 대조군에서 10수에 대하여 검사하며 시험동물은 부검 전날 밤에 절식함
 - 혈액학적 검사 : 헤마토크리트치, 헤모글로빈 농도, 적혈구수, 총 백혈구수 및 감별 백혈구수, 혈소판수 등을 포함하여 검사함
 - 혈액화학적 검사 : 혈당, GPT(Serum glutamic-pyruvic transaminase 또는 alanine amino transaminase, ALT), 요소질소, 알부민, 총혈청단백, 면역글로블린, cytokine(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , MIP-1 β , TNF- α 등) 등을 포함하여 검사함
 - 장기 육안검사 : 부검 직전 체중을 측정하며 장기를 채취하여 중량을 측정함. 흉선과 비장의 경우 적출 즉시 습윤상태에서 장기중량을 측정하며 기타 장기에 대해서도 건조되지 않도록 주의함
 - 조직병리 검사 : 각 용량시험군 및 대조군 10수에 대하여 조직병리 검사를 수행함. 육안소견에서 이상이 관찰된 장기에 대하여 조직병리 검사를 실시하며 특이적 및 비특이적 세포매개성 면역반응이상으로 인한 면역계 이상이 관찰되면 흉선, 비장, 간장, 폐장, 신장, 골수(대퇴골, 흉골, 늑골 늑연골 부위 중 선택), 임파절(점막연관 및 변연부), 부신, 송과선, 난소 또는 고환에 대하여 병리조직학적

검사를 실시함. 조직병리검사대상 장기를 채취하여 조직병리검사가 가능하도록 적정 고정액에 보관함

- 비장, 흉선 및 골수에서의 세포수(cellularity) 및 세포 생존율(cell viability)은 각 용량군 및 대조군에서 최소 10수에서 측정함
- 면역독성 검사 : 면역독성 검사에는 체액성 면역시험과 특이적 및 비특이적 세포 매개성 면역시험이 있으며 이들에 대하여 각 1종 이상의 시험을 실시함. 필요시 추가적인 2단계 면역독성시험을 실시함

- 체액성 면역시험 : 시험물질이 체액성 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 항원 접종 후 항체 플라그-형성 세포 검사(Antibody plaque-forming cell assay) 또는 면역글로불린 역가 시험을 실시함

(a) 항체 플라그-형성 세포 검사(Antibody plaque-forming cell assay) :

시험물질을 30일간 투여한 후 비장으로부터 채취한 항체형성세포에 대한 시험물질의 영향을 검사함

- ① 시험에 사용하는 시험동물의 종 및 계통에 따라 플라그-형성 세포의 적정 생성시기를 결정함. 30일간의 시험물질 투여가 비장의 항체 생성세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 T세포 의존성 항원인 양적혈구(Sheep red blood cells; SRBC)를 시험물질 투여 개시일로부터 26일째에 정맥내로 투여함

- ② 새로운 보체가 사용될 때 마다 이의 활성도를 확인함

- ③ 본 시험의 민감도를 검증하기 위하여 기히 알려져 있는 면역억제제(예, 싸이클로포스파미드 등)를 처치한 양성대조군을 둠

- ④ 비장 세포 생존율 및 플라그-형성 세포수를 검사함

(b) 면역글로불린 정량검사(Immunoglobulin quantification) :

시험물질을 30일간 투여하면서 시험물질이 항원에 대한 항체의 반응성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시험동물에 적절한 흉선 의존성 항원을 감각시킨 후 적절한 시점에 항원을 2차 접종함. 시험동물에서 혈청을 채취하여 면역글로불린(IgG 및 IgM) 역가를 검사함. 면역글로불린 검사는 충분한 빈도로 시행하여 시험군과 대조군에서 1차 및 2차 항체반응성에 대한 비교가 적절히 이루어 질 수 있도록 함. 최종 면역글로불린(IgG 및 IgM) 역가 측정은 시험물질 투여 30일이 경과한 후에 시행함

- 특이 세포 매개성 면역시험 : 시험물질을 30일간 투여한 후 아래의 3종의 시험 중 1종 이상을 선택하여 실시함

(a) 일원 혼합 임파구 배양 검사(One-way mixed lymphocyte culture assay; MLC) :

30일간 시험물질을 시험동물에 투여한 후 시험동물과 동종이면서 다른 개체 유래 임파구(allogeneic lymphocytes)에 의해 유도되는 임파구 발생(lymphocyte blastogenesis)을 검사함. 임파구 발생정도를 알기 위하여 방사선 표지물질(주로 ^3H -thymidine)이 DNA내로 합성되어 표지된 양을 측정하

며 검사 시 주의할 점은 다음과 같음

- ㉔ 차단되지 않은 반응세포(unblocked responder cells)는 대조군 및 시험군 시험동물의 비장으로부터 무균적으로 채취함
- ㉕ 자극유도세포(stimulator cells)는 동종의 무처치 시험동물의 비장으로부터 무균적으로 채취하며 마이토마이신 C 또는 X방사선을 처리하여 DNA 합성을 차단함
- ㉖ 반응세포(responder cells)와 자극세포(stimulators)의 생존율을 조사함
- ㉗ 자극세포(stimulator cells)의 반응성이 없음을 확인하거나 무처치 세포의 DNA합성 수준(baseline levels)을 알고 세포채취 기술의 효율성을 확인하기 위하여 3반복 또는 4반복 수준의 시험법 대조군이 필요함
- ㉘ 완전무처치 또는 용매대조군에 대해서도 검사를 실시함
- ㉙ 임파구발생(lymphocytes blastogenesis) 검사결과는 반응세포(responder cells)와 자극세포(stimulator cells)를 함께 최대 4일간 배양한 후 반응세포(responder cells)에서의 방사선표시 정도를 검사함으로써 얻어짐. 결과는 nCPM 값으로 표시하는데 이는 자극세포와 반응세포의 총 CPM 평균값에서 자극세포가 없이 배양된 세포의 총 CPM 평균값(baseline level)을 뺀 값을 의미함. 아울러, 시험물질 처치군과 대조군과의 차이정도는 $\{1 - (\text{처치군의 nCPM} / \text{대조군의 nCPM})\} \times 100$ 으로 표시함
- ㉚ 본 검사의 민감도를 확인하기 위하여 적합한 면역억제제를 처치한 양성대조군이 필요함

(b) 지발성 과민반응시험(Delayed-type hypersensitivity reaction; DTH) :

일반적으로 시험물질을 30일간 투여하면서 시험동물에 1종의 흥선-의존성 항원을 감작시키고 이후 동일 항원으로 공격접종함. 공격접종 후 24~48시간에 시험군과 대조군에서 지발성 과민반응 정도를 비교함

- ㉛ 면역유발 및 공격접종 물질의 종류, 면역유발물질 접종횟수 및 접종경로, 공격접종시기 및 동위원소 사용여부 등을 결정할 때는 선택한 시험동물에서 DTH 반응이 충분히 양호하게 발현될 수 있는 조건으로 함. 본 검사는 최소 30일간 시험물질을 투여한 후 실시함

(c) Cytotoxic T-임파구 검사(Cytotoxic T-lymphocyte assay; CTL) :

Cytotoxic T-임파구를 유도하기 위해 동종의 타개체 유래 종양세포를 사용함. 처치군 및 대조군에서 비장세포(effector cells)를 채취하여 ^{51}Cr 이 표지된 동종의 타개체 유래 종양세포(target cells)와 함께 배양함. 4시간동안 효능세포(effector cells)와 표적세포를 함께 배양한 후 표적세포(target cells)로부터 방출된 방사선량은 T-임파구의 세포용해성의 지표가 된다. 본 검사시 주의할 점은 다음과 같음

- ㉜ 적합한 시험결과를 얻기 위해서는 효능세포(effector cells) 부재시 표적세포(target cells)에서 자발적으로 방출되는 방사선량과 표지 표적세포의 총 방출량을 측정할 수 있는 시험법 대조군이 필요함

⑥ 시험에 사용되는 시험동물의 cytotoxic T-임파구 생성가능 여부를 확인하고 검사법의 적합성을 확인함

- 비특이적 세포매개성 면역시험 : 시험물질을 30일간 시험동물에 투여한 후 비특이적 세포매개성 면역반응을 알기위해서 자연살해세포의 활성화도 검사, 대식세포 검사가 있음

(a) 자연살해세포 활성화도 검사(Natural killer cell activity; NK) :

시험물질을 30일간 투여한 후 처치군 및 대조군에서 채취한 비장세포(effector cells)를 ^{51}Cr 이 표식된 YAC-1 임파종 세포(target cells)와 함께 4시간 배양함. 배양 후 표적세포(target cells)로부터 방출된 방사선량은 자연살해세포 활성화도의 지표임. 본 검사 시 주의할 점은 다음과 같음

① 적합한 시험결과를 얻기 위해서는 효능세포(effector cells) 부재 시 표적세포(target cells)에서 자발적으로 방출되는 방사선량과 방사선 표식 표적세포 총 방출량을 측정할 수 있는 시험법 대조군을 둠

② YAC-1 임파종 세포 외에 다른 표적세포(target cells)도 사용될 수 있으며, 표적세포의 생존율은 항상 확인함

(b) 대식세포(Macrophages) 검사 :

시험물질을 30일간 시험동물에 투여한 후 시험물질이 대식세포의 수와 대식세포의 탐식작용에 미치는 영향을 파악하기 위하여 아래의 검사를 실시함

① 잔류 복수세포(resident peritoneal cell)의 총 갯수 및 감별 개수

② 증폭인자(예, 감마 인터페론 또는 세균성 lipopolysaccharide) 유무시 복수세포(peritoneal cells)에 의한 미세입자(예, 형광 라텍스 비드) 탐식작용성

- 2단계 추가 면역독성 시험

- 상기 면역독성 검사에서 면역계의 기능이상이나 손상이 확인되는 경우, 정확하게 면역독성 여부를 판정할 수 없는 경우 또는 시험물질 또는 시험물질과 구조상 관련된 물질(대사물질 및 분해산물)이 면역독성물질로서 확인될 경우에는 추가적인 2단계 면역독성시험이 요구될 수 있음
- 상기 면역독성 검사에서 면역계의 기능이상이나 손상이 유발되지 않음이 분명하거나 시험물질 또는 시험물질과 구조상 관련된 물질(대사물질 또는 분해산물)의 면역독성이 유발되지 않음이 입증될 경우 2단계 추가 면역독성시험은 필요하지 않음
- 2단계 추가 면역독성 시험으로는 면역독성회복성시험, 숙주저항성시험, 기타 면역세포기능성시험 등을 포함함. 이중 면역독성회복성시험은 상기 면역독성시험에서 조직병리학적 변화를 포함하여 유의한 수준의 면역독성이 관찰될 경우 시험동물 5수 이상이 배치된 위성군 및 대조군에서 시험물질 투여 종료 후 7, 14 및 28일째 경시별 면역독성의 회복성을 평가하는 시험을 말함. 숙주저항성시험은 *Listeria monocytogenes* 등의 세균이나 PYB6 fibrosarcoma 등의 암세포 또는 Herpes simplex virus type I(HSV-1) 등의 바이러스를 공격접종한 후 숙주

저항성을 검색하는 시험을 말하며 기타 면역세포기능성시험은 T 또는 B 임파구 세포의 아군 정량시험 등을 포함한다. 이의 구체적인 시험법은 OECD 지침 등을 참고할 수 있음

㉔ 항원성시험

□ 아나필락시스 쇼크 반응시험

- 동물 : 시험동물은 기니피그를 사용함
- 동물 수 : 시험군은 원칙적으로 1군당 5수 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질 투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정함
- 투여물질 : 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용함. 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이중단백을 사용함
- 시험방법
 - 투여용량은 추정되는 임상용량 또는 노출량을 근거로 설정함
 - 투여경로는 피하 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용경로가 경구인 경우 시험물질만을 경구 또는 피하투여에 의해 감작시키는 경우가 많다. 임상적용경로가 정맥내 투여일 경우에는 피하투여 감작군에서 음성결과가 얻어지면 임상적용경로에 의한 감작이 필요 없다고 보지만, 양성반응이 의심될 경우에는 그 결과를 보완할 목적으로 투여경로를 임상적용경로로 설정하는 것이 바람직함
 - 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감작과 야기 시, 원하는 농도로 준비함
 - 감작 시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조물질을 투여하여 감작한다. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복투여(주 2~3회, 2~4주간)하여 감작함. 면역보조제를 사용하는 시험군은 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1~3주)으로 3회 이상 반복투여하여 감작함
 - 최종 감작 1~3주 후에 시험물질(야기항원)을 정맥내 투여하여 아나필락시스 쇼크 증상의 발현 유무를 검색함. 야기항원량은 원칙적으로 감작에 이용한 저용량의 수배로 함
- 결과의 판정 : 시험결과는 아나필락시스 쇼크 반응시험 판정기준에 따라 판정함

표 3. 아나필락시스 쇼크 반응 판정기준

1. 불안(Restlessness)	2. 기모(Piloerection)	3. 기침(Coughing)	4. 과호흡(Hyperpnea)
5. 배뇨, 배변에 의한 얼룩 관찰 (Urination & evacuation)	6. 유루(Lacrimation)	7. 호흡곤란(Dyspnea)	8. 청색증(Cyanosis)
9. 보행불안(Staggering gait)	10. 도약(Jumping)	11. 헐떡거림(Gasping)	12. 경련(Convulsion)
13. 사망(Death)			

[-] : 무증상, [±] : 1~2의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우

[+] : 1~2의 증상이 대부분 관찰되면서 3~6의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우

[++] : 1~6의 증상이 대부분 관찰되면서 7~12의 증상 중 1 이상이 관찰되는 경우

[+++] Death : 사망

□ 수동 피부 아나필락시스 반응시험

- 동물 : 이종 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우 항혈청 제조에 C57BL/6 계 마우스 또는 적당한 근교계 마우스를 사용하며, 반응 야기에는 랫트를 사용하고, 동종 수동 피부 아나필락시스 반응시험의 경우 항혈청제조 및 반응 야기에 기니픽을 사용함
- 동물 수 : 시험군은 원칙적으로 1군당 5수 이상으로 하여 대조군, 양성대조군 및 시험물질 투여군을 두며, 시험물질 투여군은 저용량군과 고용량군의 2군 이상으로 하고 거대분자와의 결합 여부, 면역보조제와의 혼합투여 여부에 따라 필요한 군을 설정함
- 용량 및 투여경로 선정 : 용량은 추정되는 임상용량으로부터 선정함. 투여경로는 피하, 또는 복강내로 하는 것이 일반적이나, 임상적용 경로로 투여하여도 무방함
- 시험방법
 - 시험물질에 따라 거대분자와의 결합 여부를 결정하여 시험을 실시하며 용매는 0.9%(w/v) 생리식염수를 사용함. 대조물질로는 시험물질에 따라 항원성이 알려진 저분자 물질, 또는 이종단백을 사용함
 - 모든 용액은 시험 당일에 조제하며 감각과 야기 시 원하는 농도로 준비함
 - 감각 시 대조군에는 0.9%(w/v) 생리식염수를 투여하고, 양성대조군에는 양성대조 물질을 투여하여 감각함. 면역보조제를 사용하지 않는 시험군에는 시험물질을 단독으로 피하, 복강내 또는 임상경로에 준하여 반복투여(주 2~3회, 2~4주간)하여 감각함. 면역보조제를 사용하는 시험군은 적당한 면역보조제와 혼합하여 피하, 복강내, 또는 피내에 적절한 간격(1~3주)으로 3회 이상 반복투여하여 감각함
 - 최종 감각 1~3주 후에 채혈하여 항혈청을 개체별로 분리함
 - 반응 야기를 위하여 위에서 얻은 개체별 항혈청을 제모한 시험동물의 등부위에 피내주사함. 항혈청은 적당한 배율까지 연속 2배수 희석해서 약 0.05~0.1ml정도 주사하며, 이때 대조군 시험동물의 혈청도 동량 주사함 각 혈청당 2~3수의 시험동물에 주사함. 감각시킨 시험동물은 사육상자에 넣어 수용하며 24시간 후

에 시험물질(야기항원)을 시험동물에 투여함. 이때 투여할 시험물질 용액은 동량의 1~3%(w/v) Evans blue와 혼합하여 각 시험동물의 정맥내에 투여함. 야기항원량은 원칙적으로 감작에 이용한 저용량의 수배로 함

- 야기항원 주사 30분 후에 시험동물 각 개체를 경추탈골 또는 마취하에 치사시켜 등부위 피부를 절취해서 피부안쪽의 청색 반점을 관찰함
- 결과의 판정 : 출현한 청색반의 장경과 단경의 평균치가 5mm 이상이면 양성으로 하고, 양성을 나타내는 가장 마지막 혈청회석액의 회석 배수(최대 회석 배수)를 그 혈청의 최종 역가(항체가)로 정함

㉞ 피부감작성 시험

□ 피부감작성 시험

- 동물 : 순조로이 발육한 동일 주령의 기니픽을 사용함. 암컷을 사용할 경우에는 임신이 되지 않고 출산경험이 없는 동물을 사용함
- 동물 수 : 시험군은 각 군당 10수 이상으로 하며 원칙적으로 시험물질군, 용매대조군 및 양성대조군을 둠
- 시험물질 : 시험물질이 액제 또는 반고형제인 경우 희석하지 않고 사용하고 고형제일 경우 증류수 또는 적절한 용매에 습윤시켜 균일하게 적용함
- 감작 및 야기항원량 결정시험
 - 피내주사에 의한 감작 항원량의 결정 : 시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모된 2수 이상의 기니픽 등에 0.1ml씩 좌우대칭이 되도록 피내주사함. 피내주사 24시간 후에 주사부위를 관찰하여 모든 동물에서 약한 자극성 혹은 중등도 자극성을 나타내는(피부괴사가 나타나지 않는 최고농도)농도를 감작항원량으로 정함
 - 폐색첩포에 의한 감작 및 야기 항원량의 결정 : 시험물질을 증류수 또는 적절한 용매로 용해한 후 단계별로 희석하여 제모된 2수 이상의 기니픽의 측복부에 시험물질 단계별 희석액 0.2ml을 포함하는 패취(1×1cm)를 부착하여 24시간 폐색첩포함. 패취 제거 후 24시간 및 48시간째에 관찰하여 약하거나 중등도의 홍반이 나타나는 최저농도를 감작항원량으로 하며, 야기항원량은 홍반(자극)이 나타나지 않는 최대농도를 사용함
- 본시험 방법
 - 1차 감작은 제모한 시험동물의 등부위 피부(약 2×4cm)의 상부, 중부, 하부에 아래의 용액 0.1ml씩을 좌우 대칭으로 피내주사하며 이중 (a)와 (b)의 주사는 머리 쪽으로 서로 근접하도록 함
 - (a) 증류수(또는 생리식염수)/Freund's Complete Adjuvant(FCA)의 유화물(1 : 1 혼합물)
 - (b) 시험물질 용액 또는 용매대조군의 경우 시험물질을 녹인 용매
 - (c) 시험물질 용액(또는 시험물질을 녹인 용매)과 증류수(또는 생리식염수)/FCA 유화물

