

GOVP1199908574

636.4089
L293C

최 종
보고서

돼지의 PRRS에 의한 양돈가의 경제적 손실의 최소화를
위한 대책 연구

Studies on strategies for reducing farmer's economic
loss due to PRRS infection in pig

1998

연구기관 전북대학교

농 립 부

제 출 문

농림부장관 귀하

본 보고서를 "돼지의 PRRS에 의한 양돈가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구" 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998년 12월 31일

주관연구기관명 : 전북대학교

총괄연구책임자 : 백병걸

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 박용호

참 여 기 업 : 춘강종축

요 약 문

I 제 목

돼지의 PRRS에 의한 양돈가의 경제적 손실의 최소화를 위한 대책 연구

II 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구의 목적

(1) PRRS에 대한 역학 조사

- PRRS 감염 실태 조사
- 호흡기 질환 실태(양돈장, 도축장 임상소견 관찰)
- 임상병리조직학적 소견 관찰
- PRRS Virus의 전자현미경적 구조

(2) PRRS 진단 방법 연구

- IFA 기술 확보
- RIDEA KIT 개발(야외용)
- 중화항체가 측정
- 항원 분석을 위한 SDS-PAGE 및 Western blot

(3) 예방약 생산 및 접종 시험

- 예방접종 대상 양돈장의 선발
- 예방약 개발 연구 및 생산
 - 생독 Vaccine
 - 사독 Vaccine
 - Subunit vaccine
 - 혼합 vaccine 개발

2. 연구의 필요성

(1) 기술적인 측면

- 돼지 사육 농가 및 규모의 증가 와 밀집 사육 환경
- 모돈과 자돈에서의 호흡기증세의 확산에 대한 임상적 관찰
- 자돈에서의 급증되는 바이러스성 설사병과의 관련성
- 우리나라에서의 PRRS에 대한 예방접종의 필요성
- 대학실험실에서의 PRRS virus의 배양기술 확립
- 간편한 진단 방법의 개발 모색

(2) 경제적 산업적 측면

- 양돈 규모가 국산 예방약의 생산을 위한 기초적 연구
- 저렴하고 간편한 진단용 kit 생산 필요성 증대
- 국산화 예방약 개발 가능성 연구
- 세균성 질병에 대한 연구 기획 확대로 농가 소득 증대

(3) 사회문화적 측면

- 대단위 모든 사육 규모의 급증과 전염병 유행시 피해정도 확대 파악
- 소화기계 및 호흡 기계 전염성 세균이나 바이러스성의 질병의 확산을 예방
- 지속적인 연구 경험의 축적으로 농가 소득 증대 방안 마련
- 신속 정확한 진단 방법의 보편화 필요성 증대

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구 내용

(1) PRRS 역학 조사 연구

- 1) PRRS의 연구 동향과 병인체의 구조확인
 - 병인체의 전자현미경적 구조 확인
- 2) PRRS의 감염실태(모돈, 자돈)
- 3) 호흡기 질환의 감염 실태 조사
- 4) 모돈을 중심으로한 폐 질환의 임상병리조직학적 특성 관찰

(2) PRRS 진단용 KIT 개발 활용 방안

- 1) IFA 진단 방법 활용
- 2) RIDEA 진단 방법의 KIT화 활용
- 3) 중화항체가 측정

(3) PRRS의 예방용 Vaccine 생산 및 임상적 실험 추진

- 1) 생독 Vaccine
- 2) 불활화 vaccine
- 3) Subunit Vaccine
- 4) 불활화 혼합 Vaccine(mycoplasmosis)

2. 연구 범위

본 연구는 당초 3개년 연구계획으로 설계되어 있었으나, 제1차년도에 농촌 현장에서의 PRRS의 감염실태와 타 질병과의 혼합 감염 실태 등을 전 북, 전남 돼지 도축장을 집중적으로 단기간 방문하여 실태를 조사하였던 바, PRRS 단독감염 예의 돼지를 찾아서 연구 수행하는 것은 거의 불가능할 정도로 여러 종류의 호흡기계에 질환이 발병되고 있음이 확인되어 있고, 병원성, 치사율이 거의 80~90%에 달하는 바이러스와 세균성 설사병이 양돈장마다 유행을 하고 있어(김 등 1982; 박 등 1995;) 비교적 병원성, 치사율이 낮은 PRRS를 포함한 호흡기계 질환에 대한 예방약 생산 연구는 크게 유용성이 없었던 처지이었다. 즉, 호흡기계 질병의 중요성이 최소한 1996년과 1997년도에는 강조될 수가 없어 연구계획을 단축하고자 계획서를 변경 요청하여 연구의 내용을 축소하면서도 농촌 현장에서 곧바로 활용이 가능하다고 생각되는 분야에 대한 연구를 수행하였다. 이 같은 연구의 조기 단축함에 있어서 당초 연구계획을 근간으로하여 가장 역점을 두었던 점은 우리나라의 농촌에서 손쉽게 활용하기에 적합한 예방약이나 간편한 진단 방법을 개발하고자 하였으며, 이에 따라서 당초 연구계획서에 포함되어 있었던 첨단 과학과기술을 이용한 고가의 예방약을 생산하는 계획을 대신하여, 우리 실정에 적합한 경제적 연구결과를 토출하기 위한 연구를 수행하므로서 국가예산을 절약하는 효과를 얻기도 하였다.

(1) PRRS역학적 연구를 위한 가검물 수집

- 도축장의 가검물 채취
- 양돈장의 모돈으로부터 가검물 채취

(2) 진단 방법의 활용 방안 연구

- IFA 기술 활용 연구
- REDIA KIT 기술 활용 연구
- PRRS Virus 배양 및 항원 생산

(3) 예방약 생산 연구

- PRRS Virus 배양 기술과 불활화 백신 생산
- PRRS 혼합 백신 생산 연구
- 불활화 PRRS Vaccine 및 Subunit vaccine 생산 연구

IV 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

(1) 연구개발 결과

1. PRRS에 대한 역학적 조사

국내의 양돈장의 규모 확대와 번식 양돈업의 확장이 있었으며, 지난 몇 년간 설사병이 크게 유행하므로써(김 1982; 김 등 1995; 박 등 1994) 번식기계 질환(Kim et al 1992)이나 호흡기계 질환의 발생은 경시되는 경향을 나타내었지만, 도태 돼지의 폐의 질병 발생 현황은 파스튜엘라병(조 등 1989), glasser's 병, 마이코플라스마병 등이 단독 혹은 복합감염되어 있었으며, 임상병리학적으로 PRRS 단독 감염 임상 증세를 관찰할 수 없었지만 혈청학적으로 자돈에서 PRRS의 임상조직병리 소견을 나타내고 있었다. 또한 국내 분리 PRRS virus의 전자현미경적 구조를 관찰하였던 바, 150,000배에서 180 X 185nm 크기의 원형의 바이러스입자를 확인 할 수 있었다.