(1 : 1 혼합물)의 혼합액(1 : 1 혼합물)

- 2차 감각은 1차 감각 1주 후 피내 주사한 부위를 다시 제모한 뒤 시험물질(또는 시험물질을 녹인 용매)을 포함하는 패취(2×4cm)를 부착하여 48시간동안 폐색칩포시킴. 단, 시험물질이 피부자극성이 없는 경우는 피부자극성을 유도하기 위해 24시간 전에 0.5ml의 10% 라우릴 황산나트륨이 들어 있는 바세린으로 도포한 후에 시험물질을 도포함
- 야기는 폐색칩포 2주 후 시험동물의 한쪽 등부위 또는 측복부(감각부위와는 다른 부위)를 제모하고 시험물질을 포함하는 패취(2×2cm)를 부착하여 24시간동안 폐색칩포하여 야기시킴. 또 다른 한쪽에는 용매대조군의 용매를 적용할 수도 있음
- 관찰기간 : 폐색칩포 제거 후 시험물질을 증류수나 식염수로 세척하고 21시간째에 제모한 후 24시간 및 48시간째에 피부반응을 평가기준에 의해 기록함
- 검색방법
 - 폐색칩포 제거 후 24시간 및 48시간에 개체별로 홍반 및 부종 반응을 표 4의 피부반응 평가기준표에 의해 점수를 기록하고 투여군별 평균점수를 구함
 - 피부감작성 평가는 전체 공시동물 중 피부반응이 일어난 개체의 비율(감작용, %)로 구함
 - 시험기간 중의 피부반응이외에 전신적인 증상을 기록하고 의심되는 반응을 명확히 하기 위해서 병리조직학적 소견 관찰, 피부두께 측정 등을 할 수 있음

표 4. 피부반응 평가기준

점 수	증 상
0	무반응
1	홍반이 적용부위에 흩어져 나타남
2	홍반이 적용부위 전체에 나타남
3	전체적으로 강한 홍반 및 부종이 나타남

표 5. 피부감작성 평가기준

감작용(%)	등 급	분 류
0~8	1	매우약함
9~28	2	약 함
29~64	3	보 통
65~80	4	강 함
81~100	5	매우강함

□ 마우스를 이용한 국소임파절증식성시험

- 동물 : 순조로이 발육한 동일 주령의 암컷 CBA 마우스를 사용함. 이때 암컷은 임신이 되지 않고 출산경험이 없는 동물을 사용함. 시험시작시기에 동물은 8주령 내지 12주령 사이이고 평균체중의 20% 표준편차 범위 이내로 함
- 동물 수 : 각 시험물질군은 적어도 4수 이상을 사용함

- 용량단계 : 시험물질군 및 용매대조군을 두며 시험물질군은 3용량 이상으로 함. 이때 최대 투여용량은 급성독성 및 피부자극성을 고려하여 체독성이나 과도한 국소자극성이 일어나지 않는 농도이어야 함. 시험 시 알려진 물질을 양성대조군으로 둘 수도 있음. 단, 시험물질의 용매는 시험물질의 적용을 위해 적절한 용액 또는 현탁액을 만들 수 있는 것으로 아세톤/올리브오일용액(4/1) 또는 시험에 영향을 미치지 않는다고 보고된 용매 등이 권장됨
- 시험방법
 - 시험기간 동안 공시동물에 대하여 매일 임상증상을 관찰하고 개체별 체중을 기록하는 것을 원칙으로 함
 - 시험시작 일에 개체별로 각 동물을 확인하고 체중을 기록하고 양쪽 귀의 배부에 시험물질용액 25 μ l을 1회씩 투여함
 - 시험 2, 3일째에도 “시험방법”에서의 맨 첫 번째 시험절차와 같이 하고 시험4, 5일에는 투여를 중지함
 - 시험 6일째에 각 동물의 체중을 기록하고 20 μ Ci의 3 H-methyl thymidine(또는 2 μ Ci의 125 I-iododeoxyuridine, 10^{-5} M fluorodeoxyuridine)을 포함하는 인산완충 식염수 250 μ l를 미정맥을 통해 주사함. 주사 후 5시간에 동물을 부검하여 양쪽 귀밑의 이하임파절을 채취하여 시험군별(또는 개체별) 인산완충식염수에 합침
 - 합친 이하임파절을 200 μ m 망에서 물리적으로 갈아 단일 세포 부유액을 만듦. 임파절세포를 인산완충식염수로 2회 세척하고 5% trichloroacetic acid(TCA)로 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 정치하여 침강시킴. 침강물을 1ml TCA로 부유시켜 1ml의 신틸레이션액이 들어 있는 바이알에 옮겨 β (또는 γ)-방사성 동위원소 측정기로 3 H(또는 125 I) 양을 DPM(disintegrations per minute)단위로 측정함. 또는 세포부유액을 형광기질액에 섞어 형광분석기를 이용하여 형광강도를 측정함
- 검색방법 : 결과는 시험군의 방사성동위원소 표지량((또는 형광강도)을 용매대조군의 방사성동위원소 표지량(또는 형광강도)으로 나눈 값을 자극지수(stimulation index, SI)로 하여 용량반응성 및 통계학적 유의성을 고려하여 SI값이 3이상인 경우 감작성으로 판정함. 이때 시험물질의 감작성은 SI값 외에도 시험기간 중에 관찰된 임상증상 등을 고려하여 평가하는 것이 바람직함

마. 실험실적으로 효능과 안전성이 증명된 물질의 돼지를 이용한 평가

(1) 평가방법

(가) PRRS 음성인 4주령 돼지 12마리를 구입하여 4그룹으로 나누어 사육한 뒤 생리식염수에 준비한 93-PSY-1-11을 0, 40, 200, 400 μ g/kg의 농도로 근육 접종하였다. 93-PSY-1-11 접종 후 10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 준비된 VR2332를 각 그룹의 자돈 1마리에 2 ml씩 비강을 통해 접종하였다(접종 자돈 번호: 54, 57, 60, 63). 접종 후 매주 채혈을 실시하여 바이러스의 전파와 증식을 분석하였다.

(2) 평가결과

(가) 바이러스 접종 후 1주일째 93-PSY-1-11을 접종 한 54, 57 및 60번 자돈들은

SY-029 비접종 자돈(63번)에 비해 약 5-10배 낮은 정도의 혈중 바이러스 농도가 관찰되었고 93-PSY-1-11 비접종 그룹에서는 나머지 2마리 모두 바이러스에 감염된 반면 93-PSY-1-11 을 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 접종한 그룹에서는 1마리 자돈이 바이러스에 감염되었으며 93-PSY-1-11을 200 또는 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 접종한 그룹에서는 한 마리도 감염되지 않아 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이상의 93-PSY-1-11처치가 PRRSV 전파를 1주일 정도 막아 주는 것으로 관찰되었다. PRRSV 접종 2주 후에 모든 자돈이 PRRSV에 감염되었다(그림 3-7).

Viremia after treatment with 93PSY-1-11

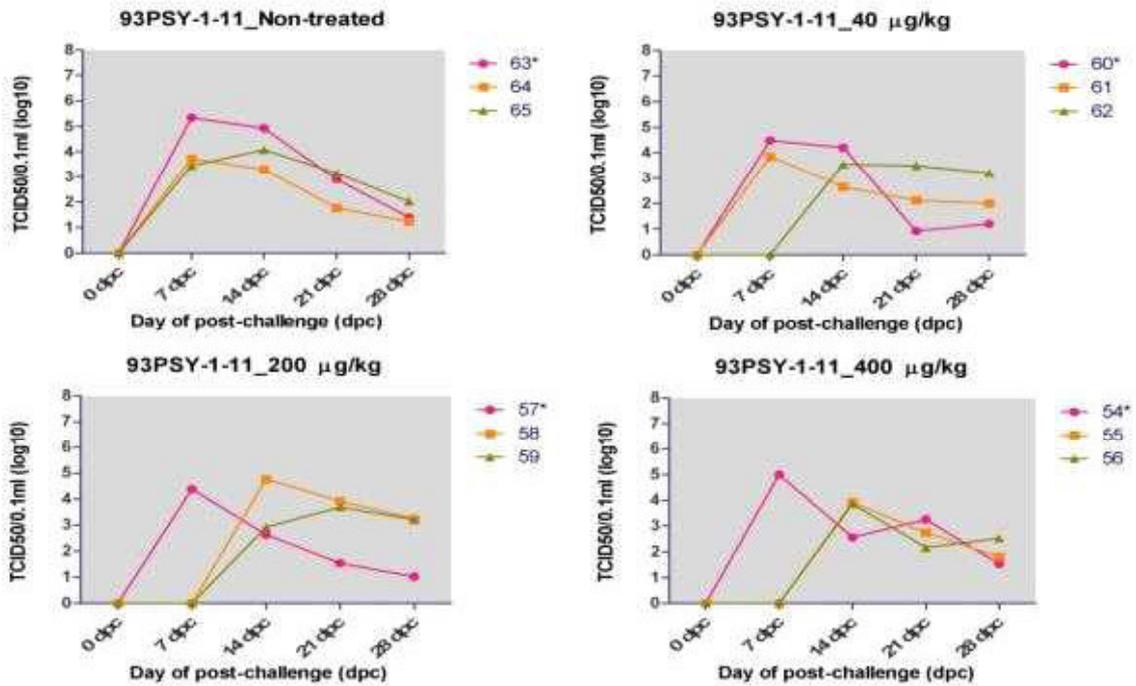


그림 3-7. 93PSY 처치군과 비처치군의 VR2332 공격감염 후의 혈중바이러스 농도

(나) 바이러스 접종 후 4주에 부검을 실시하고 폐의 육안적 폐렴 병변을 측정한 결과 93-PSY-1-11을 200 또는 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 접종한 그룹에서는 비처리그룹과 비교하여 낮은 육안적병변이 관찰되었다. 현재 현미경적 병변에 대한 분석은 진행 중이다(그림 3-8).

(나) 바이러스 접종 후 4주까지의 일당증체율(Average Daily Weight Gain; ADWG)을 측정한 결과 93-PSY-1-11을 접종한 그룹은 비접종그룹에 비해 보다 높은 일당증체율을 보였으나 통계적인 유의차는 발견되지 않았다(그림 3-9).

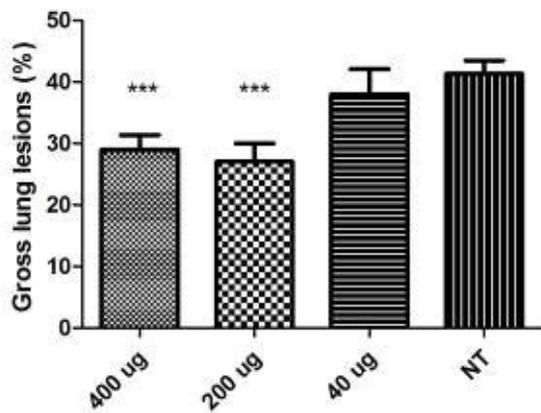


그림 3-8. 93PSY 처치군과 비처치군의 VR2332 공격감염 후의 육안적 폐병변 소견

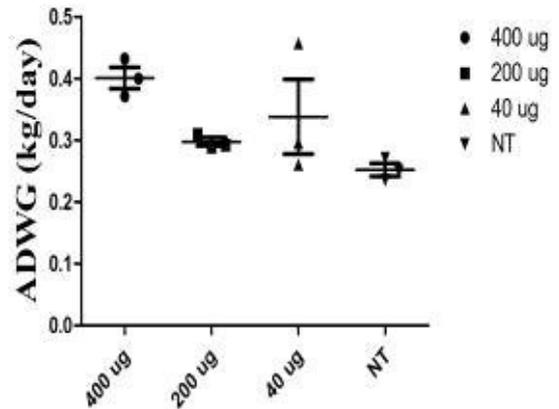


그림 3-9. 93PSY 처치군과 비처치군의 VR2332 공격감염 후의 일당체중증체율

(3) 후보물질의 산업화를 위한 준비

(가) 동물실험을 통해 유효성이 증명된 후보물질인 93-PSY-1-11에 대한 특허출원을 진행하고 합성방법에 기초하여 대량생산법과 공급방법에 대한 사전 정보를 파악하고 제품으로 개발할 시 필요한 상황에 대한 준비를 2, 3차년도에 계속적으로 진행할 것임.

2. 단백질의 X-ray 구조 정보를 이용한 PRRSV 치료물질 설계 및 합성 (2차년도)

가. PRRSV 단백질 및 바이러스 숙주 세포내 단백질 구조분석

(1) PRRSV 단백질 분해효소의 구조 분석

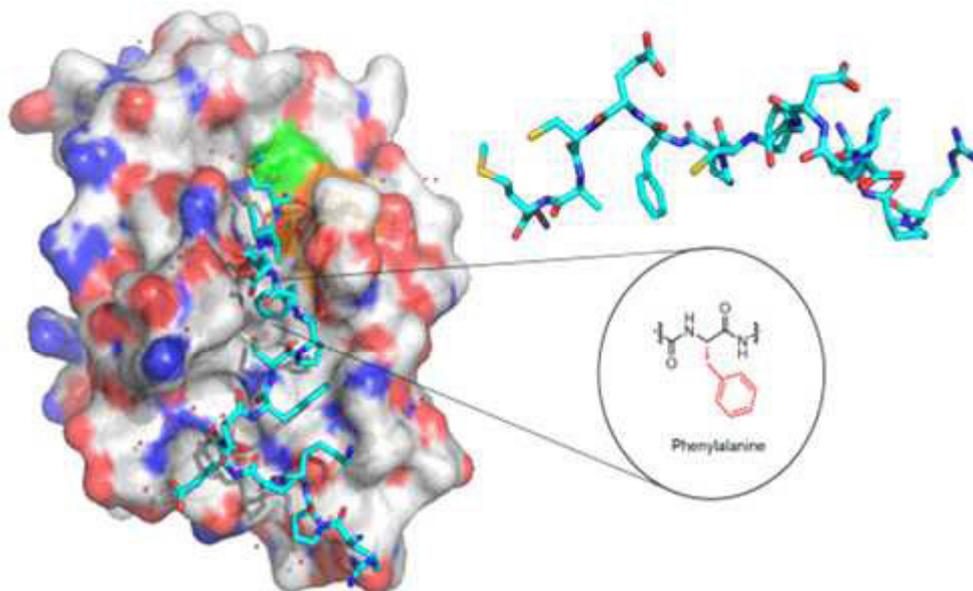


그림 3-10. PRRSV 단백질 분해효소 (Nsp1a Protease, 3IFU) 단백질 구조 및 결합펩타이드

- (가) 단백질 정보은행 (Protein data bank, PDB)를 검색하여 PRRS 바이러스의 단백질 Nsp1a, Nsp1b, 3CLSP 단백질의 구조와 활성 정보를 검색 및 분석함
- (나) 단백질 구조 정보와 관련 연구 검색을 통해 최종적으로 Nsp1a 단백질을 선별하였음
- (다) Nsp1a의 단백질 구조정보 (PDB code: 3IFU)를 분석하여, 단백질내 groove에 결합하는 펩타이드의 중요 아미노산 잔기 선별
- (라) 단백질 정보검색 및 분석을 통해 Phenylalanine 아미노산이 중요하게 단백질의 소수성 영역에 결합함을 확인함
- (마) Nsp1a 단백질은 groove을 형성하고는 있지만, 약물이 강하게 결합할 수 있는 깊은 포켓은 존재하지 않음
- (바) 약물설계를 위해 Phenylalanine을 기본 hit으로 선별
- (사) Phenylalanine 아미노산 잔기의 Phenyl 그룹과 카복실 산기, 아민기를 확장시켜 새로운 약물을 설계함

(2) 바이러스 숙주 세포내 단백질 (Hsp90, PDB code: 2XJX) 구조 분석

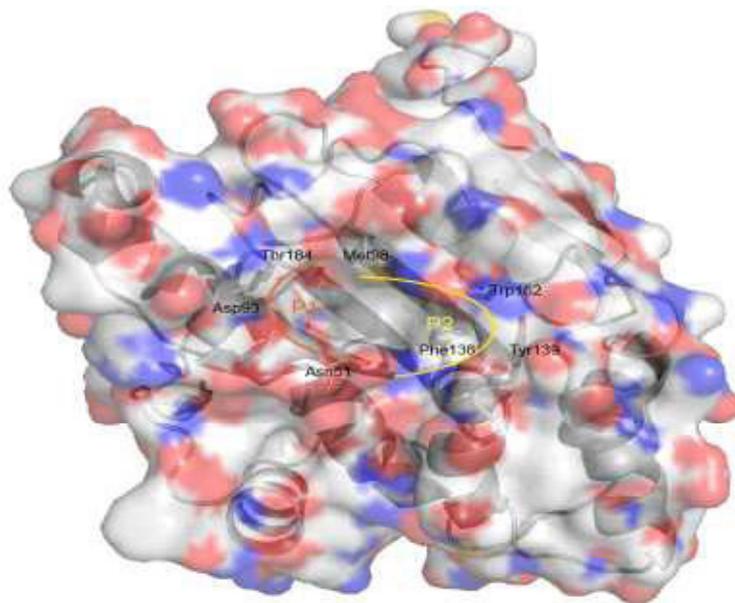


그림 3-11. Hsp90 단백질의 N-terminal 도메인 구조

- (가) 최근 많은 연구를 통해 바이러스 단백질은 숙주 세포의 열충격 보호 단백질 Hsp90 보호기능에 의존하며, Hsp90 단백질이 바이러스 증식에 중요하게 작용한다고 보고됨
- (나) 바이러스 단백질은 매우 민감하게 Hsp90 단백질에 의존성을 보이며, 바이러스 증식을 위해 한정된 시간에 다량의 단백질을 발현시키기 위해서 열충격 단백질의 도움이 필수적임
- (다) Hsp90 단백질의 구조를 분석해 보면 ATP가 결합하는 N-terminal, Hsp90 단백질의 dimer 형성에 중요한 C-terminal, client들이 결합하는 middle domain으로 구분

됨

- (라) Hsp90의 활성을 위해서는 ATP 에너지가 필수적이며, ATP가 결합하는 N-terminal 도메인의 구조는 그림 3-11와 같음
- (마) ATP 결합 포켓 구조를 분석하면, Asp90, Asn51, Thr184 등의 친수성 아미노산 잔기들이 P1의 친수성 영역을 구성하고 있으며, Phe138, Try139, Trp162 등의 소수성 아미노산 잔기들로 구성된 소수성 영역 (P2)이 존재함을 확인함
- (바) Hsp90의 ATP 결합 포켓 구조정보를 이용하여 친수성 (P1)과 소수성 영역 (P2)에 모두 결합 할 수 있는 약물을 설계함

나. 분석된 PRRSV 단백질 및 바이러스 숙주 세포내 단백질 정보를 이용한 치료물질의 합리적 설계

- (1) 숙주 세포내 단백질 구조정보를 이용한 PRRSV 치료 후보물질 설계

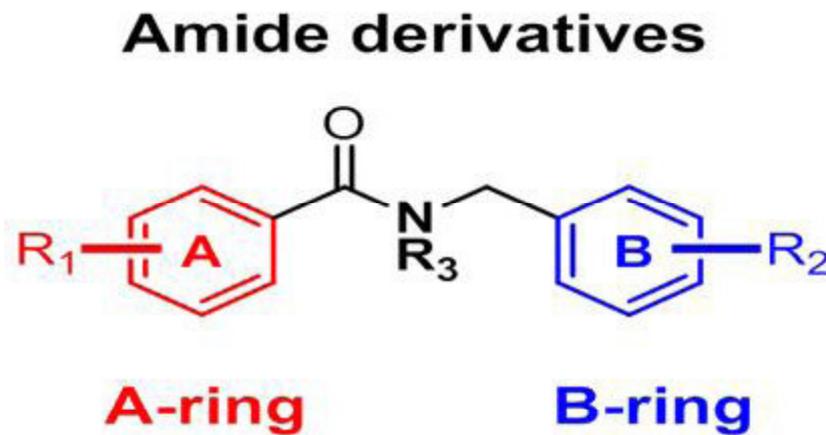


그림 3-12. 단백질 구조기반 약물의 설계

- (가) 우수한 PRRSV 치료제 개발을 위해서 숙주 세포내 단백질 Hsp90 구조정보를 분석
- (나) Hsp90 단백질 N-말단에 존재하는 ATP-binding 포켓의 수용성 영역 (P1)과 소수성 영역 (P2)에 결합할 수 있게 A-ring과 B-ring에 다양한 치환기 도입하여 후보물질 설계
- (다) 후보물질의 기본골격을 아마이드 구조로 고정시키고, 아마이드 구조의 R3 치환기를 다양화 시켜 약물의 설계함
- (라) A-ring의 치환기는 Hsp90 단백질의 Phe138, Tyr139, Tyr162 아미노산 잔기와 소수성 결합을 할 수 있는 소수성 치환기와 Asp93, Asn51, Thr184 아미노산 잔기와 수용성 결합을 할 수 있는 수용성 치환기를 도입하여 약물 설계함
- (마) B-ring의 치환기 R2를 다양하게 변화시켜 다수의 화합물 설계
- (바) 단백질의 구조 정보를 이용하여 11종 화합물의 합리적 설계
- (사) 1차년도 활성 화합물 구조 정보를 이용하여 리간드 기반 합리적 설계함 (4종)

(2) PRRSV 단백질 Nsp1a의 구조정보를 이용한 약물의 설계

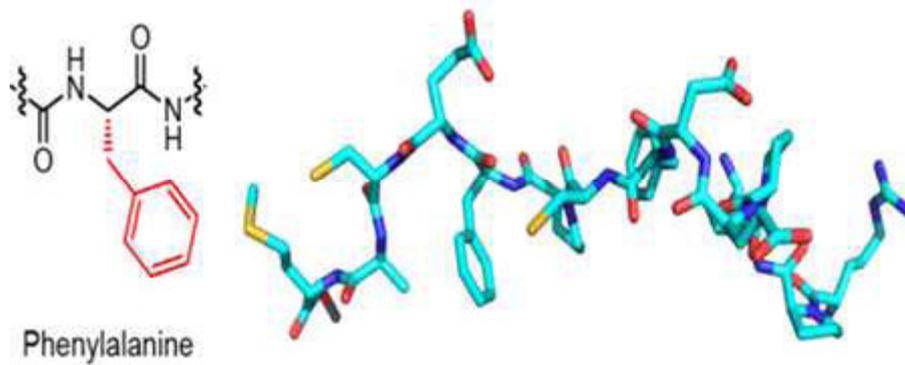


그림 3-13. Phenylalanine와 PRRSV Nsp1a 결합 펩타이드 구조

- (가) PRRSV 단백질 분해효소 Nsp1a와 펩타이드 결합정보 분석을 통해 펩타이드의 Phenylalanine 아미노산이 Nsp1a의 소수성영역에 결합함을 확인함. 이를 통해 Phenylalanine 아미노산 잔기가 결합의 중요하게 작용함을 확인함
- (나) PRRSV Nsp1a에 결합하는 펩타이드는 약물로 사용하기 위해서는 물리화학적 성질을 개선이 필수적임
- (다) 분자량, 소수성 (ClogP), 대사안정성 등의 개선을 위해 Phenylalanine 아미노산을 Hit 화합물로 선별하여 분자확장 전략을 사용하여 물리화학적 성질을 개선한 약물을 설계함
- (라) Phenylalanine 아미노산의 phenyl 그룹을 확장, 아미노산의 C-terminal, N-terminal 그룹에서 분자구조를 확장하여 약물 설계함

(3) 컴퓨터 시뮬레이션을 이용한 설계된 약물의 검증

- (가) 설계된 약물은 컴퓨터 시뮬레이션을 이용하여 결합 가능성을 검증함
- (나) Autodock4.1 프로그램을 이용하여 Lamarckian genetic algorithm을 통해 도킹 시뮬레이션 실행
- (다) 60_60_60 그리드 박스와 0.375Å 간격을 사용하여 실행
- (라) 화합물 당 50번의 시뮬레이션 실행.

다. 유기합성을 이용한 설계된 화합물의 합성

- (1) 설계된 약물의 합성

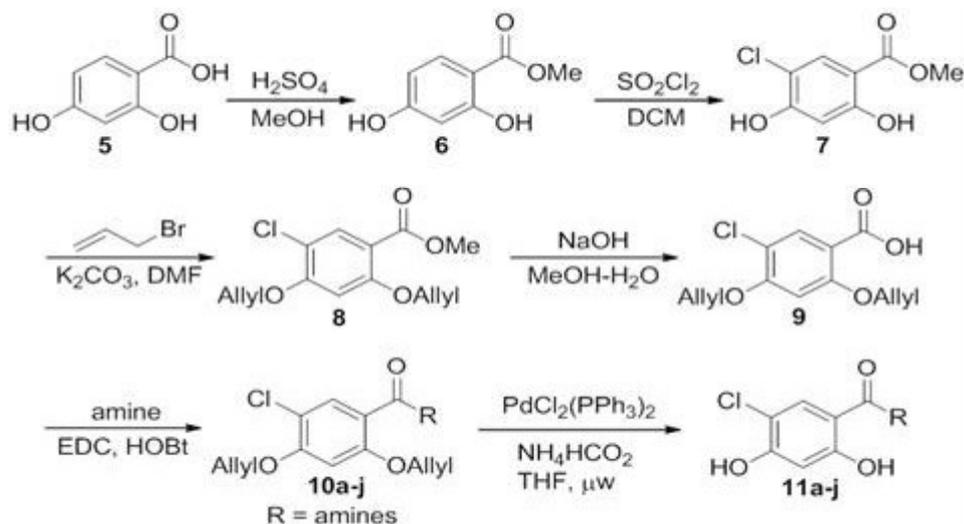


그림 3-14. 설계된 화합물의 합성

- (가) 설계된 화합물을 다양한 유기합성법을 통해 합성이 시도
- (나) 화합물 5에 황산과 methanol을 처리하여 에스터 화합물 6를 합성함
- (다) 합성된 에스터 화합물 6에 SO_2Cl_2 를 처리하여 화합물 7을 생성함. 생성된 화합물 7의 알콜 그룹을 알릴브로마이드를 이용하여 보호시키 화합물 8을 합성하였음
- (라) 합성된 화합물 8은 염기 NaOH을 이용하여 가수분해 반응을 진행시켰으며, 이를 통해 카복실산 9을 합성함
- (마) 카복실산 9와 다양한 아민을 아마이드 축합 반응을 이용하여 설계된 화합물을 합성함
- (바) 보호기의 탈착반응을 효율을 높이기 위해서 Pd(2) 촉매 하에서 microwave를 조사 하여 반응을 진행시킴
- (사) Microwave를 이용한 반응이 오일 반응기에 의한 고온 반응보다 뛰어난 효율을 나타냄
- (아) 유도체 합성의 중요 반응인 Aldol 축합반응의 최적화를 위해서 다수의 용매 (methanol, ethanol, DCM, water, THF, DMF)를 시도함
- (자) 반응 온도 조건의 최적화를 위해 25, 45, 60 °C 의 세가지 온도에서 반응을 진행함
- (차) 일부 유도체 합성을 위해 보호기 장착과 탈착의 반응을 사용
- (카) 합성된 화합물은 활성평가를 위해 전북대학교 활성팀에 전달됨

(2) 유기합성법을 이용한 1차년도 활성물질의 재합성 및 대량 합성법 구축

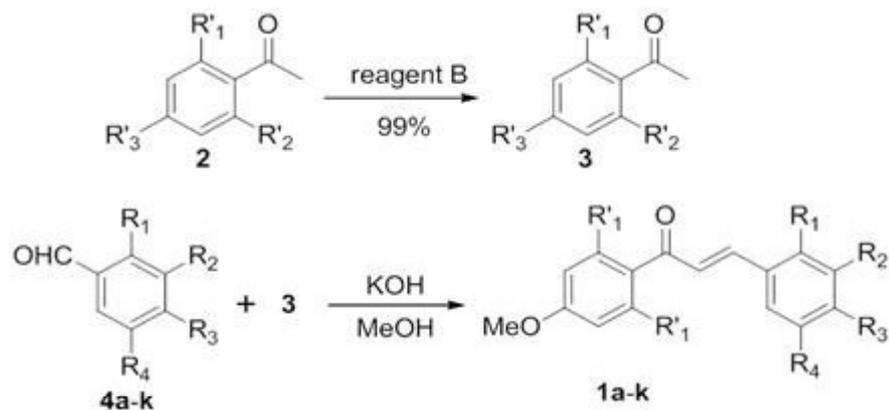


그림 3-15. 1차년도에 개발된 PRRSV 활성물질의 재합성

- (가) 초기물질 케톤 2를 전처리하여 화합물 3을 합성하고, 합성된 케톤 화합물 3을 알데하이드 4와 알돌 축합반응을 통해 최종 화합물 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50 합성함
- (나) 합성된 활성 화합물 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50을 실리카 컬럼을 이용하여 MPLC 이용하여 순도 98% 이상으로 정제함
- (다) 또한 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50들의 변형 합성물질 15종을 추가로 합성함
- (라) 합성된 화합물은 추가 활성평가 및 동물실험을 위해서 전북대학교에 전달됨

(3) 합성된 화합물의 고순도 정제

- (가) 합성된 화합물의 고순도 정제를 위해 150g의 silica gel 컬럼을 이용하여 MPLC 분리를 진행함
- (나) 분순물 제거의 위해 Ethyl acetate와 Hexane 이동상의 조성을 최적화 하여 최종 화합물을 정제
- (다) MPLC로 정제가 불가능한 화합물의 경우 HPLC를 이용한 정제를 추가로 진행함
- (라) HPLC의 경우 C18 역상 Prop 컬럼을 이용하여 고순도 정제를 진행함
- (마) HPLC의 경우 이동상을 Methanol (0.1% TFA)과 water(0.1% TFA)을 사용하여 진행함
- (바) 합성된 화합물의 HPLC/MPLC를 이용하여 순도 98% 이상의 정제된 화합물 구축
- (사) H-NMR, 13C-NMR, MS 등의 분석 기술을 이용하여 순도 및 구조 확인

라. PRRSV 치료용 합성 화합물 라이브러리의 in vitro 효능 평가

- (1) 계명대에서 합성되어 전달된 화합물은 제1세부 연구팀과의 협력을 통해 in vitro 효능 평가
 - (가) 1차년도에 총 18종의 천연물 유래 화합물의 평가 결과로 선별된 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50 등의 3종의 화합물 외에 이들과 유사한 구조로 합성된 물질 3종과 PRRSV의 감염 시 HSP90의 활성을 저해하여 PRRSV의 감염을 억제하는 것으로 알려진 물질 12종을 포함하여 아래의 목록에 보여지는 15종의 화합물을 대상으로 평가가 진행 중임

(나) 1차년도에서 선별된 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50 등의 3종의 화합물은 dose 와 투여경로 등에 변화를 주며 동물을 이용한 항바이러스 효능 평가를 진행하였음

<PRRSV 항바이러스 효능 평가 진행 중인 화합물 목록>

CMA	JJH	PSY	PET
1-3	5-22	2-13	156 Hsp90a
2-15	5-23	1-77	
	5-24	2-8	
	5-94	1-73	
	5-136	2-12	
	5-147	2-9	
	6-14		

(2) 평가방법

(가) MARC-145 세포에서 복미형 표준 바이러스 주인 VR2332 바이러스를 검사에 사용함

(나) 물질은 유기물희석액, 증류수 또는 경수를 사용하여 8 mg/ml의 농도로 준비하고 배양배지를 사용하여 80 µg/ml로 재차 희석하여 검사에 사용함

(다) 검사를 위해 희석 물질은 배양배지를 사용하여 2배수 연속 희석하여 40, 20, 10, 5, 2.5 µg/ml 농도에서 항바이러스 효능 및 세포독성을 검사함. 이때 2.5 µg/ml까지가 유효 희석배수로 확인될 경우 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625µg/ml까지 추가로 희석하여 검사를 실시함

(라) VR2332(10^3 TCID₅₀/ml) 바이러스 배양액 500 µl와 동량의 배양배지로 희석한 후보 물질을 96 titer tubes에서 혼합한 다음 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시키며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 줌. 바이러스 대조군의 경우도 해당물질 대신에 배양배지와 바이러스를 혼합하여 동일한 방법으로 처리함

(마) 반응이 완료된 혼합액 100 µl를 MARC-145 세포 또는 PAM에 접종하고 37°C에서 1시간 동안 배양함. 물질대조군을 바이러스가 포함된 혼합액 대신 배양배지에 동일한 농도로 희석한 물질만을 접종하여 같은 방법으로 준비함. 또한 검사물질 대신 배양배지로 희석한 바이러스만 접종한 양성대조군과 배양배지만 접종한 음성대조군을 같은 방법으로 준비함

(바) 준비된 배양배지에 희석된 물질 200µl를 검사 well과 물질대조군에 분주하고 5일 동안 관찰함. 양성 및 음성대조군에는 배양배지만을 분주하고 동일한 방법으로 관찰함

(사) 배양 5일 후 상층액을 수거하여 배양배지를 사용하여 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 로 희석하고, MARC-145 단층세포가 형성된 96-well plate에 희석배수 당 8-well에 중화된 반응액 100 µl를 접종함

(아) 접종 후 37°C에서 5일 동안 배양하며, 접종 5일 후 PRRS 바이러스 특이 단클론항체를 이용하여 IFA를 실시한 후 바이러스의 존재유무를 최종 판정함

(3) 평가결과

- (가) 1차 년도에 합성된 물질 중 가장 항바이러스 성 활성이 좋았던 93PSY-1-11, CMA-1-3, 및 JJH-2-50 3종에 대한 세부 평가를 진행하였음(그림 3-16).
- (나) 1차 년도 평가 결과와 동일하게 항바이러스 효과가 관찰된 농도에서 물질 처리 후 24시간까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않아 안전성이 높은 것으로 판단되었음.
- (다) 그 외 새로운 15종의 화합물에 대한 평가는 현재 MARC-145 세포를 이용하여 항바이러스 효능과 안전성을 보이는 물질의 선별이 진행 중임.