2. PRRS 진단 방법 확립

PRRS 항체량 측정을 위하여 활용해온 IFA방법으로 자연 감염된 돼지에서의 감염여부를 진단하여 왔으며(Frey et al 1992; Yoon et al 1992 b; Van Alstine et al 1996), 야외목장에서 PRRS 항체를 측정하기 위한 간편하면서도 저렴한 RIDEA방법(Takai et al 1990; Hwang & Jun 1993; Gradil & Joo 1988)의 활용 가능성을 시험하였던 바, 항체 형성량을 정량적 그리고 육안으로 판정할 수 있는 진단 방법을 확립, 우리 농촌에

소개 할 수 있는 결과를 얻었다.

3. PRRS 예방약의 면역효과 시험 성적

- Subunit vaccine 개발 : PRRS 미발생 양돈장에서의 4주령의 자돈 5두에게 mineral oil adjuvant를 이용하여, 근육접종함으로써 접종 4주에는 중화항체가 약 4.0의 미약한 항체 형성을 확인할 수 있었으나, 예방접종한 돼지를 대상으로한 도전시험을 수행하지 않았기 때문에 방어능력의 존재 유무에 대하여서는 알 수 없지만, 계속 연구해야 할 것으로 판단되었다.

- 불활화 PRRS vaccine : “H” 연구소에서 PRRS Virus를 배양하여 “H” 연구소에서 생산한 불활화 예방약을 4주령과 8주령의 자돈에게 각각 약 80두씩 근육접종한 후, 항체가를 약 60일간 IFA와 RIDEA방법으로 측정하였던 바, 높은 항체가를 관찰할 수 있었으나 4주령의 자돈에서가 조금 높은 항체가를 나타내고 있었다.

- 불활화 Mycoplasma sp 와 PRRS virus vaccine(혼합백신) : “H” 연구소에서 PRRS Virus를 배양하여 “H” 연구소에서 생산한 불활화 예방약을 4주령과 8주령의 자돈에게 각각 약 80두씩 근육접종한 후, 항체가를 약 60일간 IFA와 RIDEA방법으로 측정하였던 바, 높은 항체가를 관찰할 수 있었으나, 4주령의 자돈에서가 조금 높은 항체가를 나타내고 있었으나, Mycoplasma sp항원을 이용한 항체 형성정도를 측정하지 못하였지만, PRRS에 대한 항체가는 불활화 PRRS를 단독 접종한 예와는 큰 차

이를 나타내지 않고 있었다.

- 비육돈의 돈축과정중에 관찰된 폐의 임상병리학적 소견은 불활화 PRRS 백신을 단독 접종한 예보다는 원등히 Mycoplasmosis의 발생율이 낮게 관찰되었다.

(2) 활용에 대한 건의

1. 질병 발생 현황에 대한 홍보

우리나라 양돈장의 대단위화 및 산업화가 급진전을 이루고 있는 점을 감안하면, 방역 program을 활용하는 양돈 농가를 제외한 일반적인 사육 농가에서는 호흡기 질환의 심각성을 인식치 못하고 있는 실정인 바, 집단 사육 농가에 대한 지속적인 질병 방생에 대한 신속한 정보 전달 방법이 필요한 실정이었다.

■ 더욱이 매년 양돈장에서 크게 유행하고 있는 설사병의 위력은 호흡기계 질환의 중요성이나 피해 정도를 경시화하게되는데 이는 양돈가에 결정적 경제손실을 야기시키는 요인으로 작용하므로 이에대한 적극적인 홍보가 필요하다.

■ 그렇치만 축사환경 시설이 잘되고 각종 질병에 대한 관리가 잘되고 있는 번식 양돈업장에서는 PRRS는 유산율을 증가시키는 것으로 알려져 있는 바, 유산율을 저하시키여 위한 새로운 경영방법의 모색을 둔 양돈 경영의 필요성이 부각되어야 한다고 보여진다. 또한 각 양돈장에서 얻는 전염병 발생에 대한 각종 정보를 상호 교환할 수 있는 수평적 관계가 확보되어야 상호 유익한 방역 대책을 수립할 수 있을 것으로 기대되는 결과를 얻었다.

2. 진단 KIT의 활용

PRRS의 양성 여부를 진단하기 위한 진단 방법으로 활용되고 있는 IFA(Indirect fluorescent Assay) 방법은 그 민감도나 특이성이 높아 이미 여러 나라에서 활용되고 있으나, 양돈 농가 현장에서의 활용은 고가의 형광현미경의 준비, 항원부착 슬라이드의 준비 및 보관과 판정 기술이 용이하지 않음을 착안하여 야외에서 손쉽게 활용할 수 있는 면역확산진단방법(Redial Immunodifussion Enzyme Assay; RIDEA)을 활용할 수 있는 방법(Bereiter et al 1990; Goyal et al 1987; Gradil & Joo 1988; Hwang & Jun 1993)을 연구하였다.

■ 우리나라의 대부분의 양돈장에는 연구 시설이 갖추어 있지 않은 상황에서 PRRS의 진단을 위하여 장거리 출장을 가는 불편을 줄일 수 있고 진단 소요 경비를 절약한 저렴하면서도 항체와의 반응정도를 손쉽게 육안으로 판단할 수 있는 RIDEA 진단 방법의 보급 방안을 마련하면 농촌에 크게 유익할 것으로 믿어지는 시험적 연구 성과를 얻었다.

이의 야외에서의 활용은 양돈가 스스로가 질병 발생 pattern을 monitoring할 수 있어 양돈장의 전체적인 운영계획 수립에 크게 참고가 될 것으로 믿어진다.

3. 예방약의 활용

1) 우리나라 양돈장 내부 시설은 환풍이 불량하기 때문에 축사 실내의 환경을 염두에 두어야 함을 강조하는 바이다. 도태되는 모돈의 해체 과정 중에 관찰된 소견을 보면, 호흡 기계 뿐만아니라 흉강장기 모두에게 여러 종류의 질병이 복합적으로 감염이 되어 있었고, 바이러스성 설사병에 의하여 심한 경우 자돈의 폐사율이 약 80%이상이 되는 경우도 있었던 1997, 1998년에는 PRRS와 같은 호흡기성 질병의 발생에 대해서는 그 실태와 유행의 Pattern을 파악한다는 것은 실로 용이하지 않았으며, 임상적으로도 어떤 질병 하나가 단독 감염된 질병으로서 구분하는 것은 더욱 용이하지 않았다.

2) 특히 양돈장 실내 환경 여건이 불량한 양돈장에서의 생독 백신의 효과를 기대하는 것은 불가능할 것으로 사료되었으며, 사독백신과 같은 PRRS 예방약의 접종은 크게 그 면역 효가를 기대하는 것은 더욱 더 어려운 실정임을 알 수 있었다.