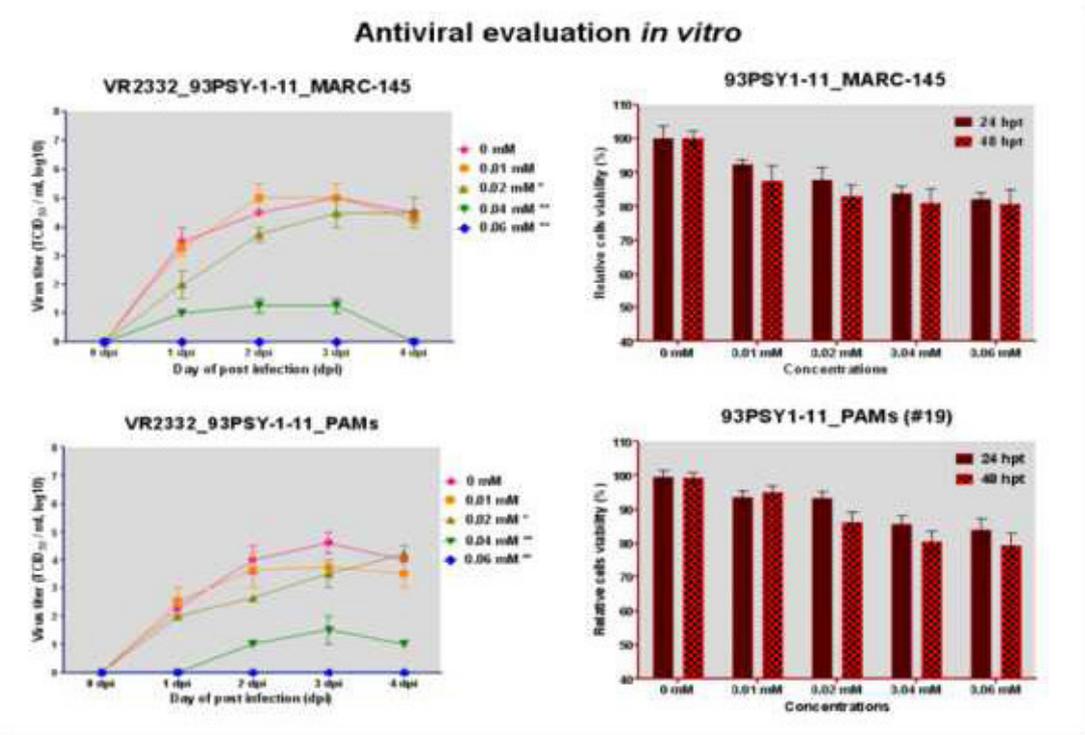


그림 3-16. 93PSY-1-11의 MARC-145와 PAM을 이용한 항바이러스 효과 및 세포독성 평가 결과

Antiviral evaluation *in vitro*

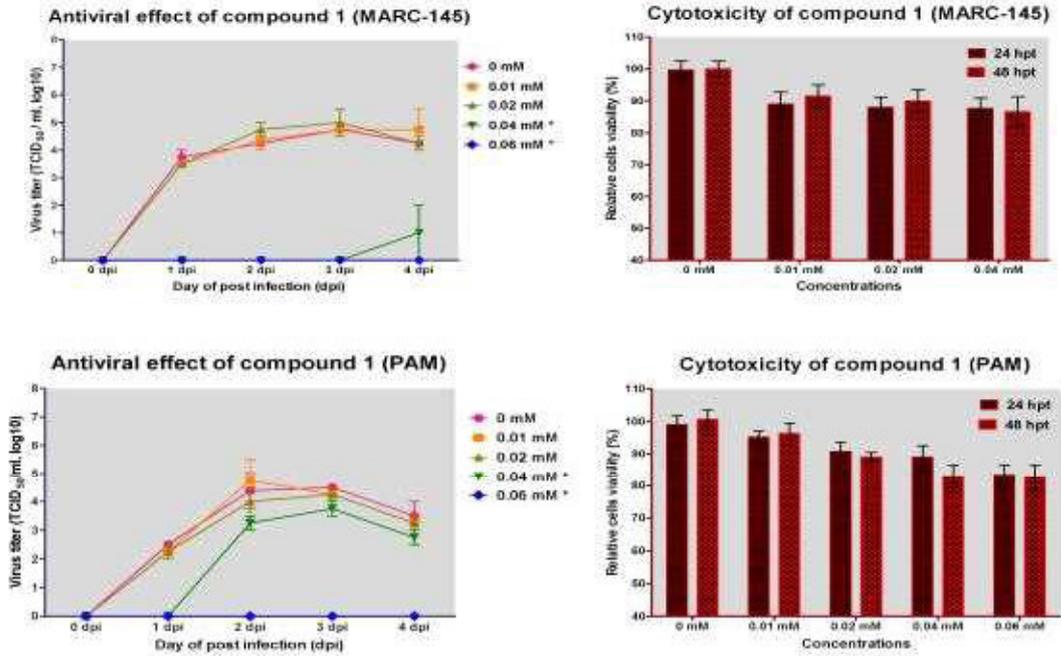


그림 3-17. CMA-1-3의 MARC-145와 PAM을 이용한 항바이러스 효과 및 세포독성 평가 결과

Antiviral evaluation *in vitro*

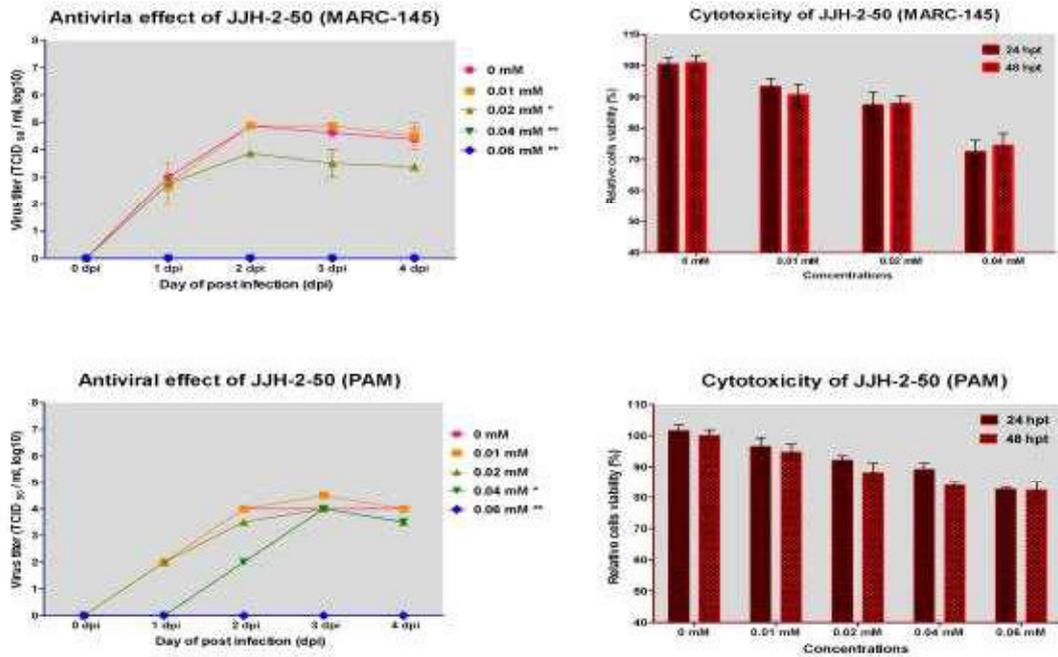


그림 3-18. JJH-2-50의 MARC-145와 PAM을 이용한 항바이러스 효과 및 세포독성 평가 결과

마. 후보물질의 동물을 이용한 항 PRRSV 효능 평가

(1) 사용동물: PRRS 음성인 4주령 자돈을 사용

(2) 후보물질 적용 방법

(가) 근육접종: 생리식염수에 준비한 후보물질 CMA-1-3과 JJH-2-50 을 0 또는 400 μ g/kg의 농도로 근육 접종을 통하여 3회까지 접종한다.

(나) 비강접종: 생리식염수에 준비한 후보물질을 0 또는 400 μ g/kg의 농도로 네블라이저를 이용하여 비강 접종한다. 필요에 따라 3회까지 접종한다.

(다) 경구투여: 후보물질을 0, 0.4, 2, 4 μ g/kg의 농도로 사료에 혼합한 뒤 2주간 급여한다. 필요에 따라 4주까지 급여기간을 조정한다.

(3) 후보물질들의 근육접종을 통한 항바이러스 효능 및 안전성 평가

(가) PRRS 음성인 4주령 돼지 12마리를 구입하여 4그룹으로 나누어 사육한 뒤 생리식염수에 준비한 CMA-1-3과 JJH-2-50을 각각 400 μ g/kg의 농도로 준비하여 3마리씩 두 그룹에 각각 3일간 근육 접종하였다. 다른 한 그룹의 돼지에는 CMA-1-3와 JJH-2-50을 각각 400 μ g/kg 씩 동시에 근육접종하였고 마지막 한 그룹은 무처치 그룹으로 보전하였다.

(나) 후보물질들의 1회 접종 후 10^3 TCID₅₀/ml의 농도로 준비된 VR2332를 각 그룹의 자돈 1마리에 2 ml씩 비강을 통해 접종하였다 (접종 자돈 번호: 16, 19, 24, 27). 접종 후 매주 채혈을 실시하여 바이러스의 전파와 증식을 분석하였다.

(다) 바이러스 접종 4주 후에 모든 동물을 안락사 시키고 부검을 실시하여 병리학적 평가를 실시한다.

(4) 평가결과

(가) 바이러스 접종 후 1주일 에 JJH-2-50를 단독으로 또는 CMA-1-3와 동시에 접종한 그룹에서 다소 낮은 혈중 바이러스 농도가 관찰되었고 각각 한 마리씩 음성을 유지하였다. 반면 CMA-1-3 단독 또는 무처치 그룹에서는 나머지 2마리 모두 바이러스에 감염되었다 (그림 3-19). 폐에 잔존하는 바이러스의 농도를 측정 한 결과에서도 마찬가지로 JJH-2-50를 단독으로 또는 CMA-1-3와 동시에 접종한 그룹에서 다소 낮은 수준의 바이러스가 검출되었다 (그림 3-20).

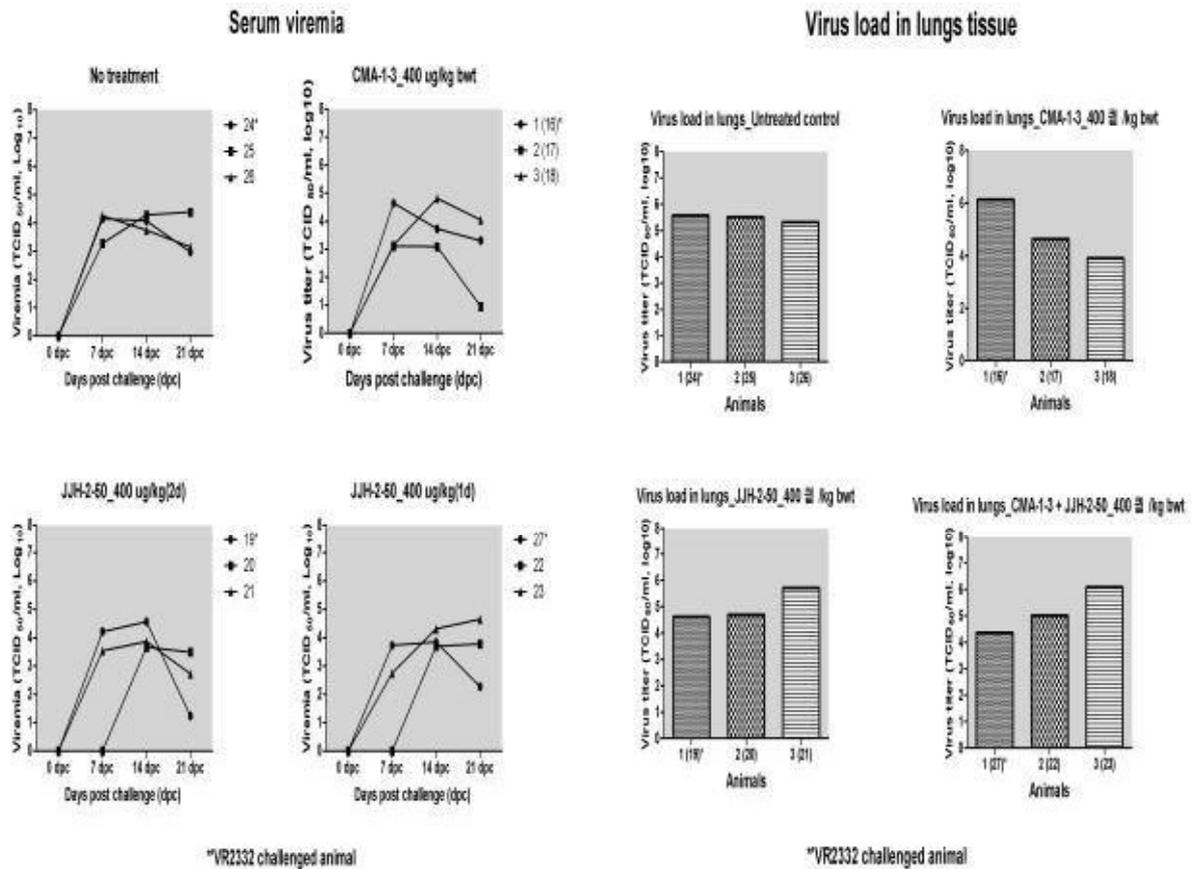


그림 3-19. CMA-1-3과 JJH-2-50의 VR2332 공격감염에 대한 혈중 바이러스 농도 검사결과

그림 3-20. CMA-1-3과 JJH-2-50의 VR2332 공격감염에 대한 폐 잔존 바이러스 농도 검사결과

(나) JJH-2-50 또는 CMA-1-3를 단독 또는 동시에 접종한 그룹에서 PRRSV 특이 항체를 측정하고 바이러스 접종 후 2주까지도 다소 낮은 수준의 혈중 바이러스 농도가 관찰되었고 바이러스를 직접 접종한 돼지를 제외하고 나머지 두 마리는 2주까지도 혈청 음성을 유지하는 것으로 관찰되어 두 합성물질이 PRRSV의 감염을 수일 늦추는 것으로 관찰되었다(그림 3-21).

(5) 향후 연구개발 진행 계획

- (가) 따라서 향후 근육접종의 접종량에 변화를 주고 경구투여 및 분무투여 등의 다른 경로를 통한 이들 후보물질의 평가가 진행될 예정입니다.
- (나) 부검결과 후보물질을 접종한 돼지들에서는 어떠한 유의성 있는 병변이 관찰되지 않아 안전한 것으로 판단되나 보다 높은 접종량을 이용한 안전성 평가가 진행될 예정입니다.
- (다) 2015년 하반기까지 선발된 물질들의 동물실험을 통한 평가를 완료하고 산업화 준비를 진행할 예정입니다
- (라) 선발 물질을 대량생산을 통해 축산농가에 공급이 가능한 수준의 원가 절감을 진행

할 예정이며 특히 PRRS 음성농장의 PRRS 발생 시 피해가 크므로 응급으로 발생 및 전파를 막는 목적으로 모든 또는 후보돈군에 사용하면 어느 정도 고비용으로 생산이 되더라도 농장에서의 사용이 가능할 것으로 판단됨.

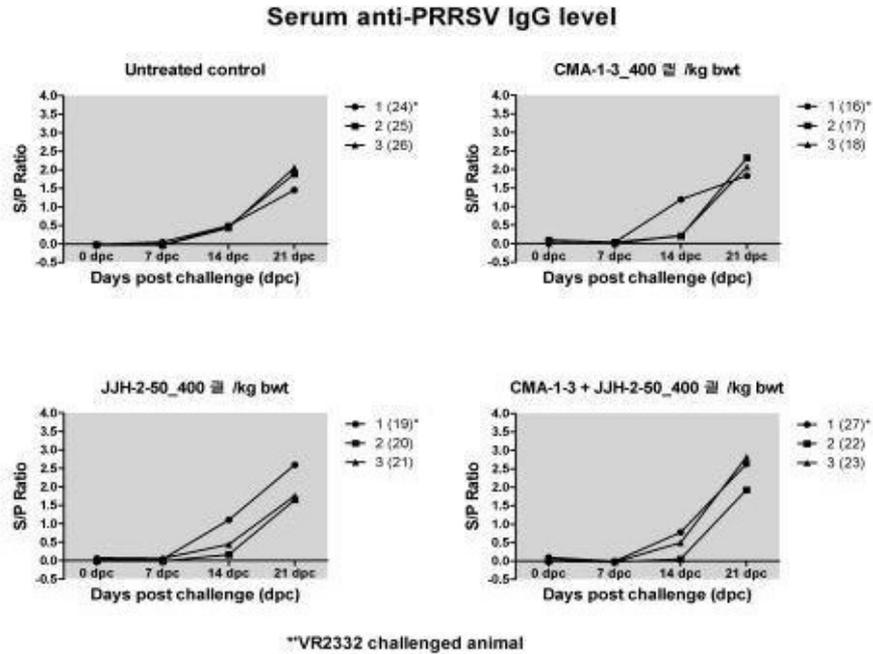


그림 3-21. CMA-1-3과 JJH-2-50의 VR2332 공격감염에 대한 혈중 항체가 결과

3. 선발된 후보물질의 치료 효능 및 안전성 평가와 농장적용 (3차년도)

가. 바이러스 숙주 세포내 Hsp90 단백질을 표적으로 한 2종의 선도물질 도출

(1) 이번 연구에서 우리는 돼지 생식기 호흡기 증후군 치료를 위해서 다양한 구조의 화합물들을 합성하고, 항바이러스 활성을 탐색하였다. 활성탐색에서 우리는 화합물1과 2가 PRRS 바이러스의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

(2) 화합물1과 2의 구조와 합성은 다음과 같다 (그림 3-22, 그림 3-23)