3) 그러나 비교적 청결한 환경의 양돈장에서는 PRRS예방을 위한 예방접종은 면역항체를 생독 백신과 같은 정도에는 못미치지만, IFA나 RIDEA 방법으로 입증할 수 있는 예방효과가 나타나고 있었다. 이렇게 예방접종한 비육돈의 폐 관련한 질환의 발생 상태가 약 10% 정도 감소된 것으로 나타나, 무엇보다도 세균성 질병이 복합적으로 유행만 하지 않는다면 양돈가의 경제적 손실을 최소화할 수 있을 것으로 판단되었다.

■ 불활화 PRRS Virus과 *Mycoplasma hypopneumoniae*에 의한 혼합백신의 활용과 같은 예방접종 시도는 최근 미국 등지에 이루어지고 있는 바와 같이 여러종류의 세균성 질환의 원인체와 더불어서 우리나라에서도 새로히 연구되어야 할 것으로 판단되어 이에 대한 연구의 필요성을 강조하는 바이다.

4. PRRS의 예방 대책 홍보

우리나라에의 PRRS의 감염율이 약 25%정도를 파악되었는 바, PRRS virus의 예방이나 확산을 막기위하여서는 가장 잘 알려진 전파 방법인 감염된 돼지가 감수성이 있는 돼지가 있는 곳으로의 이동문제에 대한 새로운 인식이다(Quaife 1989; Rossow et al 1990). PRRS virus의 분리는 코물, 분변 그리고 뇨의 swab으로 이루어 진다(Edwards et al 1992; Rossow et al 1992; Yoon et al 1993). 그러나 공기 감염도 가능하여 더욱 이질병의 전파 능력이 강함이 보고되어 있다(Edward et al 1992). 기온과도 밀접하게 관련이 있어 겨울철에 virus의 전파에 유의하여야 하는 것으로 알려져 있다. 이 virus의 전파는 거리와 밀접한 관계가 있어 가까이 있는 목장의 감염목장이 있는 경우는 약 57%의 감염 기회가 주어지며 20 km 떨어져 있어도 감염이 가능하여(De Jong et al 1991).

■ 우리나라 처럼 좁은 영토 내에서의 밀집된 양돈 사업을 집단화하여 운영되고 있는 실정하에서의 이의 전파 능력성은 더욱 커서 큰 피해가 우려되는 바, PRRS 발생과 비발생 농장에 대한 구분이 될 수 있는 행정적 표시 제도의 활용이 필요한 것 같다.

5. 돼지 PRRS의 감염 위험에 대한 대책

돼지의 전염병 발생은 돼지의 입식이 가장 중요한 요소로서 작용할 것이다. 즉, PRRS의 발병은 발병 4주전에 구입한 돼지에서 주로 발생하며, 감염 목장의 5km이내의 목장에서 구입한 돼지에서 발병하는 것으로 알려져 있는 바(Busse et al 1992), 주의 깊게 생각하여야 할 다음과 같은 사항이 있음을 밝혀 두고자 한다.

- ① 돼지의 구입시 수송 수단, 사료 공급 차량과 거리 등에 신경을 써야 하며
- ② 검역을 철처한 양돈장으로부터의 구입
- ③ 주변 감염 양돈장과 근접관계를 고려하여야 한다.
- ④ 대규모 양돈장으로부터의 구입을 피해야 하는 점등이 중요하다.

결국 이 질병의 유행은 감염 돼지의 이동과 국소적인 공기 감염이 가장 중요함을 알고 있어야 한다.

S u m m a r y

This studies were carried out to figure out how to reduce economic loss due to porcine respiratory and reproductive syndrom which shown as the epidemic infectious swine diseases in Korean pig farm. in which we focused to develop of convience diagnostic kit and also develop the inactivated vaccine of porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) and cotail vaccine with inactivated PRRS virus and *Mycoplasma hypopneumoniae* in the pig. The several lung diseases are manifested from sow at the slaughter house. almostly sow and grown pigs were infected with pasteurellosis, glasser's disease, mycoplasmosis and PRRS as endemic infectious disease related lung.

In order to reduce pig farm's economic loss, Various infectiuos diseases including bacterial diseases should be considered together to manage properly for vaccination and repidly daignosis together with PRRS.

1. The preparation of the indirect fluorescent assays has been investigated from virus infected MARC-145 cells to detect PRRS antibodies in swine sera and compared with those of IFA and RIDEA. MARC-145 cells were grown in Eagles's minimum essential medium(MEM) containing 5% fetal calf serum,

2. The result of electrophoresis profiles by SDS-PAGE revealed

that major antigenic moieties of PRRS virus soluble viral polypeptide comprised of 85, 77, 75, 24, 18, and 17 KD. In the western blot using natural infected bovine serum anti PRRS-virus, 95, 75 and 24 KD were recognized. None of these bands were present in normal bovine MARC-145 cell antigen or normal bovine serum.

3. In order to detect the antibody by vaccination of inactivated PRRS vaccine and mixed with *Mycoplasma sp*, a radial immunodiffusion enzyme assay (RIDEA) and IFA (Indirect fluorescence Assay) were applied and compared. Reliable method was developed to produce a viral antigen preparation from porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected MARC-145 cells by solubilizing the virus with Triton X-100. The sonicated cell which was infected by PRRS virus, was coated on petridish with carbonated buffer. The diffusion time of serum was shown as critical factor in the RIDEA. while the antigen concentration used for coating, time of binding conjugate and enzyme-substrated reaction (1:1000) could be determined easily for the quantitation of antibodies from serum of naturally infected PRRS pig (IFA Titer : > 124), Vaccinated serum with inactivated PRRS vaccine and subunit vaccine had shown a diameter of < 8mm by RIDEA in coating sonicated pellet of Marc 145 cell infected PRRS virus.

4. The preparation of the kinds of inactivated vaccines were prepared with inactivated PRRS vaccine and also the coctailed with *Mycoplasma hyopneumoniae*, the vaccines of PRRS were inoculated into 4 week old age piglets and 8 weeks old age piglets, respectively. and the cotail PRRS vaccine with *M. hyopneumoniae* also were inoculated into 4 week old age and 8 week old age, respectively. The subunit vaccine which was prepared from propagation of PRRS virus isolated in Korean pig farm. was supplied by Professor Lyoo in Kunkook University, Seoul. Korea.

5. The purpose of study cotail vaccine with PRRS vaccine mixed with *Mycoplasma hyopneumoniae* was to determine whether PRRS virus infection altered the severirt of Mycoplasmosis infection in piglets. The cotail vaccine could show a little protectivity of Mycoplasmsosis compared with inactivated PRRS vaccine. All pig were euthanized and necropsied. the lung of cotail vaccinated pig had no gross pneumonic lung.

6. In order to prepare IFA for PRRS, The Marc-145 cells were grown in large flasks to confluency. Eagles minimal essential medium supplemented with 4% fetal bovine serum was used as the growth medium. At cell confluency, the medium was discarded and the cell monolayed was collected with scrap and inoculated into IFA plates at

37°C CO₂ incubater.

7. In order to prepare RIDEA, The MARC-145 cell were grown in large flask to be confluency. the Grown cell was treated with trypsine to collect. and sonicated the cell after treated with Triton 100. The suspension was centrifuged with ultra high speed, and take the supernant to use it as antigen for SDS-PAGE and RIDEA.