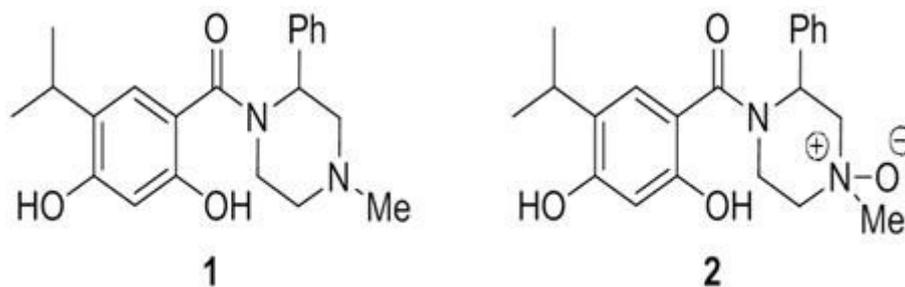


그림 3-22 화합물1과 2의 구조

(3) 화합물1과 2의 합성

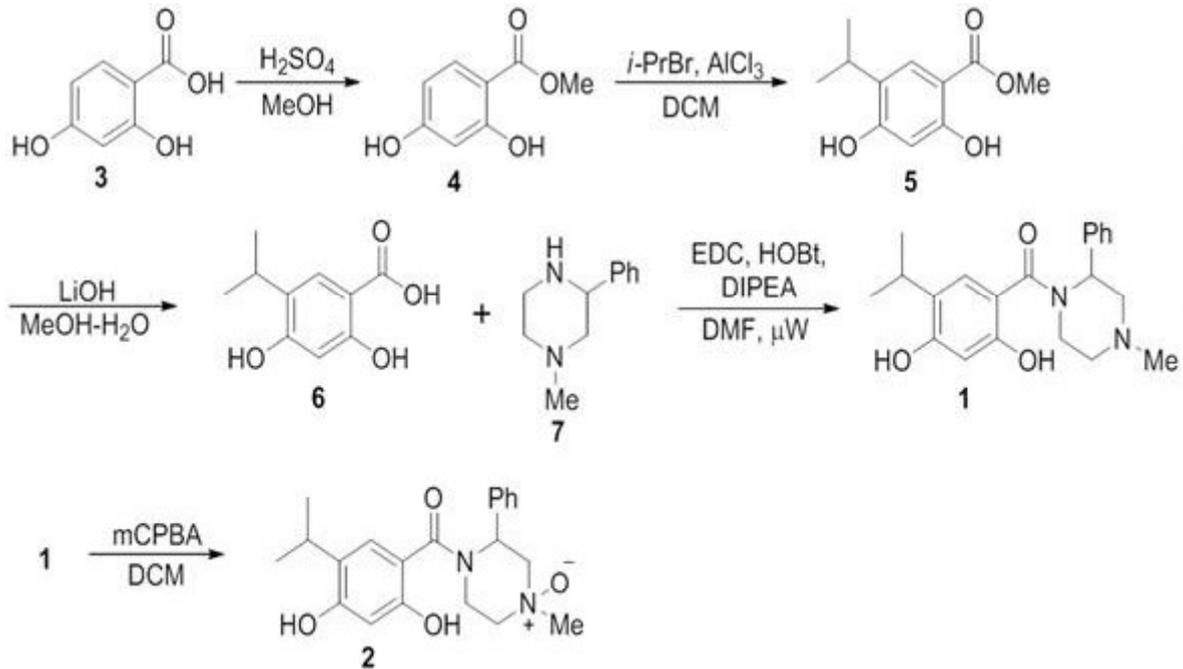


그림 3-22 화합물1과 2의 합성

- (가) 화합물 1과 2는 초기물질 3을 이용해서 그림 3-22의 방법으로 합성됨.
- (나) 황산을 화합물 3에 처리하여 메틸 에스터 4를 합성, 이후 아이소프로필 아민과 루이스산 $AlCl_3$ 를 혼합하여 화합물 5를 완성함.
- (다) 염기조건하에서 화합물 5의 메틸 에스터를 카복실산으로 가수분해함, 이후 EDC를 이용한 아마이드화 반응을 통해서 활성 화합물 1을 완성함.
- (라) 화합물 1에 산화제 mCPBA를 DCM 용매하에서 처리하여 2번째 활성 화합물 2를 완성함.

나. PRRS 바이러스에 대한 화합물1과 2의 항바이러스 효과

- (1) VR2332를 접종한 후 화합물1 이 0.01-0.04 mM 포함된 배지에서 배양된 MARC-145 세포에서 PRRSV의 증식이 유의성 있게 감소하였고 0.06-0.08 mM 화합물1이 포함된 배지에서 배양된 MARC-145 세포에서는 PRRSV의 증식이 완전히 억제되었다 (그림 3-23). 또한 VR2332를 접종한 후 화합물1 이 0.01-0.08 mM 포함된 배지에서 배양된 PAM 세포에서 PRRSV의 증식이 완전히 억제되었다.
- (2) VR2332를 접종한 후 화합물2 이 0.01-0.08 mM 포함된 배지에서 배양된 MARC-145 세포에서 PRRSV의 증식이 유의성 있게 감소하였고, VR2332를 접종한 후 화합물2 이 0.01-0.08 mM 포함된 배지에서 배양된 PAM 세포에서 PRRSV의 증식이 완전히 억제되었다.

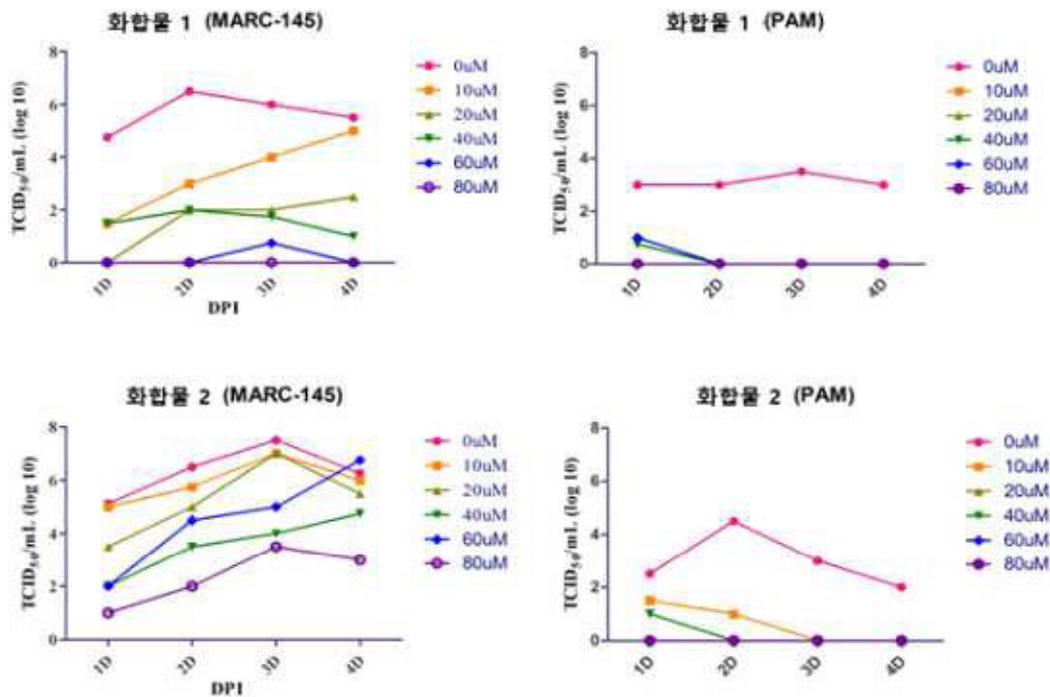


그림 3-23. 화합물 1과 2의 복미형 VR2332 바이러스를 이용한 MARC-145와 PAM 세포에서의 증식 저해 평가

다. 화합물1과 2의 세포독성 평가

- (1) 화합물1과 2의 세포독성을 평가하였다. 즉, MARC-145 세포를 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mM의 6개의 다른 농도로 로 준비된 각각의 화합물을 첨가한 RPMI 배양 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 매 24 시간 마다 상층액을 수거하여 -80°C 에 보관하였다가 모두 함께 cytotoxicity assay kit (Cytotox-Glo™, Promega)를 이용하여 세포독성을 측정하였다.
- (2) 화합물1과 2이 0-0.08 mM의 농도로 포함된 배지에서 MARC-145와 PAM 세포를 24시간 또는 48시간 동안 배양한 결과 화합물1과 2이 포함되지 않은 세포와 비교하여 유의성있는 세포독성이 관찰되지 않았다 (그림 3-24).
- (3) 바이러스 단백질은 숙주세포에서 새롭게 발현 되어질 때 folding과 maturation을 위해서 열충격 보호 단백질의 보호기능에 의존하며, 바이러스 증식에 Hsp90 단백질이 중요하게 작용한다고 보고됨
- (4) 세포내에 존재하는 단백질에 비해 바이러스 단백질들은 매우 민감한 Hsp90 의존성을 보이고, 바이러스는 증식을 위해 한정된 시간에 다량의 단백질을 발현시키기 위해서 열충격 단백질 (Hsp90)의 도움이 필수적이며, 본 연구팀에서는 Hsp90를 표적으로 하는 항바이러스 화합물 2종 도출

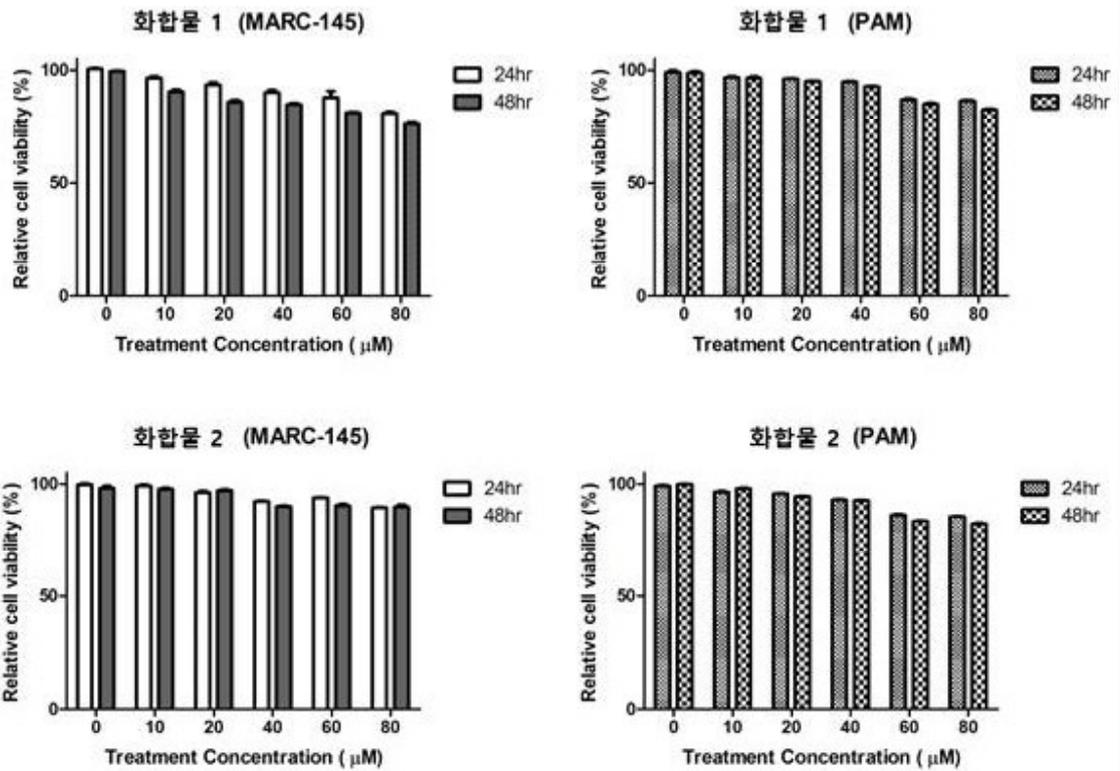


그림 3-24. 화합물 1과 2의 MARC-145 와 PAM 세포에서의 독성평가

라. PRRSV 3CLSP protease in vitro 활성평가를 통해 3종의 선도물질 도출

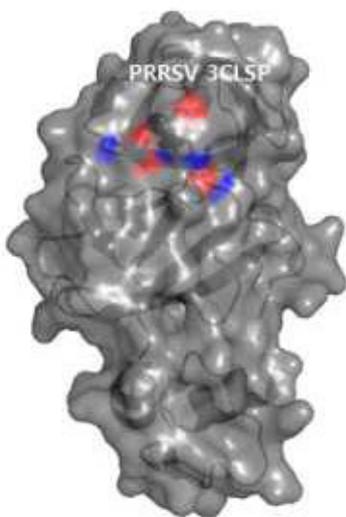
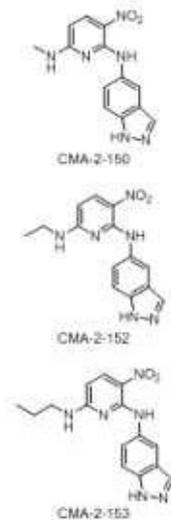


Table 1. PRRSV 3CLSP inhibitory activity of compounds

Compounds	PRRSV 3CLSP, IC ₅₀ (μM) ^a
JJH 6-33	30% at 200 μM
93PSV-3-33	NA ^b
CMA 2-150	32.5 ± 2.2
CMA 2-152	36.0 ± 1.5
CMA 2-153	41.0 ± 3.5
OYJ-01	NA
OYJ-02	NA
OYJ-03	NA

^a IC₅₀ (50% inhibitory concentration) values of compounds represent the concentration that caused 50% enzyme activity loss

^b NA, no activity



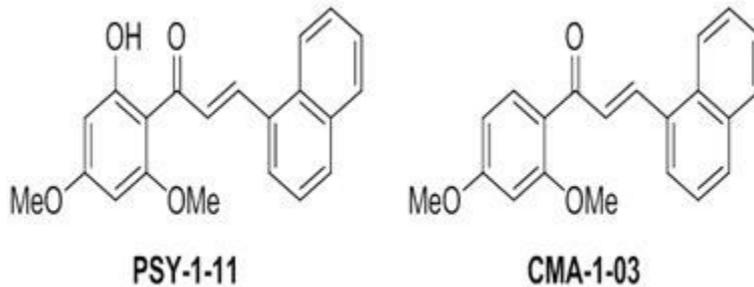
PRRSV 3CLSP protease 단백질을 이용한 활성 평가

(1) 2009년 지놈 분석 연구를 통해 3C-like serine protease (3CLSP) 단백질이 PRRSV의 증식에 매우 중요하게 작용한다고 보고되었고, Gao 연구팀에 의해 3CLSP 단백질의

x-ray 결정 구조가 밝혀짐

- (2) 본 연구팀은 생명공학연구원 연구팀과의 협동연구를 통해 PRRSV 3C-like serine protease (3CLSP)을 기능을 저해하는 3종의 선도물질을 도출함 (IC50 32-41 uM)
- (3) 도출된 3종의 화합물은 모두 피리딘을 기본 골격을 가지는 화합물로서 상업화가 가능한 항바이러스 약물 개발을 위해서는 구조의 최적화 과정을 필요로 함

마. 2종의 선도물질의 용해도 개선 및 활성평가

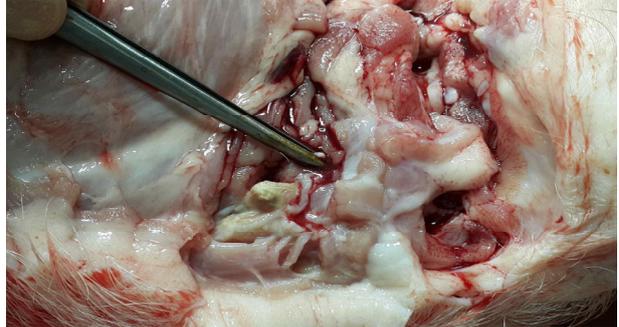


화합물	용매	농도
PSY-1-11	methyl pyrrolidinone	10 mg/mL
PSY-1-11	caprylic-capryl triglyceride	10 mg/mL
CMA-1-03	methyl pyrrolidinone	50 mg/mL
CMA-1-03	caprylic-capryl triglyceride	3 mg/mL

- (1) 선도물질 PSY-1-11과 CMA-1-03는 in vitro와 in vivo 활성 평가 실험에서 PRRS 바이러스 증식을 억제하는 활성을 나타냄. 하지만, 고농도 in vivo 접종 실험에서 화합물이 용해도의 문제로 인해 석출됨이 관찰됨.
- (2) 화합물 석출의 문제점을 해결하기 위해 계명대학교 약학대학 이상길 교수님 연구팀과 협동 연구를 진행.
- (3) 체내에 무해한 용매를 사용하여 PSY-1-11과 CMA-1-03 화합물을 용해시켜, 자돈에 1 ml씩 3회에 걸쳐 접종한 결과 접종 부위에서 석출이 관찰되지 않음(그림 3-25).