C o n t e n t s

Chapter 1. General Introduction	27
Research Objectives and Backgrounds	
Necessities of Research	
Research treand	
Contends of Research	
Chapter 2. Epidemiology of PRRS in Korea	48
Introduction	
Material and Methods	
1) Stauts of Pneumoniasis	
2) Fine structure of PRRS	
Result and discussion	
Conclusion	
Chapter 3. Development of Diagosis methods for PRRS	74
Introduction	
Material and Methods	
1) IFA	
2) RIDEA	
Result and discussion	
Conclusion	

Chapter 4. Study on PRRS Vaccines	87
Introduction	
Material and Methods	
1) Subunit vaccine	
2) Inactivated PRRS Vaccine	
3) Cocktail vaccine for PRRS and Mycoplasma sp	
Result	
Conclusion	
Chapter 5. References	107

목 차

제 출 문	3
요 약 문	4
Summary	19
제 1 장 서 론	27
제1절 연구 배경 및 목적	
제2절 연구개발의 필요성	
제3절 연구 동향	
제4절 연구 내용	
제 2 장 PRRS virus에 대한 역학적 연구	48
제 1 절 서 론	
제 2 절 재료 및 방법	
제 3 절 결 과	
제 4 절 결 론	
제 3 장 PRRS진단 방법 연구	74
제 1 절 서 론	
제 2 절 재 료 및 방 법	
(1) IFA 진단 방법	
(2) RIDEA	

제 3 절 결 과

제 4절 결 론

제 4 장 PRRS예방약 생산시험 87

제 1절 서 론

제 2 절 재 료 및 방 법

(1) PRRS Subunit Vaccine의 예방효과

(2) PRRS Virus 불활화 Vaccine의 예방효과

(3) 혼합 Vaccine 의 효과

제 3 절 결 과

제 4 절 결 론

제 5 장 : 참고문헌 107

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 배경 및 목적

1995년도 우리 나라의 돼지 사육 두수는 UR대비 정부의 양축 농가 지원 정책에 힘입어 약 7,000,000두로서 그 사육 형태는 대규모의 사육 형태로 되고 있으나 최근에는 그 숫자가 더욱 증가하는 것이다. 더욱이 이러한 증가 추세는 광우병이 영국에서 발병 보고된 이래 국민의 식육에 대한 기호성은 쇠고기에서 돼지고기의 소비량 증가 추세로 전환되고 있다. 우리나라에서의 돼지의 유행성 virus성 질병 연구는 많은 학자들에 의하여 이루어진 바 있지만 최신 돼지 질병에 대한 정보를 얻는 데는 미국, 유럽 등지 보다는 약간의 기간이 요구되고 있는 실정일 뿐 결코 뒤져 있지 않다고 보여진다.

최근 돼지의 임신 돈과 자돈에서 호흡기 증세와 번식 장애를 주증으로 하는 이 바이러스 질병, 즉 Porcine Reproductive Respiratory Syndrome(이하 PRRS라 칭함)이 임신 돼지와 번식 돈에서 호흡기와 번식 기계에 임상적 증후를 나타내면서 국내,외의 양돈 업계에 커다란 파문을 일으키고 있으나(Benfield et al 1992, a, b; Ohlinger et al 1992; Ohlinger et al 1991; Paton et al 1991; Polson et al 1990; Van Alsteine 1991, 1993), 외국에서 이의 예방을 위한 활발한 연구 활동이 이루어지고 있는 바와같이 우리나라에서도 이 질병의 진단을 위한 연구가 여러 학자들이 의하여 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 이 질병의 확산 정도가 잘 이루어지고 있지 못한데 그이유는 매년 소화기성 질환(바이러스성 설사병)이 크게 유행하기

때문이 었다. 여러 가지 원인들에 의하여 질병의 예방 대책이나 감염된 목장에서 이 질병에 의한 경제적 손실을 최소화하기 위한 노력은 아직 미흡한 실정이다.

우리나라에서는 PRRS는 돼지의 전염성 위장염과 PED(Porcine epidemic diarrhea) 등이 가져오는 집단 폐사와 같은 것은 없지만 번식 돈에서 약 25%의 피해를 가져올 것으로 기대되는 질병이다. 물론 국내 돼지의 PRRS에 대한 항체가 는 전국 규모의 차원에서 정확한 감염 실태가 밝혀져 있지 않았지만, Porcine epidemiological diarrhea(이하 PED라 칭함)가 처음 보고 되었을 때(박 등 1994), 모든 연령에 걸쳐서 발생됨을 보이며, 50%의 폐사율을 야기시키는 질병으로서 수양성 설사, 구토, 식욕 부진, 원기 저하 등의 임상 증세를 나타내는 질병으로서 자리를 굳혔다. 이같은 노력은 이 질병에 대한 적극적인 예방 대책 확립으로 어느 정도 극복할 수 있는 질병의 하나가 되었듯이 PRRS도 이같은 연구가 신속히 이루어져야 할 것이다.

우리나라 양돈사업은 정부의 적극적인 지원정책에 함입되어 최근 몇 년사이에 목장의 크기나 사육 두수가 커졌지만 질병의 예방 및 돼지의 사육 관리 기술, 경제적 생산성 증가를 위한 연구는 활발하지 못하다. 이처럼 양돈 사업의 큰 번창에 따른 많은 종류의 질병 발병 위험이 커지겠지만, 양축농가에서는 최근에 알려진 돼지의 번식 기계 및 호흡 기계 증후군(porcine reproductive respiratory syndrome)에 대한 관심이 커지고 있다.

우리나라의 양돈업의 규모가 대형화됨에 따라서 문제시되는 것은 번식

장애 및 호흡기계 질환에 따른 체중 증가 둔화등과 같은 경제적 손실의 규모이라고 생각된다. PRRS는 임상적 증세를 나타내는 질병으로서 이 질병에 대한 적절한 예방 대책이 세워지지 않는다면 대규모 양돈 경영자에게 막대한 경제적 손실을 끼칠 수 있을 것이다. 만약 질병에 대한 어떤 특별한 관리 대책, 예방 대책 그리고 진단 방법에 대한 세심한 연구에 보탬을 가져 오기 위하여 본 연구과제를 착수하게 되었다. 앞으로 질병에 대한 수의학적인 연구가 만약 게을리 된다면 양돈 농가에서의 PRRS의 발병 추세는 급등할 것이며, 급등에 따른 돼지의 유산, 조산 그리고 사산 등과 같은 번식 질환의 급등은 양축농가에서의 경제적 손실 규모를 증가시킬 것으로 사료되며, 지금부터는 이 질병에 대한 전국적인 규모의 역학적 연구가 지속적으로 이루어져야 하며 정부 당국에서도 이의 중요성을 인식하여 현장 애로 사업의 당면 과제로서 좀더 더 적극적으로 대처 해야할 현장 애로 사업으로, 적극적인 대처를 취하여야 하는 전파력이 강한 전염병 질환으로서 양돈가에게 홍보되어야 할 것이다.

1) 기술적 경제적. 산업적 측면

우리나라에서의 PRRS 감염 돼지를 검출하는데 있어서의 수의검역원은 항원이나 항체의 생산 기술, 축적은 완벽하여 양돈 업자에게 크게 공헌하여 왔다. 그러나 축산물 시장의 개방화에 따른 많은 가축과 축산물이 손쉽게 수입되고 있는 상황을 고려하건데 이 같은 질병의 새로운 원인체 국내 반입 기회는 증가될 것으로 새로운 질병에 대처할 수 있는 진단, 예방에 필요한 정보가 많아야 할 것으로 사료되었다.

이미 국내에 유입되어 온 PRRS virus에 대한 항원의 특색은 국내 발생을 저하를 위한 예방용 Vaccine의 생산과 최근 연구 동향과 기술을 외국에서의 연구 수준에 맞게 수행되어야 할 것이며, 국내 양돈 시설 조건과 기후와 같은 환경적 조건을 고려하여야 한다. 이같은 Vaccine의 생산을 위하여서는 국내 예방약 생산 업체와의 협력 연구가 필요할 것으로 생각된다.

미국, 유럽, 일본 등의 선진국가에서도 PRRS에 대한 연구를 통하여 이 질병의 새로운 전파를 막고 이 질병에 의한 경제적 손실을 최소화하기 위하여 많은 연구비가 지출되고 있어, 우리나라에서도 이 질병에 대한 외국으로부터의 정보나 기술 개발의 협력 연구를 취한다면 충분히 정확한 진단 방법을 개발할 수 있을 것이며, 필요에 따라서는 이 질병을 예방 할 수 있는 예방약 생산을 위한 기초적이면서도 실용성이 높은 예방약을 생산함이 필요할 것으로 사료되었으나, 우리나라에서의 PRRS발생농가와 비발생농가로 구분되어 생독백신만을 사용함은 예방적 목적에는 적합하다고 생각되어지나 비발생지역에서의 생독백신의 활용에는 주의를 요한다고 생각되고

금번 모돈과 비육돈의 부검에서 나타난 바와같이 여러 종류의 세균성 호흡기계 질환이 유행하고 있는 바, 이들 질병을 함께 예방할 수 있는 program의 개발 필요성이 농촌 현장에서 갈구되고 있음을 밝혀 두고자 한다..

2) 사회 .문화적 측면

1999년도에는 전국을 돈콜레라 비발생 지역으로 선포하기 위한 국가방역 정책을 세워 대대적인 방역활동을 펼쳐나아가고 있는 상황이지만, 우리나라 양돈 운영 규모가 대형화, 기업화에 따라서 사육 단위 두수는 이제 100두에서 수천 수에 달하고 있는 점이 있어 대규모 방역 정책을 수행한다면 크게 방역 정책이 성공할 수 있을 것으로 기대된다. 즉, 과거의 몇십 수에 불과한 양돈 규모는 점차적으로 사라져 가고 있는 실정인 바, 양돈의 기업화에 따른 돼지 질병의 확산 속도가 빨라지게 됨으로서 이를 대비하지 않는다면 어떤 하나의 질병에 의한 경제적 손실 규모가 커질 것으로 생각되었다.

오늘 날 우리나라에서 발병하고 있는 PRRS과 같은 virus 질병은 신속하면서도 정확한 진단 및 색출이 요구되며, 더욱 나아가서는 앞으로 이들 질병에 대한 우리나라에서의 만연 위험을 대비한 연구가 수의공중보건학적 견지에서 필요하다.

본 연구자 등은 최근 가축에서의 본 병 발병율이 약 30% 스증로 증가함에 따라서 조금이나마 PRRS인 PRRS의 근절과 연구에 보탬이 되어 양축농가의 소득 증대를 위하여, 우리나라에서 사육되고 있는 돼지에 있어서의 PRRS에 대한 감염 상황을 보다 면밀히 조사 연구하고자 하였으며, 이같은 연구를 수행함에 있어서 지금까지 활용되고 있는 진단 방법을 활용함은 물론 항원과 항체 반응 방법을 중심으로 면역학적 연구를 수행하였으며, 이

는 더욱 더 정확한 가축(특히 돼지를 중심으로)의 감염 상황을 파악하는데 도움을 줄 수 있을 것이며, 양축농가에 경제적 손실을 최소화 하기 위하여 역학적 특색, 정확한 진단법 개발과 예방 접종약을 시험적으로 생산하고자 하였다.

가. 국 내, 외 관련 분야의 연구 환경

1. 국내의 연구 동향

1) 국내에서의 PRRS에 대한 조사 연구

우리나라에서의 PRRS에 대한 역학적 연구 성과는 본인의 연구 초기 단계에서는 겨우 국내 분리 virus에 관한 연구가 진행 중에 있었으며, 면역학적 조사 연구 그리고 진단 방법이 실질적으로 양돈 농가를 위하여 수의 검역원 및 민간 연구소에서 이루어지고 있었다(Kim et al 1992). 이제는 이 같은 연구와 더불어서 타 질병과의 정확한 감별 진단에 이어서 이 질병을 예방함으로써 양축 농가의 경제적 손실을 감소시킬 수 있는 방안이 농촌에 실재적으로 부각되어야 할 것이다.

① 우리나라 돼지의 PRRS에 대한 발병은 양성 판정을 받은 양돈 업자들이 이를 은닉시키므로서 이 virus의 창궐기회를 높혀 주게되었다. 이 질병의 중요성을 감안하여 이의 발생 동향 파악과 이의 방제 대책 확립을 위한 국가적인 연구를 수행하고 있지만 여전히 양돈 업자측에는 이 질병에 의한 피해 정도가 큰 것으로 주장하면서 신속하면서도 현장감이 있는 서비스가 추진되길 바라고 있다.

② 우리나라 양돈장에서 이 질병의 감염율이 증가되면 산자수, 이유 두 수 등이 감소되며, 모돈의 폐렴 증세에 발생 따른 치료비 증대 등의 요소

를 해결하는 일은 결코 용이하지 않을 것이다. 더욱이 우리 양돈장에서의 타 폐질환을 야기시킬 수 있는 질병이 산재하고 있어 Van Alstine et al (1996)의 연구처럼 타 미생물과의 관련성에 대한 연구가 더욱 기대되고 있다.

③ 양돈 업계의 대형화 추세에 걸맞게 수의학계에서의 이 질병에 대한 고급 인력의 관심과 협동 노력으로 감염 예방을 위한 program의 확립을 위한 연구 시도는 절대적으로 필요한 당면 연구 과제이라고 생각되었다.