PSY-1-11(개선 전)



CMA-1-03(개선 전)



PSY-1-11(개선 후)



CMA-1-03(개선 후)

그림 3-25. 선발물질의 용해도 개선 및 평가

제 4절. 3년간 연구수행 내용 및 연구성과 종합평가

1. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집 (제1세부)

가. 3년간 연구수행 내용 및 연구성과 요약 및 성과

(1) 정성적 연구성과

- (가) 전국 542개 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 PRRSV 발생 양돈장의 역학적 특성을 분석
- (나) PRRSV 110주 분리 및 542주 ORF5 유전자 분석
- (다) PRRSV의 면역학적 병리학적 특성 분석 방법 구축
- (라) 국가동물방역시스템(KAHIS)에 PRRSV 바이러스 및 유전자 बैं킹 시스템의 구축
- (마) NGS를 이용한 효과적인 PRRSV 전체염기서열 분석 시스템 구축
- (바) PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 개발을 위한 농장 평가 설문서 개발
- (사) 양돈장 방문조사를 통한 PRRS 위험도 평가 관련 역학정보 수집

(2) 정량적 연구 성과

- (가) 특허, 논문, 유전자원 등록 성과

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	폐지생식시호흡기증후군 바이러스 저항성 개체 판별용 조성물	전북대		대한민국		2015.03.31 (특허출원)	공동	10-2015-00 45355

2	논문	Chylous Ascites in a hedgehog (Atelerix Albiventris)	전북대	교신저자	Journal of Zoo and Wildlife Medicine	0.424	2014.12.01	공동	SIC
3	논문	Application of next generation system for full-length sequencing of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses	전북대	교신저자	한국가축위생학회지		2014.12.31	단독	비SCI
4	논문	Effects of ribavirin on the replication and genetic stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus	전북대	교신저자	BMC Veterinary Research	1.777	2015.02.07	공동	SCI
5	논문	The Attenuation Phenotype of a Ribavirin-Resistant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Is Maintained during Sequential Passages in Pigs	전북대	교신저자	Journal of Virology	4.606	2016.02.17	공동	SCI
6	논문	Attempt to enhance cross protection against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus using chimeric viruses containing structural genes from two antigenically distinct strains	전북대	교신저자	Vaccine	3.624	2016.07.20	공동	SCI
7	논문	Evaluation of the cross-protective efficacy of a chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus constructed based on two field strains	전북대	교신저자	Viruses	3.042	2016.08.22	공동	SCI
8	논문	돼지생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)의 전장 유전체 염기서열(Whole-genome sequencing) 분석을 위한 차세대 염기서열 분석법의 활용	전북대	교신저자	한국가축위생학회지		2016.03.31	단독	비SCI
9	유전자원 등록	국가동물방역통합시스템(www.kahis.go.kr)에 80주의 ORF5 유전자 염기서열 등록 완료	검역본부		대한민국	단독	2014.06.18	단독	C14002081~C14002161
10	바이	한국수의유전자원은행(K	검역본부		대한민국	단독	2014.06.18	단독	KVCC-VR14

	러스 등록	VCC)에 30주의 바이러스 분리 및 등록 완료							00017 ~46
11	유전 자원 등록	국가동물방역통합시스템 (www.kahis.go.kr)에 80주의 ORF5 유전자 염기서열 등록 완료	검역본부		대한민국	단독	2015.06.11	단독	C15002277~ C15002440
12	바이 러스 등록	한국수의유전자은행(K VCC)에 40주의 바이러스 분리 및 등록 완료	검역본부		대한민국	단독	2015.06.26	단독	KVCC-VR15 00049 ~88
13	유전 자원 등록	국가동물방역통합시스템 (www.kahis.go.kr)에 299주의 ORF5 유전자 염기서열 등록 완료	검역본부		대한민국	단독	2016.06.11	단독	C15002448~ C15002747
14	바이 러스 등록	한국수의유전자은행(K VCC)에 40주의 바이러스 분리 및 등록 완료	검역본부		대한민국	단독	2016.06.26	단독	KVCC-VR15 00089 ~128
15	기술 실시	FMD SP ELISA Kit 민감도 및 특이도 평가 기술이전	(주)바이오 노트		대한민국		2016.10.01.	단독	

(나) 학술대회 발표 성과

번호	구분 (국내, 국제 학술회의)	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명	소속 기관명
1	국제 학술회의		Comparison of sensitivity and specificity of PRRSV antibody ELISA kits and application for clinical samples collected from Korean swine farms	2014.06.10.	칸쿤, 멕시코	전북대
2	국제 학술회의		Evaluation of protective efficacy of a chimeric porcine reproductive and respiratory syndrome virus constructed based on two Korean field strains	2014.10.10.	서울, 대한민국	전북대
3	국제 학술회의		Evaluation of two commercial PRRSV antibody ELISA kits with samples of known status and singleton reactors	2014.10.16.	제주, 대한민국	전북대
4	국제 학술회의		Next Generation Sequencing of Porcine and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Genomes in Lung Lesions in Pigs	2014.10.16	제주, 대한민국	전북대
5	국제 학술회의		Metastatic Mammary Gland Adenocarcinoma in a Jaguar (Panthera onca)	2014.11.28	대구, 대한민국	전북대
6	국제 학술회의		Validation of Genetic Markers for Pig Resistance to PRRSV Infection	2015.01.13.	San Diego, USA	전북대
7	국제 학술회의		Effect of polymorphisms of GBP1, Mx1 and CD163 genes in pigs infected with PRRSV	2015.10.30.	경주, 대한민국	전북대

8	국제 학술회의		Recent trends in PRRS research	2015.10.30.	경주, 대한민국	전북대
---	---------	--	--------------------------------	-------------	-------------	-----

(다) 인력양성 성과

번호	인력양성명	학위	인력양성년도
1		박사	2016
2		박사	2016
3		박사	2016
4		석사	2016

(라) 교육지도 성과

번호	교육자	교육대상	교육내용	일시	장소, 국명	소속 기관명
1		양돈업 종사자	- 효과적인 질병관리를 위한 PRRSV의 이해	2013.11.06.	대전, 대한민국	전북대
2		양돈수의사	- 주관연구기관 책임연구원의 “PRRS 발병 지도 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답 - PADRAP 개발자 홀캠프 교수의 페드랩 개발 사례 발표 후 질의/응답	2015.04.09.	대전, 대한민국	전북대
3		양돈농장주 및 양돈수의사	- 주관연구기관 책임연구원의 “PRRS 발병 지도 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답 - PADRAP 개발자 홀캠프 교수의 페드랩 개발 사례 발표 후 질의/응답	2015.04.10.	경남 김해, 대한민국	전북대
4		양돈농장주 및 양돈수의사	- 이지팜 책임연구원의 “이지팜의 PRRS 연구 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답 - PADRAP 개발자 홀캠프 교수의 페드랩 개발 사례 발표 후 질의/응답	2015.04.12.	서울, 대한민국	전북대
5		양돈수의사 및 수의과학 연구자	- 이지팜 책임연구원의 “이지팜의 PRRS 연구 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답 - PADRAP 개발자 홀캠프 교수의 페드랩 개발 사례 발표 후 질의/응답	2015.04.13	경기 안양, 대한민국	전북대
6		양돈농장주 및 양돈수의사	- 주관연구기관 책임연구원의 “PRRS 발병 지도 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답	2015.04.24.	서울, 대한민국	전북대
7		양돈농장주 및 양돈수의사	- 주관연구기관 책임연구원의 “PRRS 발병 지도 개발사례” 주제로 발표 후 질의/응답	2015.05.13.	충북 천안, 대한민국	전북대
8		양돈수의사회장단, 운영 및 학술위원	- PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 양돈수의사회 이전을 위한 프로그램 사용 교육	2016.07.12.	서울, 대한민국	전북대
9		양돈관련기업 종사 수의사	-PRRS 발생 위험도 관리에 대한 양돈관련 기업체 교육	2016.07.12.	전북 익산, 대한민국	전북대

나. 종합평가 및 향후 발전방안

(1) 국가동물방역시스템(KAHIS)에 국내 발생 PRRSV 바이러스 분리 시스템과 바이러스 유전자 बैं킹 시스템이 민간진단기관과의 연계가 구축되었으므로 국내 양돈장의

PRRS 감염 정보 수집 및 PRRSV 발생 양돈장의 역학적 특성 분석을 지속적으로 추진할 것임

(2) Porcine alveolar macrophages(PAM)를 이용하여 비교적 편리하게 PRRSV의 면역학 및 병리학적 특성을 분석할 수 있는 평가 시스템이 개발되어있으므로 향후 다양한 PRRSV의 특성을 보다 효과적으로 분석할 수 있는 유용한 도구로 활용할 계획임.

2. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집(제1협동)

가. 3년간 연구수행 내용 요약 및 성과

(1) 정성적 연구성과

(가) PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발

(나) 프로그램의 유용성 확보를 위한 양돈장 PRRS 조사용 설문서 입출력 관리 시스템 개발

(다) 웹 평가시스템 디자인 개선 및 조사대상 양돈장에 대한 정보제공 시스템 확립

(라) 평가모형의 타당성 검증을 위한 양돈장 대상 실증 연구

(마) PRRS 위험도 평가문항 중요도 분석 (로지스틱 회귀 단변량, 다변량 분석)

(바) 평가문항 중요도 분석, 평가모형 수정과 수정된 모형의 판별 성능 검토 및 PRRS 위험도 분석

(사) PRRS 위험도 평가 프로그램과 양돈생산관리프로그램 연계 사업화

(아) 양돈장 현지조사를 통하여 PRRS 위험수준 평가 DB 기반의 위험평가 prototype 모델 개발과 국내 PRRS 발생지도 작성 및 클러스터링 분석

(자) PRRS 발생 지도 시스템 구축 및 실시간 확인이 가능한 휴대폰앱 개발

(차) PRRS 발생 지도 휴대폰앱의 전북대학교 동물질병진단센터에서 자체 사업화

(카) PRRS 위험도 평가 프로그램을 피그플랜에 평가 모듈을 서비스하는 자체 사업화

(2) 정량적 연구 성과

(가) 특허, 논문, 유전자원 등록 성과

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	프로 그램 등록	PRRSV(돼지생식기호흡 기증후군)설문지 입력 프로그램	(주)이지팜		대한민국		2014.05.30 (프로그램 등록)	단독	C-2014-012 514
2	프로 그램 등록	PRRSV(돼지생식기호흡 기증후군) 발병지도	(주)이지팜		대한민국		2015.04.01 (프로그램 등록)	단독	C-2015-011 695
3	기술 실시	PRRSV(돼지생식기호흡 기증후군)위험도 평가	(주)이지팜		대한민국		2016.10.01.	단독	

		시스템 양돈수의사회로 기술이전						
4	사업 화	PRRSV(돼지생식기호흡 기증후군) 위험도 평가 프로그램 양돈수의사회에서 사업화	(주)이지팜		대한민국	2016.10.01.	단독	
5	사업 화	PRRSV(돼지생식기호흡 기증후군) 발생지도 휴대폰 앱의 전북대학교 동물질병진단센터에서 자체 사업화	(주)이지팜		대한민국	2016.10.01.	단독	
6	자체 사업 화	PRRSV(돼지생식기호흡 기증후군) 위험도 평가 프로그램 피그플랜 모듈로 서비스	(주)이지팜		대한민국	2016.10.01.	단독	

(나) 학술대회 발표 성과

번호	구분 (국내, 국제 학술회의)	발표자	발표제목	발표일시	장소, 국명	소속 기관명
1	국제 학술회의		The analysis of PRRS outbreak risk according to breeding system and farm internal/external factors	2016.10.28.	진주, 대한민국	(주)이지팜
2	국내 학술회의		로지스틱 회귀분석을 이용한 국내 양돈농가의 돼지생식기호흡기증후군 감염 위험요인 분석	2016.10.20.	대전, 대한민국	(주)이지팜

나. 종합평가 및 향후 발전방안

- (1) 국내 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 PRRSV 발생 양돈장의 역학적 특성을 분석
이 가능한 한국형 PRRS 발생 위험도 평가 프로그램을 성공적으로 개발하였음
- (2) PRRS 발생 위험도 평가 프로그램은 현재 양돈수의사회에 기술이전되어 홈페이지에
게시되어 있어 향후 농림축산식품부의 정책적인 지원을 통해 양돈전문수의사들이
PRRS 발생에 효과적으로 대응하는데 큰 도움이 될 수 있도록 활용될 계획임
- (3) PRRS 발생지도 시스템 구축 및 실시간 확인이 가능한 휴대폰앱이 개발됨
- (4) 개발 PRRS 발생지도 휴대폰앱은 전북대학교 동물질병진단센터에서 자체 사업화를
추진하여 (주)이지팜에서 사업화하고 있는 사양프로그램인 피그플랜에 연계하여
PRRS 발생과 사양관련 데이터를 연계하여 PRRS 발생에 따른 생산성의 변화 분석
체계를 구축할 계획임

3. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집 (제 2/3협동)

가. 3년간 연구수행 내용 요약

(1) 정성적 연구성과

- (가) 후보물질의 항바이러스 효능 및 안전성 평가를 위한 실험실 및 동물실험 평가기법 확립
- (나) 항바이러스 물질의 약리학적 특성 분석 및 체내 잔류 평가기법 확립
- (다) 세포를 이용한 실험실적인 평가법에서 효능과 안전성이 인정된 후보물질들을 7종을 선발하였고 이중 4종의 물질은 목표동물인 돼지를 이용하여 항바이러스 효능 및 안전성에 대한 평가를 수행함
- (라) 선발물질 중 용해도에 문제가 있는 물질들에 용해도 개선법 및 활성 평가법 구축

(2) 정량적 연구성과

(가) 특허 성과

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	SY029를 유효성분으로 함유하는 항바이러스 조성물	계명대		대한민국		2014.07.10 (특허출원)		10-2014-01 2514
2	특허	가축 바이러스 질환 예방 또는 치료용 조성물	계명대		대한민국		2015.07.01 (특허출원)		10-2015-00 93923
3	특허	신규 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항바이러스성 조성물	계명대		대한민국		2016.08.31. (특허출원)		10-2016-01 12019

나. 종합평가 및 향후 발전방안

- (가) 후보물질의 항바이러스 효능 및 안전성 평가를 위한 실험실 및 동물실험 평가기법과 항바이러스 물질의 약리학적 특성 분석 및 체내 잔류 평가기법을 확립하였음
- (나) PRRSV의 증식 억제에 효과적인 후보물질들을 7종을 선발하였고 이중 4종의 물질은 목표동물인 돼지를 이용하여 항바이러스 효능 및 안전성을 확인함
- (다) 향후 선발물질들의 용해도 개선과 구조를 지속적으로 변경하여 항바이러스 효과를 개선하기 위한 연구를 후속연구를 활용하여 지속할 계획임

제 4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

제 1절. 목표달성도

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
국내 PRRSV의 특성 분석과 유전자 및 바이러스 बैं킹 시스템의 구축 (1세부)	○ 전국 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집과 PRRSV 발생 양돈장의 역학적 특성 분석 및 바이러스와 유전적 정보 데이터베이스화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 총 541개 양돈장에서 PRRSV 감염 상황을 분석 - 542주 바이러스의 ORF5 유전자를 분석하여 PRRSV 변이 추적 시스템과 연계 - 110주의 PRRSV를 분리하여 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁 - Next generation system(NGS)를 이용한 유럽형 및 북미형 PRRSV 전체 염기서열 분석 시스템 개발 - 현재까지 4주의 북미형 바이러스의 전체 유전자 분석완료 및 GenBank등록
	○ PRRSV의 면역지표 분석 및 병원성 및 면역원성 관련 지표 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지에서 분리한 PAM 세포들을 이용한 PRRSV의 면역학 및 병리학적 특성 분석법 구축 - 구축된 그룹별 세포들을 표준 및 야외 바이러스들에 노출시켜 싸이토카인 발현을 real-time PCR과 ELISA를 이용하여 평가 - 표준 바이러스들의 돼지를 이용한 공격감염을 바탕으로 PAM, PBMC, 혈청의 싸이토카인 발현을 real-time PCR과 ELISA를 이용하여 평가 - 항혈청을 생산 및 교차 바이러스 감염 중화능 검사를 실시하여 야외 바이러스들의 면역학적 분류 수행
	○ 양돈장 방문조사를 통한 PRRS 위험도 평가 관련 역학정보 수집	100	<ul style="list-style-type: none"> - 연 간 약 200개 총 600개의 국내 양돈장을 대상으로 위험도 평가 및 역학정보 수집 수행
PRRS 발병지도 작성을 위한 국내 양돈장의 사육환경 평가와 한국형 질병발생 위험도 평가 프로그램 개발 (1협동)	<ul style="list-style-type: none"> ○ PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발 ○ 평가모형의 타당성 검증을 위한 양돈장 대상 실증 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 프로그램의 유용성 확보를 위한 양돈장 PRRS 조사용 설문서 입출력 관리 시스템 개발 - 웹 평가시스템 디자인 개선 및 조사대상 양돈장에 대한 정보제공 시스템 확립 - 제 1 세부의 유전자 정보를 통합한 PRRS 평가 프로그램 개발 - DB 기반의 조사대상 양돈장의 PRRS 위험수준 평가 및 평가모형 수정안 작성 - 개발된 모형의 타당성 검증을 위한

			양돈장 대상 실증 연구 및 최종모형 작성 - PRRS 위험도 평가 프로그램과 양돈생산관리프로그램 연계 사업화
	○ PRRS 발병지도 작성 및 발생 클러스터링 분석	100	- PRRS 발병지도 모바일(안드로이드) 프로그램 개발 - PRRS 유전자 정보 및 생축 이동 흐름을 통합한 국내 발병지도 작성 - 수집된 정보를 이용한 PRRS 발생 클러스터링 분석 및 PRRS 위험도 예측체계 개발
PRRSV 감염 억제 천연물 유도체 및 합성물질 개발 및 평가 (2협동)	○ 동물실험을 통한 2종 이상의 PRRSV 치료물질 발굴	100	- 3년간 연구수행 결과 완성된 화합물 라이브러리중 효능과 안전성이 뛰어난 물질 7종 발굴
	○ 선별된 화합물의 정밀 평가 및 개선	100	- 동물모델을 이용하여 투여시기, 투여량 및 투여경로를 결정 - 고농도 동물 투여 시 결정화되는 화합물의 용해도의 향상을 위한 연구 수행
PRRSV 감염억제 물질의 효능평가 및 현장 적용법 개발 (3협동)	○ 합성 PRRSV 치료제들에 대한 효능 및 안전성 평가 진행	100%	- 합성 화합물들의 MARC-145 및 PAM 세포를 이용한 항바이러스 효능 및 세포독성 평가법 구축 및 평가 수행 - 화합물의 바이러스 공격접종에 대한 치료 효과와 안전성을 동물실험을 이용하여 평가 수행 - 선발 화합물의 다양한 접종량과 투여경로를 사용하여 효능과 안전성 평가 수행

제 2절. 관련분야 기여도

1. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 발생 바이러스 बैं킹 시스템 구축

- 가. 전국 541개 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 PRRSV 발생 양돈장의 특성을 분석
- 나. PRRSV 110주 분리 및 542주 ORF5 유전자 분석
- 다. PRRSV의 면역학적 병리학적 특성 분석 방법 구축
- 라. 국가동물방역시스템(KAHIS)에 PRRSV 바이러스 및 유전자 बैं킹 시스템의 구축
- 마. NGS를 이용한 효과적인 PRRSV 전체염기서열 분석 시스템 구축
- 바. PRRS 발생 위험도 평가 프로그램 개발을 위한 농장 평가 설문서 개발
- 사. 양돈장 방문조사를 통한 PRRS 위험도 평가 관련 역학정보 수집

2. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집

- 가. PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발
- 나. 프로그램의 유용성 확보를 위한 양돈장 PRRS 조사용 설문서 입출력 관리 시스템 개발

- 다. 웹 평가시스템 디자인 개선 및 조사대상 양돈장에 대한 정보제공 시스템 확립
- 라. 평가모형의 타당성 검증을 위한 양돈장 대상 실증 연구
- 마. PRRS 위험도 평가문항 중요도 분석 (로지스틱 회귀 단변량, 다변량 분석)
- 바. PRRS 위험도 평가 프로그램과 양돈생산관리프로그램 연계 사업화
- 사. 양돈장 현지조사를 통하여 PRRS 위험수준 평가 DB 기반의 위험평가 prototype 모델 개발과 국내 PRRS 발생지도 작성 및 클러스터링 분석
- 아. PRRS 발생 지도 시스템 구축 및 실시간 확인이 가능한 휴대폰앱 개발
- 자. PRRS 발생 지도 휴대폰앱의 전북대학교 동물질병진단센터에서 자체 사업화
- 차. PRRS 위험도 평가 프로그램을 피그플랜에 평가 모듈을 서비스하는 자체 사업화

3. PRRS 감염을 제어할 수 있는 PRRSV 항바이러스 제제 개발 및 평가 방법 구축

- 가. 후보물질의 항바이러스 효능과 안전성 평가를 위한 평가기법 확립
- 나. 항바이러스 물질의 약리학적 특성 분석 및 체내 잔류 평가기법 확립
- 다. 세포를 이용한 실험실적인 평가법에서 효능과 안전성이 인정된 후보물질들을 7종을 선발하였고 이중 4종의 물질은 목표동물인 돼지를 이용하여 항바이러스 효능 및 안전성에 대한 평가를 수행함
- 라. 선발물질 중 용해도에 문제가 있는 물질들에 용해도 개선법 및 활성 평가법 구축

세부 과제명	세부연구항목	국내·외 기술개발현황	우월성	기여도
국내 PRRSV의 특성 분석과 유전자 및 바이러스 बैं킹 시스템의 구축 (1세부)	전국 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집과 PRRSV 발생 양돈장의 역학적 특성 분석 및 데이터베이스화	○ 국내에는 아직 체계적인 PRRS 감염 정보 수집 및 분석 시스템이 존재하지 않음	○ PRRSV 유전자 및 분리 바이러스 시스템을 이용하여 전국 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집과 유행 바이러스 분리 및 유전자 데이터베이스화 계속	<ul style="list-style-type: none"> - 2016년 9월까지 541개 양돈장에서 PRRSV 감염 상황을 분석 - 542주 바이러스의 ORF5 유전자를 분석하여 PRRSV 변이 추적 시스템과 연계 - 110주의 PRRSV를 분리하여 한국수의유전자원은행(KVCC)에 기탁
	PRRSV의 면역지표 분석 및 면역원성 분석	○ 국내외적으로 아직 효과적인 PRRSV 특성분석을 위한 지표 및 분석 방법이 구축되어 있지 않음	○ 병원성과 면역원성이 상이한 표준 PRRSV들의 PAM 세포를 이용한 실험실적 면역지표 분석 방법의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지에서 분리한 다양한 세포들을 MHC type에 따라 분류하고 계통을 수립하여 개체 동물의 생물학적인 차이를 모방할 수 있는 실험실 모델 구축 - 구축된 그룹별 PAM 세포에 표준 및 야외 바이러스들에 노출시켜 싸이토카인 발현을 real-time PCR과 ELISA를 이용하여 평가

			<ul style="list-style-type: none"> ○ 병원성과 면역원성이 상이한 표준 PRRSV들의 동물 이용한 면역지표 분석 방법의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 표준 바이러스들의 돼지를 이용한 공격감염을 바탕으로 PAM, PBMC, 혈청의 싸이토카인 발현을 real-time PCR과 ELISA를 이용하여 평가 - 항혈청을 생산 및 교차 바이러스 감염 증화능 검사를 실시하여 야의 바이러스들을 면역학적으로 분류
<p>PRRSV 발생 지도 작성을 위한 국내 양돈장의 사육환경 평가와 한국형 질병발생 위험도 평가 프로그램 개발 (1협동)</p>	<p>PRRS 제어를 위한 위험평가 프로그램 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 북미지역에서는 이미 질병 위험도 평가 프로그램이 구축되어 질병제어를 위해 효과적으로 활용되고 있으나 국내에서는 아직 체계적인 평가 프로그램이 존재하지 않음 	<ul style="list-style-type: none"> ○ PRRS 조사용 설문서 입출력 관리·평가 시스템 개발 및 양돈수의사회 홈페이지와 연계 ○ PRRS 발병지도에 실시간 유전자 정보(검사 결과) 데이터 반영 ○ PRRS 위험도 평가 프로그램과 양돈생산관리프로그램의 연계 사업화 전략 수립 	<ul style="list-style-type: none"> - PRRS 조사 설문서 입출력 관리·평가 시스템 개발 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 시스템 재구축으로 기존 시스템을 대체 (자료의 유효성 검증과 분석 기능, 설문서 관리 기능 강화) ▪ PRRS 상태, 농장 규모, 사육 형태 별 비교 기능 구현 ▪ 양돈수의사회 홈페이지와 연계하여 사용자 접근성 향상 및 디자인 개선 - PRRS 발병지도 안드로이드 어플리케이션에 실시간 유전자 정보 데이터 반영 - 양돈생산관리프로그램(피그플랜) PRRS 위험도 평가 및 PRRS 예측 서비스 사업화
	<p>PRRS 발병지도 작성 및 발생 클러스터링 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내에는 아직 체계적인 전국단위의 PRRS 발생 지도 시스템이 존재하지 않음 	<ul style="list-style-type: none"> ○ PRRS 유전자 정보 및 생축 이동 흐름을 통합한 국내 발병지도 작성 ○ 수집된 정보를 이용한 PRRS 발생 클러스터링 분석 및 PRRS 위험도 예측체계 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 2개 병성감정기관(전북대, 읍티팜)으로부터 PRRS 검사결과 (유전형 포함) 수집 - 농장 정보 및 생축 이동 흐름은 개인정보 보호 관련 정책당국 및 생산자단체(대한한돈협회), 한국양돈수의사회 의 동의를 얻기 위해 정책협의 - PRRS 위험도 평가 프로그램 정보 연계 - 공개된 도축장, 종돈장 등 축산시설 위치정보 수집 및 GIS 위치 서비스 - 시계열, 지역별 통계 차트 및 그래프 보고서 출력
<p>PRRSV 감염 억제 천연물</p>	<p>동물실험을 이용한 PRRSV 치료효과 및</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외적으로 아직 PRRS에 효과적인 항바이러스 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1세부와 3협동 연구팀이 보유하고 있는 동물모델을 	<ul style="list-style-type: none"> - 총 7종의 신규 물질을 선별하였고 이 중 4종의 화합물에 대한 동물실험을 진행하여 효능 및 안전성을 확인함

유도체 및 합성물질 개발 및 평가 (2협동)	방어효능 검증		이용하여 효능평가 및 약물의 물성 검증	- 선발물질의 용해도 및 활성도 개선 방법 수립
	선발물질의 현장적용 및 최적화		○ 평가결과에 따른 약물의 효능 및 물성 개선	- 농장적용을 위한 화합물의 대량생산 - 세포실험 결과를 기초로 투여시기, 투여량, 투여경로를 결정. - 약물의 효능 및 안전성 개선
PRRSV 감염억제 물질의 효능평가 및 현장 적용법 개발 (3협동)	합성 PRRSV 항바이러스 물질들에 대한 효능 및 안전성 평가 진행	제제가 개발되어 있지 않으며 체계적인 효능 및 안전성 평가 방법이 구축되어 있지 않음	○ 선발 천연물 또는 천연물 유도체의 MARC-145 및 PAM 세포를 이용한 항바이러스 효능 및 세포독성 평가 수행 ○ 실험실적인 평가에서 선발된 물질의 동물실험을 통한 치료 및 방어 효능 평가 수행	- 1차년도 평가 결과로 선별된 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50 등의 3종의 화합물 외에 이들과 유사한 구조로 합성된 아래의 목록에 보여지는 15종의 화합물을 대상으로 평가가 진행 중임 - 1차년도에서 선별된 93PSY-1-11, CMA-1-3, JJH-2-50 등의 3종의 화합물은 dose와 투여경로 등에 변화를 주며 동물을 이용한 항바이러스 효능 평가를 진행하였음 - 그 외 15종의 화합물은 MARC-145와 PAM 세포주를 이용하여 활성평가 및 효능이 우수한 구조의 화합물의 선별이 진행 중임

제 5장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

1. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 바이러스 데이터베이스 시스템의 향후 개발 및 활용 계획(제1세부)
 - 가. 국가동물방역시스템(KAHIS)에 국내 발생 PRRSV 바이러스 분리 시스템과 바이러스 유전자 बैं킹 시스템이 민간진단기관과의 연계가 구축되었으므로 국내 양돈장의 PRRS 감염 정보 수집 및 PRRSV 발생 양돈장의 역학적 특성 분석을 지속적으로 추진할 것임
 - 나. Porcine alveolar macrophages(PAM)를 이용하여 비교적 편리하게 PRRSV의 면역학 및 병리학적 특성을 분석할 수 있는 평가 시스템이 개발되어있으므로 향후 다양한 PRRSV의 특성을 보다 효과적으로 분석할 수 있는 유용한 도구로 활용할 계획임
2. PRRS 위험도 평가 시스템과 발병지도 시스템의 향후 개발 및 활용 계획(1협동)
 - 가. 지금까지 개발된 위험도 평가 시스템과 발병지도 시스템을 직접적인 사용자가 될 수 의사와 농장주의 의견 수렴하기 위하여 한돈 협회와 양돈수의사회와 협의를 진행하였음
 - 나. 따라서 개발된 시스템은 최종 양돈수의사회에 기술이전을 통해 관리를 이전하고 각 회의 회원들이 회원등록을 통해 사용할 수 있도록 결정하였음
 - 다. 또한 위험도 평가의 주체가 되는 수의사들은 회원 등록 전에 평가 시스템에 대한 이해도를 높이기 위해 교육을 의무적으로 받도록 규정을 만들어 평가의 수준이 일정할 수 있도록 진행할 계획임
 - 라. PRRS 발병지도 시스템과 관련하여서는 참여 수의사와 농장주 모두 개발된 시스템의 활용에 긍정적이고 기대를 가지고 있으나 개인정보 노출에 대한 걱정과 농장질병정보 유출 시 받을 수 있는 이동제한 등의 제제에 대해 우려를 하고 있는 상황임
 - 마. 이에 성과활용 주체인 농림축산부 방역총괄과와 성과활용 회의를 통하여 이러한 문제점을 전달하였고 PRRS 등의 3종 가축전염병에 대한 이동제한 등의 제제의 완화에 관한 법이 최종 발표되었음
 - 바. 따라서 개발된 발병지도 시스템은 전북대 동물질병진단센터에서 일단 자체 사업화를 시작하여 개인정보 노출을 최대한 제한한 상태에서 계속 사업화를 진행할 예정이며 향후 KAHIS에 통합할 수 있는 시스템의 구축을 위해 노력할 계획임
 - 아. PRRS 위험도 평가 시스템을 Pigplan 양돈생산관리프로그램 사용 농가가 자체적으로 평가를 받고자 하는 수요가 있을 것으로 예상되어 Pigplan 프로그램에 모듈을 만들어 자체평가를 할 수 있도록 서비스를 개시하여 평가 횟수에 따른 요금을 추가 징수할 계획으로 사업화를 진행하였음
2. 국내 양돈장의 PRRS 감염상황 분석 및 양돈장 정보 수집 (제 2/3협동)
 - 가. 후보물질의 항바이러스 효능 및 안전성 평가를 위한 실험실 및 동물실험 평가기법과 항바이러스 물질의 약리학적 특성 분석 및 체내 잔류 평가기법을 확립하였음
 - 나. PRRSV의 증식 억제에 효과적인 후보물질들을 7종을 선발하였고 이중 4종의 물질은

목표동물인 돼지를 이용하여 항바이러스 효능 및 안전성을 확인함

- 다. 향후 선발물질들의 용해도 개선과 구조를 지속적으로 변경하여 항바이러스 효과를 개선하기 위한 연구를 후속연구를 활용하여 지속할 계획임
- 라. 선발된 합성물질은 후속과제를 수행하며 계속 평가를 진행할 예정이며 새로운 물질의 합성 및 평가도 계속 진행할 예정임

제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

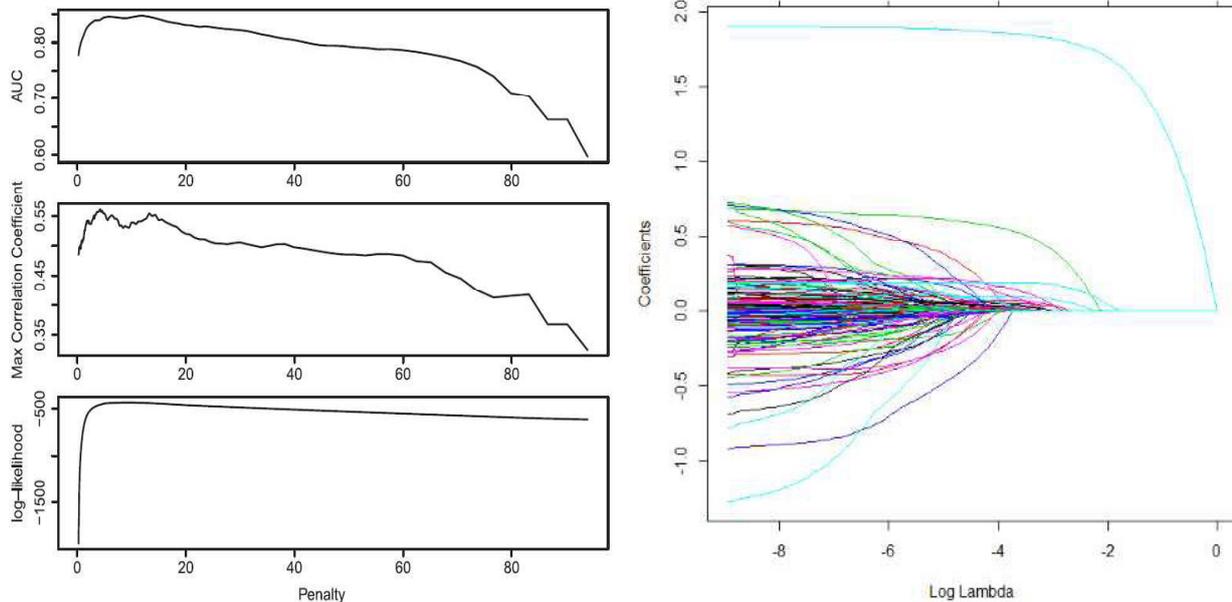
코드번호

D-08

○ 국내 PRRS 위험도 평가 프로그램 및 발병지도 개발을 위한 PADRAP 개발자 홀캠프 교수의 패드랩 개발 사례 교육

- Group Lasso 알고리즘

- Lasso 방법은 선형회귀에서 입력변수의 수가 많아서 줄야야 하거나 상관관계가 높은 변수들이 많이 포함되어 있는 경우 적절한 결과를 제공하도록 고안된 방법으로 Group Lasso는 특정 변수들을 그룹화하여 처리할 수 있기 때문에 명목변수를 더미변수화하여 Group으로 지정하여 처리할 수 있음
- 기본적으로 Sum of Square Error가 일정값(s) 이하인 제약 조건에서 변수를 선별함
- 제약조건에 부합하도록 회귀계수를 일정값 이하가 되도록 강제하여 가중치 부여함
- 또는 회귀계수가 작은 변수는 계수값이 0이 되어 제거됨
- 제약조건(패널티)의 정도를 나타내는 λ 값(or S값)을 결정하는 것이 중요한 이슈로 AUC, Max Correlation Coefficient, log-likelihood 값의 변화량을 이용해 결정함

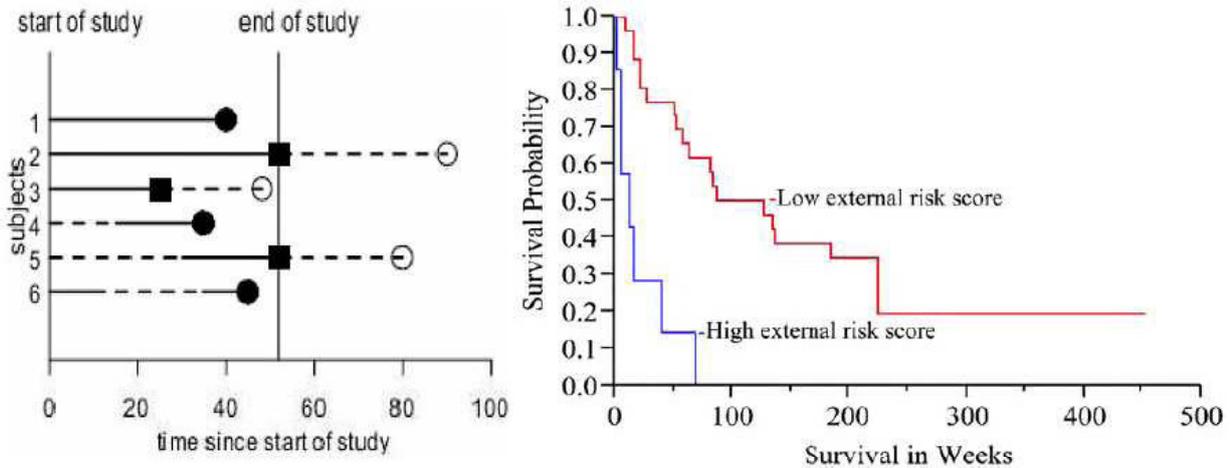


- PADRAP 연구에서는 전체 127개의 설문문항 중 74개 문항의 회귀계수값이 0으로 추정되어 PRRS 위험도 판별에서 판별력이 낮은 문항인 것으로 분석되었으며, ROC 커브의 정확도 지수인 AUC값이 0.848로 전문가의견(0.696), 유의변수를 이용한 Logistic 회귀분석(0.807)보다 더 나은 성능을 보여주었음

- Survival Analysis와 Hazard 모형

- Survival analysis는 생존기간, 실업기간과 같은 기간 형태 데이터 분석에 사용되는데 PADRAP 연구에서는 PRRS가 음성에서 양성이 될 때까지의 기간 데이터로 분석하였음
- 이 경우 생존 종료은 측정기간 내에 관측이 되지만 생존 지속은 측정기간 이후에 발생가능한 것이므로 잘린 형태의 데이터가 되어 Bias가 발생하게 되므로 잘린 기간으로 인한 Bias 해소를 위해 Survival Analysis를 사용하게 됨

- PADRAP 연구에서는 PRRS 양성 발생에 영향을 미치는 요인 중 외부위험요인을 중요 요인으로 보았고 해당 변수로 관측치를 구분하여 Kaplan-meier survival curve를 비교한 결과 낮은 외부위험점수를 가진 농장의 생존율이 높은 것으로 나타남



- Hazard 모형은 특정 기간 내에 이벤트 발생 확률(Hazard rate)을 추정하고, 여러 독립변수가 그것에 미치는 영향의 유의성 분석하는 방법으로 Cox-proportional hazard 회귀모형이 가장 많이 사용됨
- PADRAP 연구에서는 PRRS 양성 발생에 영향을 미치는 요인을 3가지를 선정하여 Hazard 회귀 계수를 추정한 결과 외부위험요인만 유의확률 95%에서 유의한 것으로 나타났음

Cox Proportional Hazards multivariate regression analysis for introduction of PRRS virus into virus-free breeding herd sites in a study of 33 herds in MN, IA and CO, 2000-2009.