2) 진단 방법에 대한 연구 동향

PRRS의 진단 방법을 위하여 표준 virus를 배양하여 Indirect fluorscene antibody Test(IFA)(박 등, 1998; Shin et al 1993; Lyoo et al 1997), in situ hybridization(김등 1997), 면역효소단층법(Wensvoort et al 1996), ELISA(Albina et al 1992, Houbin et al 1995), 분자생물학적 진단 방법(Suarez et al 1994) 그리고 혈청 중화시험(Yoon et al 1994)등이 있다. 그러치만 야외 목장의 대단위 검색 방법을 개발하기 위하여서는 간편하면서도 육안적으로 직접 볼수 있는 방업인 RIDEA방법의 실용화를 강조하고자 한다.

3. 예방약에 관한 연구

국내에서는 PRRS의 감염 실태가 밝혀진 이후, 외국으로부터 생독

PRRS 예방약이 수입되어 활용되고 있고 대학에서 PRRS virus 로부터 특이 항원을 색출, 분자생물학적 예방약 생산에 관한 연구가 이루어지고 있고 있으나, 아직 이들 예방약의 실용화에 관한 연구 결과를 접하지 못하고 있다.

2. 국외의 연구 동향

① 돼지에서의 이 질병은 최근 몇 년전부터 아주 중요한 virus 질환으로 알려지기 시작하였다. 그후 미국에서부터 발생 보고(Bautista et al 1993 a, b; Bilodeau et al 1994; Christianson & Joo 1994; Wensvoor et al 1991; Collins 1991, 1992; Collins et al 1991, 1992; Dial et al 1990; Edwards et al 1992)되었고 이 질병은 북미 그리고 유럽까지 확산되어 마침내에는 일본(Kuwahara et al 1994)과 우리나라 돼지에서도 발병하고 있어 양돈 업계에 큰 문제점으로 나타나고 있다(김 & 박 1997) 1980년도 후반기에 들어서 미국에서 원인 불명의 병인으로 돼지에서 유산, 폐렴과 같은 증상을 나타내는 증후군에 관심을 갖기 시작하였다(Christianson et al 1994; Collins et al 1991, 1992; Collins 1992, Dial et al 1990; Keffaber 1989). 이 질병은 아주 독특한 질병으로 알려져 있었는데 그 이유는 이의 병원성이 강하고, 지속 시간이 동일하면서, 번식 기계 및 호흡 기계에 유사한 증후를 나타내는 질병이 그 동안 전혀 알려져 있지 않았기 때문이었다. 이같은 이유로 Mystery Swine Disease(MSD)로서 소개되었던 질병이었다.

1990년도에는 이같은 증후의 질병이 독일 양돈 업계에서 보고되기 시작하였다(Lindhause et al 1991;). Mystery Syndrome Disease는 세계적으로 번져 나갔으나, 불임과 호흡 기계 증후를 뜻하는 SIRS(Swine Infertility and Respiratory Syndrome)으로써 불리우기도 하였다(Collins et al 1991, 1992), 한편 유럽에서는 일반적으로 porcine epidemic abortion 으로 알려져 있으며, 1992년 미국의 미네소타에서 개최된 이 질병만을 위한 국제학회

에서 최종적으로 PRRS(Porcine reproductive and respiratory syndrome)로서 확정되었다.

② 최근 외국에서도 질병을 효과적으로 진단(Oleksiewicz et al 1998)하고 예방하고자 하는 대책을 다각적으로 강구하고자 종돈장(Dee et 1998)과 포유자돈 관리(Dee & Joo 1997), 웅돈 관리(Shin et al 1997; Nielssen et al 1997) 등을 중심으로한 각종 예방접종 방법을 개발사용하고 있다(1997). 즉 이 질병의 예방 접종방법으로 생각할 수 있는 것 사독 vaccine(Puran-Duran 1997), 생균 vaccine(Ohlinger et al 1992), plasmid DNA vaccine(Pirzadeh & Dea 1998), recombinant vaccine(Plana et al 1997) 그리고 subunit vaccine을 사용할 수 있을 것이다.

③ 우리나라 양돈업이 대규모화 되면서 질병의 발병 형태는 endemic한 유행양상을 나타내면서 일어나고 있다. 1997년 늦겨울(2월)에는 설사병이 만연하여 양돈 업자에게 큰 경제적 손실을 가져다 주었다. 실제적으로 이 같은 상황에서의 호흡기 질병은 무시되었으며, 미국이나 유럽에서 유행하였던 유산과 호흡기 증세를 통한 피해를 호소하는 목장은 전라북도의 몇 개 농장을 대상으로한 조사에서 PRRS 피해 농가가 관찰되지 못하였지만, 많은 목장에서 혈청학적으로 양성으로 나타났지만 PRRS에 피해가 없어 농가에서는 예방약의 활용 필요성이 연구 초기보다도 그 정도가 경시는 경향을 나타내었다.

그렇지만 성돈이나 자돈에서 Virus성 설사병에 의한 피해를 입지 않았다 다면, PRRS를 수반한 몇 가지의 세균성 질환에 의하여 호흡기계 질환

으로 피해를 입었던 것도 사실이어서 앞으로 이 질병에 대한 철저한 역학적 연구 수행과 더불어서 국내에서의 예방약의 활용시 그 예방효과가 있을 것으로 기대되었다.

④ 최근에는 외국에서는 폐 각종 질병(파스튜엘라병, Glasser's 병, 마이코프라스마병)등과 같은 세균성 질환의 예방과 PRRS 병의 유행과의 관련성에 관한 연구가 크게 이루어지고 있어 본 연구에서도 마이코프라스마병과의 혼합 예방약을 시작품으로 생산하여 예방효과에 관한 기초적인 시험을 하였는데, 이에 감염되면 증체량에 있어서 약 15.9%가 감소되는 것으로 알려지고 있다(Pointon et al 1985), 앞으로 타 세균성 질병과의 상호관련성(Kay et al 1994; Van Alstein et al 1996; Sakano et al 1997; Segales et al 1999; Thacker et al 1999)을 연구하는 것은 흥미 있는 분야 일 것으로 생각된다.

제 2 절 . 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구 개발의 목표

연구계획의 조기 완료의 목표를 세우고 당초 연구계획 중에서 주로 3차년도에 완성하여야 할 연구 분야를 2차년도에 실시하는 것으로 조정하였으며, 축소 조정된 연구 분야는 주로 분자생물학적 연구분야로서 Recombinant vaccine 생산 그리고 진단을 위한 Polymerase Chain Reaction 연구분야로서 우리 농촌 현장에서의 활용이 실재적으로 사용이 불가능하다고 판단되는 분야이었다. 우리 농촌에서의 실재적으로 활용 방안을 연구 추구하여, 우리 농촌에서 손쉽게 활용할 수 있는 연구 내용을 가시적으로 보일 수 있도록 연구 방향을 조정하여 다음과 같은 연구 목표를 세워 수행하였다.

1) 우리나라에서의 PRRS에 대한 역학적 조사연구

- 국내 분리 virus의 전자현미경적 구조
- PRRS감염 상황 조사
- 돼지의 폐질환의 실태 조사

2) PRRS의 면역학적 진단 방법 진단 방법

- 중화항체가 측정
- 간접형광항체법
- 면역확산효소진단법(RIDEA)

3) PRRS의 면역학적 연구

- 생독 PRRS 백신
- 불활화 PRRS 백신
- 불활화 PRRS 혼합백신
- Subunit 백신

2. 연구 내용

(1) 호흡기 질환의 감염 현황 조사 성적:

우리나라 양돈장에 발병하고 있는 주요 폐 질환을 도축장에 출하되는 돼지를 중심으로하여 추적하였던 바, 표 1에서 보는 바와 같이 돼지에서 Glasser's 병, Pasteurellosis, Mycoplasmosis 등이 임상적으로 관찰되었고, 비육돈에서 Mycoplasmosis가 높은 발생을 관찰하였는데, 이는 아마 PRRS의 임상적 증세가 폐 상단 또는 침단 부위를 중심으로 충혈이나 출혈소견을 가져 오기 때문에 감별진단이 어려웠다.

즉, 세균성 폐질환 감염으로 병원성이 약한 PRRS 감염 증세를 전형적으로 입증하기는 곤란하지만 아마도 PRRS에 감염되면 면역관련 세포의 기능저하로(Done & Paton 1995) 타세균의 감염, 발병 기회를 더욱 높이는 것으로 관찰되었다.

표 1. 도축돼지의 호흡기 질환의 상황(1997~1998)

양돈장	호흡기 질병 증후				
	두 수	Glasse's Disease	Pasteurellosis	Mycoplasmosis 증세	혼합감염 증세
"C" 양돈장	200	22	69	-	79
광주 도축장	150	25	78	55	86
전주 도축장	100	19	47	24	53
합계	450	66(29.3)	194(43.1)	79(17.6)	218

(2) PRRS 진단용 KIT 개발 활용 방안

① IFA 진단 Kit 방법 활용: PRRS의 진단 방법으로 활용되고 있는 IFA방법(Bautista et al 1993; Yoon et al 1992)을 본 연구에서 모돈, 비육돈의 혈청에 대하여 항체를 측정하는데 활용하였다.

② RIDEA KIT 활용: 면역효소단층법(Wensvoort et al 1991) 보다도 정확한 RIDEA(Joo et al 1984; Bereiter et al 1990) 진단 방법 개발을 확립하여 진단용 KIT를 생산을 위한 가능성을 파악하기 위하여 양돈장에서 실제적으로 간편하게 활용할 수 있도록 시작품을 만들어 각종 면역관련 실험과 야외 자연 감염 상태를 신속, 정확하게 진단 할 수 있는 KIT를 활용될 수 있도록 시험 환경 조건을 확립하였다.

(3) PRRS의 예방용 Vaccine 생산 및 임상적 실험 추진

우리 나라에서의 PRRS 예방을 위한 예방접종은 유행지역 또는 비감염 지역의 농장인지 여부에 따라서 결정되어야 할 것이다. 즉, 심한 감염 지역내의 양돈장과 청정 양돈장에 대한 방역 대책은 달라야 한다는 것이다. 즉 병독성이 강한 양돈장에 있어서의 생독 Vaccine의 사용으로 항체가를 상승시키어, 청정화를 시도하여야 하겠지만 아직 임상 증세가 나타나지 않는 양돈장에 대하여서는 생독 PRRS, 사독 PRRS vaccine이나 PRRS Subunit vaccine을 생산하여 양돈장 및 대학의 실험실 목장에서 표 2와 같이 2차에 걸쳐서 예방접종하였다. 본 연구기간에는 표 2에서 보는 바와

같이 여러 종류의 예방용 Vaccine 준비하여 4주령, 8주령의 자돈에게 실험적으로 감염시켰으며, 4주째에 다시 추가 접종하였으며, 약 2주간격으로 채혈하여 항체 형성 정도를 IFA, RIDEA 그리고 중화항체 방법으로 비교측정하였다.

표 2. 여러가지 PRRS Vaccine에 대한 혈청학적 조사 두수

종 류	양돈장명	주 령	예방접종 두 수	혈청학적진단 (SN, IFA, RIDEA)
생독 Vaccine	대학	4	5	SN, IFA
불활화vaccine	"C"	4	82	IFA, RIDEA
		8	78	IFA, RIDEA
불활화 PRRS 및 Mycoplasma sp	"C"	4	80	IFA, RIDEA
		8	80	IFA, RIDEA
Subunit Vaccine	대학	4	5	IFA, SN
합 계			330	

비고 : IFA: Indirect Flourscence Antibody

SN: Serum neutralization

RIDEA: Redial Immunodissusion Enzyme Assay

"C": Name of Pig farm

(4) 혼합 Vaccine의 준비

우리나라 양돈장의 호흡기 질병의 발생 상황이 PRRS감염 양돈장인 경우 85% 이상 인접을 감안하여 PRRS Virus(6.6 TCID₅₀/ml)와 Mycoplasmosis(5 x 10⁸/dose)를 혼합하여 불활화한 vaccine을 준비하여, 1차에 접종한 후 4주 후에 추가 접종하였다. PRRS유행 양돈장의 4주령의 비육돈 80두와 8주령의 비육돈 80두에게 1차 , 2차 예방접종하였다. 그리고 이들 비육돈이 도축을 위하여 출하시 무작위로 20두를 선발하여 도축장에서 폐 병소를 육안적으로 확인하였다.

(5) Subunit Vaccine 개발 연구 분야

우리나라 양돈장에서 이를 개발하여 PRRS를 예방할 수 있는 효과를 기대할 수 있을 것인지 여부와 이의 야외 양돈장에서 실용화의 가능성을 판단하고자 하였으나, 항원 생산 단가가 높아서 실용화를 기대하기는 어려울 것으로 판단되었다. 결국 이 vaccine을 이용한 예방효과는 크게 기대할 수 없을 것으로 기대되지만, 미감염지역의 자돈에게 면역형성 능력을 향상시키기 위한 하나의 방법으로서 Subunit 백신을 접종하였다.

항원의 생산은 MARC-145 Cell에서 배양한 Virus를 회수하여 세포성 물질을 제거하기 위한 Triton 100로 처리한 후에 고속 원심 분리를 통하여 항원을 회수하여 10mg/dose, 100 mg/dose 그리고 200mg/dose의 용량으로 단백질을 측정하여(Lowry et al 1950) mineral oil를 adjuvant로 하여 피하접종한 다음, 4주후에 추간 접종한 후 중화항체가를 측정하였다.

제 2 장 PRRS에 대한 역학적 연구

제 1 절 서 론

제 2 절 재 료 및 방 법

제 3 절 결 과

제 4 절 결 론

제 2 장 PRRS에 대한 역학적 연구

제 1 절 서 론

우리나라 돼지에서의 PRRS 발병 보고가 몇몇 학자들에 의하여 이루어지고 있었으나(신 등, 1993; 박 등 1998; 김 등 1997; 이 등 1997), 점차적으로 대단위화 되고 있는 양돈장의 규모를 감안하여 이 질병이 발병되고 있는 역학적 특성을 분석하고자 한다.