Parameter	b	S.E.	Hazard ratio (HR)	95% CI	p-Value
External risk score					
Low					
High	2.24	0.57	9.40	2.98-29.22	<0.001
Season site was established PRRS virus-free					
Non-winter					
Winter	0.90	0.47	2.46	0.95-6.13	0.055
Method					
Complete depop-repop					
New site start-up	0.89	0.47	2.43	0.92-6.07	0.061

- Random Forest 알고리즘

- 의사결정나무(Decision Tree)의 개념에서 진화한 방법으로 의사결정나무가 하나의 훈련 데이터를 학습하여 하나의 트리를 생성하는 것에 반해 Random Forest는 하나의 샘플 데이터에서 임의의 복원 샘플링을 통해 다수의 훈련용 데이터를 만들고 다수의 트리를 생성한 후 이를 결합한 결과를 사용함
- 따라서 단일 의사결정나무를 사용하는 것과 비교하여 결과의 분산이 감소하기 때문에 보다 안정적이고 정확도를 높일 수 있으며 의사결정나무의 장점인 명목형 변수에 대한 분류 및 예측이 타알고리즘 대비 우수함
- Random Forest는 종속변수에 영향을 미치는 독립변수들의 상대적 중요도를 측정할 수 있으며, 이를 이용하여 변수선별에 활용할 수 있음

- PADRAP 연구에서는 Random Forest를 이용하여 전체 127개 문항의 상대적 중요도를 산출한 후 중요도가 가장 낮은 문항들을 순차적으로 제외시키면서 판별 모형의 정확도가 유지되는 수준에서의 변별력이 낮은 제외 문항을 선정하였음
- 그 결과 하위 38개 문항까지는 제외하여도 판별 모형의 성능 저하에 유의한 영향을 주지 않는 것으로 분석되었음

Summary of area under the curve (AUC) of all models and difference between AUC of Models 10 through 120 (reduced models) and Model 0 (full model) for classifying sow herds in the U.S. and Canada according to whether they reported clinical PRRS outbreaks in the previous 3 years.

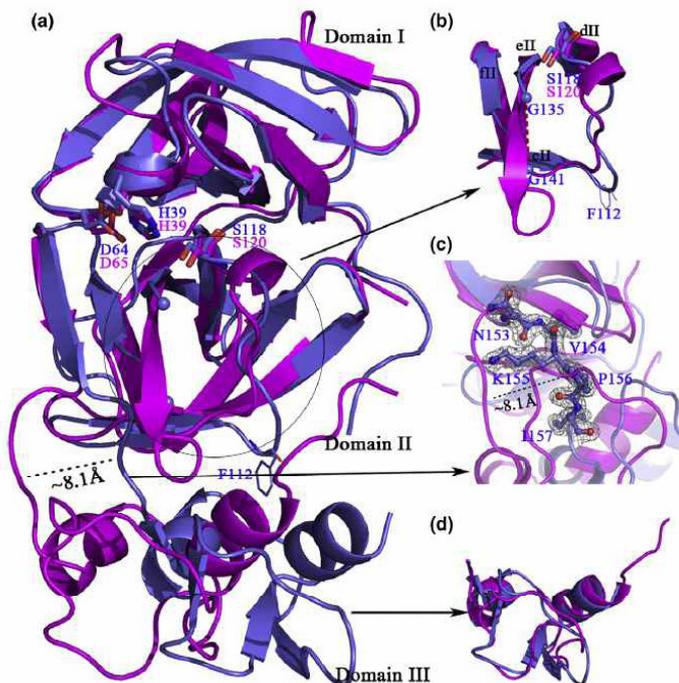
Model	Number of questions	Number of principal components	AUC	95%CI	v.s. Model 0	
					P-value	95%CI
Model 0	127	371	1.00	(1.00, 1.00)	-	-
Model 10	117	355	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 20	107	337	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 30	97	316	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 31	96	314	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 32	95	313	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 33	94	311	1.00	(1.00, 1.00)	0.41	(0.00, 0.00)
Model 34	93	308	1.00	(1.00, 1.00)	0.13	(0.00, 0.00)
Model 35	92	305	1.00	(1.00, 1.00)	0.31	(0.00, 0.00)
Model 36	91	302	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 37	90	299	1.00	(1.00, 1.00)	1.00	(0.00, 0.00)
Model 38	89	295	1.00	(1.00, 1.00)	0.28	(0.00, 0.00)
Model 39	88	292	0.98	(0.97, 0.99)	<.01	(-0.03, -0.01)
Model 40	87	290	0.98	(0.97, 0.98)	<.01	(-0.03, -0.02)
Model 50	77	259	0.94	(0.93, 0.96)	<.01	(-0.07, -0.04)
Model 60	67	234	0.94	(0.92, 0.95)	<.01	(-0.08, -0.05)
Model 70	57	207	0.92	(0.91, 0.94)	<.01	(-0.09, -0.06)
Model 80	47	173	0.91	(0.89, 0.93)	<.01	(-0.11, -0.07)
Model 90	37	143	0.89	(0.87, 0.91)	<.01	(-0.13, -0.09)
Model 100	27	105	0.89	(0.86, 0.91)	<.01	(-0.14, -0.09)
Model 110	17	67	0.85	(0.83, 0.88)	<.01	(-0.17, -0.12)
Model 120	7	26	0.81	(0.78, 0.84)	<.01	(-0.22, -0.16)

Model 0: (full model) all explanatory variables included. Models 10 to 120 including 31 to 39: (Reduced models) named Model x, where x is the number of variables removed.

- 홀캠프 교수가 PADRAP 고도화를 위해 사용한 기술들 중 Group Lasso, Random Forest 알고리즘은 중요변수를 선별하고 변별력이 낮은 변수를 축약하여 설문문항의 수를 줄여서 조사의 효율성을 높일 때에 매우 유용하게 활용될 수 있는 기술들임
- Survival Analysis는 장기간의 PRRS 발생 유무에 대한 데이터가 확보되었을 때, PRRS가 발생할 때 까지의 기간을 이용한 분석에서 매우 적절하게 활용될 수 있으며, 특히 Cox-proportional hazard 회귀분석을 이용할 경우 기간 데이터에서 어떤 요인이 유의한 영향을 미치는지를 통계적으로 확인할 수 있는 유용한 기법임

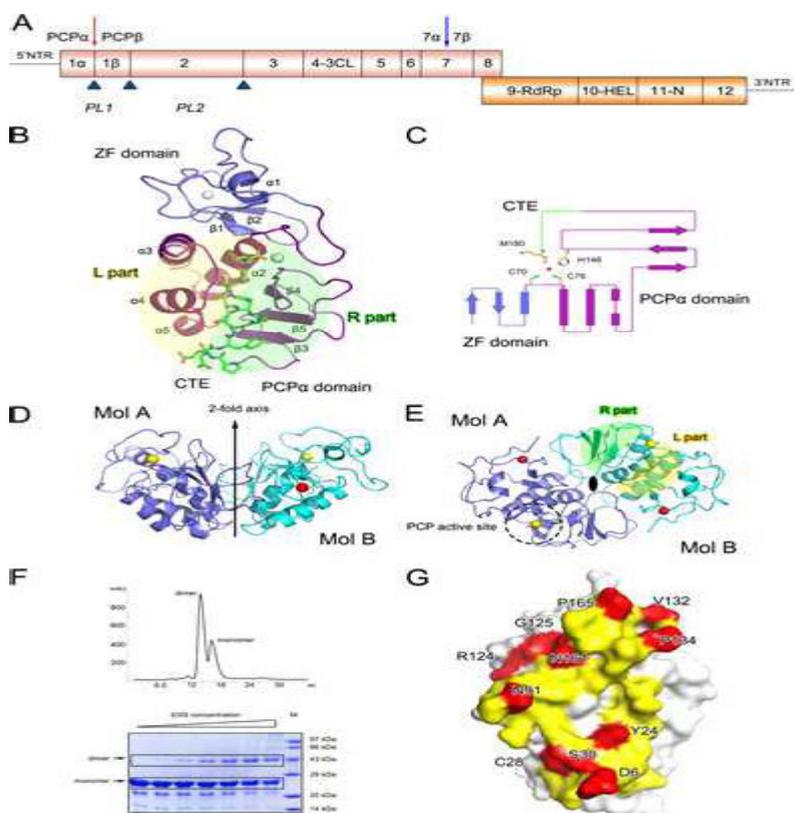
○ 항바이러스제 개발 연구 동향

- George F. Gao 연구팀은 Journal of Molecular Biology (2009, 392, 977-993)에 PRRS 바이러스 증식에 Chymotrypsin-like serine protease (3CLSP/nsp4) 단백질이 중요성하게 작용한다고 보고함. George F. Gao 연구팀이 보고한 3CLSP (PBD code; 3FAN)을 단백질 구조정보와 *in vitro* 활성검색 방법을 습득하여 본 연구에 적용.



PRRSV의 3CLSP/nsp4의 구조 및 단백질 분해 효소 활성 부위

- Zhiyong Lou 연구팀은 Journal of Virology (2009, 10931-10940)에 PRRS 바이러스의 leader protease nsp1a의 단백질 구조정보를 보고,



PRRSV의 nsp1a의 구조 및 단백질 분해 효소 활성 부위

제 7장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 일반과제 임	

제 8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행 실적

		코드번호	D-11	
1. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시				
구분	법적기준(연안법)	실행현황	비고	
안전점검	일상점검	- 1회/일 실시	- 최종퇴실점검표 실시	
	정기점검	- 1회/년 이상 실시	- 1회/월이상 실시 (합동안전점검실시 등)	결과 실험실 자체 보관
	특별안전점검	- 필요시	- 4회/년이상 실시 (연말연시, 연휴 등)	결과 실험실 자체 보관
정밀안전진단		- 1회/2년 이상 실시	- 1회/년 실시 (분원포함 전 실험실)	
2. 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진 실시				
구분	법적기준(연안법)	실행현황	비고	
안전교육	정기교육	- 6시간/반기 이상	- 2시간/월 정기교육 (실험실 자체교육)	결과 실험실 자체 보관
	신규채용시	- 8시간 이상	- 외부위탁 교육 및 실험실 자체교육	결과 실험실 자체 보관
건강검진	특별안전교육	- 2시간 이상	- 4시간/년 실시 - 실험실 자체교육, 전 직원 집합교육	결과 실험실 자체 보관
	일반검진	- 1회/년 이상	- 1회/년 실시 (오창, 전북 포함)	
	특수검진	- 1회/년	- 1회/년 이상 실시	
3. 보험가입 관련사항				
구분		실행현황		
정규직	산재보험	- 연구원 일괄 가입(경상비)		
	일반상해보험	- 연구원 일괄 가입(경상비)		
비정규직 (PD, PM 등)	산재보험	- 연구원 일괄 가입(과제인건비)		
	일반상해보험	- 연구원 일괄 가입(과제인건비)		
학생 등	일반상해보험	- 연구원 일괄 가입(연구실안전관리비)		
가. 병원체 노출예방				
(1) 일부 병원균은 인체에도 감염될 수 있으므로 설사 가검물 및 가축을 다루기전에 연구원				

들을 대상으로 안전교육을 실시

- (2) 가검물 및 동물을 다룰 때는 항상 방역복 및 실험복, 마스크, 장갑 등의 안전장비를 착용하도록 교육

나. 안전사고 예방

- (1) 대동물을 대상으로 한 실험에서 안전사고가 발생하지 않도록 동물실험 실시 전 연구원들을 대상으로 충분한 안전교육 실시
- (2) 동물실험을 실시할 때는 항상 두 명이상이 작업하도록 하여 불의의 안전사고를 방지
- (3) 실험실 및 동물실험실에 구급장비 구비

제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	프로 그램 등록	PRRSV(돼지생식기호 흡기증후군)설문지 입력 프로그램	(주)이지팜		대한민국		2014.05.30 (프로그램 등록)		C-2014-01 2514
2	특허	SY029를 유효성분으로 함유하는 항바이러스 조성물	계명대		대한민국		2014.07.10 (특허출원)		10-2014-0 12514
3	특허	돼지생식기호흡기증후 군바이러스 저항성 개체 판별용 조성물	전북대		대한민국		2015.03.31 (특허출원)		10-2015-0 045355
4	프로 그램 등록	돼지생식기호흡기증후 군(PRRS) 발병지도	(주)이지팜		대한민국		2015.04.01 (프로그램 등록)		C-2015-01 1695
5	특허	가축 바이러스 질환 예방 또는 치료용 조성물	계명대		대한민국		2015.07.01 (특허출원)		10-2015-0 093923

제 11장. 기타사항

코드번호	D-13
○	

제 12장. 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none"> 1. Neumann, E.J., J.B. Kliebenstein, C.D. Johnson, J.W. Mabry, E.J. Bush, A.H., Seitzinger, A.L. Green, and J.J. Zimmerman. 2005. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. <i>J Am Vet Med Assoc</i> 227:385-392. 2. Chang, C.C., K.J. Yoon, J.J. Zimmerman, K.M. Harmon, P.M. Dixon, C.M. Dvorak, and M.P. Murtaugh. 2002. Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. <i>J Virol</i> 76:4750-4763. 3. Key, K.F., D. K. Guenette, K. J. Yoon, P. G. Halbur, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2003. Development of a heteroduplex mobility assay to identify field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with nucleotide sequences closely related to those of modified live-attenuated vaccines. <i>J Clin Microbiol</i> 41:2433-2439. 4. Kim, W. I., D. S. Lee, W. Johnson, M. Roof, S. H. Cha, and K. J. Yoon. 2007. Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. <i>Vet Microbiol</i> 123:1-14. 5. Mengeling, W.L., K.M. Lager, and A.C. Vorwald. 1998. Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. <i>Am J Vet Res</i> 59:1540-1544. 6. Nielsen, T. L., J. Nielsen, P. Have, P. Baekbo, R. Hoff-Jorgensen, and A. Botner. 1997. Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. <i>Vet Microbiol</i> 54:101-112. 7. Scortti, M., C. Prieto, E. Alvarez, I. Simarro, and J. M. Castro. 2007. Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. <i>Vet Rec</i> 161:809-813. 8. Kim, W. I., J. J. Kim, S. H. Cha, and K. J. Yoon. 2008. Different biological characteristics of wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and vaccine viruses and identification of the corresponding genetic determinants. <i>J Clin Microbiol</i> 46:1758-1768. 9. Allende, R., T.L. Lewis, Z. Lu, D.L. Rock, G.F. Kutish, A. Ali, A.R. Doster, and F.A. Osorio. 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. <i>J GenVirol</i> 80:307-315. 10. Dea, S., C.A. Gagnon, H. Mardassi, B. Pirzadeh, and D. Rogan. 2000. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. <i>Arch Virol</i> 145:659-688. 11. Kim, W. I. and K. J. Yoon. 2008. Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. <i>Virus Genes</i> 37:380-91. 12. Murtaugh, M.P., Z. Xiao, and F. Zuckermann. 2002. Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. <i>Viral Immunol</i> 15:533-547. 13. Beura L.K., S. N. Sarkar, B. Kwon, S. Subramaniam, C. Jones, A. K. Pattnaik, F. A. 	

- Osorio. 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate response by antagonizing IRF3 activation. *J Viol* 84:1574-1584.
14. Chen Z., S. Lawson, Z. Sun, X. Zhou, X. Guan, J. Christopher-Hennings, E. A. Nelson, Y. Fang. 2010. Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398: 87-97.
 15. Lowe, J. F., F. A. Zuckermann, L. D. Firkins, W. M. Schnitzlein, and T. L. Goldberg. 2006. Immunologic responses and reproductive outcomes following exposure to wild-type or attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine under field conditions. *J Am Vet Med Assoc* 228:1082-1088.
 16. Wang, X., J. Li, P. Jiang, Y. Li, B. Zeshan, J. Cao, X. Wang. 2009. GM-CSF fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus increased the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge. *Virus Res* 143: 24-32.
 17. Huang, Q., Q. Yao, H. Fan, S. Xiao, Y. Si, H. Chen. 2009. Development of a vaccine vector based on a subgenomic replicon of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Viol Methods* 160:22-28
 18. Kim, W. I., D. Sun, A. Loynachan, V.L. Cooper, K. J. Yoon. The genetic determinants for phenotypic and biotypic differences between virulent and attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their association with virus virulence. *J Virol* (Submitted).
 19. Sun D., W. I. Kim, Y. I. Cho, V. C. Cooper, S. H. Cha , S. H. Kim, E. J. Choi, K. J. Yoon. 2009. Roles of structural proteins in conferring protection among different PRRS viruses and application to the development of vaccine candidate for broad cross-protection. Proceedings, 28th Annual Meeting of American Society for Virology W33-10.
 20. Vignuzzi, M., J. K. Stone, J. J. Arnold, C. E. Cameron, and R. Andino. 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439:344-348.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.