이 질병의 원인체를 형태학적 특성을 전자현미경적으로 관찰하며, 실제적인 양돈장에서의 실태를 파악하기 위한 연구의 일환으로 몇 가지 진단 방법을 이용하여 항체를 측정하여 돼지에서의 항체 형성 정도를 비교 시험하였다.

이는 많은 종류의 병원균에 의하여 야기되고 있는 돼지의 폐 관련 질병에 대한 전반적인 상황을 파악하여 경제적 손실을 최소화 할 수 있는 방안을 마련할 수 있는 기초적 연구 결과를 얻음으로서 조금이나마 농촌 실정에 보탬이 될 수 있는 연구를 추구하였다.

제 2절 재 료 및 방 법

(1) PRRS Virus의 미세구조 관찰

우리나라에서 분리 동정된 PRRS virus의 미세구조를 투과전자현미경 (JEOL CO.)으로 관찰하였다. 즉, PRRS의 진단을 위한 연구는 증후를 나타내는 목장으로부터의 분리하여 전자현미경적 구조를 밝히기 위한 virus를 분리 MARC-145 Cell에서 배양 다음과 같은 방법을 잉요하여 고정, 절단하여 관찰하였다.

1) direct staining:

PRRS virus를 MARC-145 Cell에 3~5일간 배양하여 70%수준의 cytopathic effect(CPE)를 일으킨 cell에서 바이러스를 수거하여 titration한 결과 10^6 TCID₅₀/ml 이상인 바이러스가 포함된 상청액을 모은 후 grid에 carbone Foramar를 코팅시킨 다음 grid 위에 바이러스 상청액을 micropipette, pasteur pipette를 이용하여 1방울 떨어뜨린 후 grid 위에 폭 넓게 퍼지게 한 다음 1~2분 정도 기다린 후 blotting paper를 이용하여 grid를 건조시킨 다음 3% PTA(Phosphotungstic acid)용액을 한 방울 떨어 뜨려 30초간 방치한 후 마찬가지로 blotting paper를 이용해 grid의 물기를 제거한 다음 전자 현미경을 통하여 150,000배에서 관찰하였다.

2) micro-ultra centrifugation:

바이러스에 포함된 cell 파편들에 의해 관찰이 용이하지 못하여 미리

15,000rpm으로 원심분리를 하여 cell 파편들을 제거한다. cellulose tube에 바이러스함유 상청액을 50~200 μ l 넣은 다음 grid를 tube의 바닥에 넣은 후 120,000 \times g/5분 동안 다시 원심분리 한 다음, 마이크로 피펫을 이용하여 grid를 제거한 후 증류수로 3번 살짝 washing한 다음 blotting paper를 이용해 물기를 제거하고 3% PTA를 이용해 염색하고 건조시킨 후 150,000배에서 관찰한다.

(2) 배양기술 및 항원 생산

- 1) 국내에서 분리한 혈청을 MARC 145 cell에 접종하여 PRRS virus 감염되는 감염 Cell을 활용한다.
- 2) MARC 145 cell을 175square 플라스크에 배양하여 3~5% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 a-MEM 배지로 배양한다.
- 3) 배양된 MARC 145 cell을 flask에 옮겨 48시간 배양하여 monolayer가 형성되면 국내에서 분리된 PRRS virus를 접종하여 CPE(cytopathic effect)가 70% 정도 형성되면 PRRS virus를 회수하여 각종 예방약 생산 그리고 진단용 항원 등의 실험에 사용하였다.

① 항원 준비

- monolayer가 형성된 플라스크에 virus를 접종하여 CPE가 형성되면 4,000 \times g/30분간 원심하여 cell pellet과 상청액(S1)을 분리한다.
- 0.85% saline을 cell pellet의 100배 정도 주입하여 잘 섞어 준 후 4,000 \times g/30분간 원심분리 한다.
- cell pellet을 버리고 상청액(S2)을 모은다.

- 모아진 상청액(S1+S2)을 21,000×g/18시간 원심분리하여 상청액을 버리고 모아진 pellet의 50배 만큼의 0.85% saline을 넣어 잘 섞어 준 후 21,000×g/18시간 원심분리한다.
- 상청액을 버리고 모아진 pellet의 200배 만큼의 saline을 넣고 180,000×g/40분간 원심분리하여 모아진 pellet을 saline으로 1,000배 희석하고 triton X 100을 0.2% 가하여 4℃에서 overnight stirring한다.
- 37℃에서 1시간 방치한 후 15,000×g/10분간 원심하여 PRRS virus를 모아 Subunit vaccine의 항원과 RIDEA진단용 항원으로 사용하였다,

② 간접형광항체 검사 방법(IFA)의 항원 준비: PRRS가 배양된 MARC 145 cell을 96 well flask에 옮겨 48시간 배양하여 monolayer가 형성되면, 이에 국내에서 분리된 PRRS virus를 접종하여 약 70%수준의 CPE(cytopathic effect)가 형성되면 배양을 중단하여 -20℃ Cold Ethnaol으로 고정한 후, IFA 진단용 항원으로 실험에 사용하였다.

(3) PRRS virus 분석을 위한 연구 내용

1) Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

PRRS Virus의 수용성 항원의 특성을 파악하기 위하여 전기영

동을 실시한다(Lammler 1970). 전기영동은 수직 전기영동장치(Bio-Rad Co.)를 이용하며, Gel은 30% 저장용 polyacrylamide(4.2M acrylamide, 52 mM BIS)를 준비한 후, running gel(30 % polyacrylamide 5.7ml, 1M Tris-HCl pH 8.8 8.6ml, 증류수 2.7ml, 10 % ammonium persulfate 171ul, TEMED 17ul)를 충전한 다음, stacking gel(30% polyacrylamide 1.2ml, 0.5M Tris-HCl pH 6.8 2ml, 증류수 2.7ml, 10% SDS 60ul, 10% ammonium persulfate 60ul, TEMED 6ul)로 채워 넣고, 약 1시간 방치한 후 전기영동 장치의 상, 하방(chamber)에 전기영동액(25 mM Tris, 192 mM Glycine, 3.5 mM SDS)을 넣고 150 volt(0.03-0.05mA)하에서 전기영동을 실시한다. 전기영동하기 위한 항원의 처치는 sample buffer(0.5M Tris-HCl pH6.8 2.5ml, 20%SDS 2ml, 2-mercaptoethanol 1ml, 0.5% bromphenol blue 250ul, 증류수로 10ml되게 함)와 동일 량을 넣어 100℃에서 5분간 증탕한 후 stacking gel에 10-15ul씩 주입, 전기영동하였으며 전기영동한 gel내의 항원의 분자량(M W: molecular weight)의 크기는 표준 분자량(14Kd-200Kd, Bio-Rad Co.)으로 비교 측정한다. 항원을 전기영동하여 얻은 gel을 Coomassian brilliant blue R-250(1g Coomassie blue R-250, 400ml methyl alcohol, 600ml 10% acetic acid)으로 염색한 후, 5 % acetic acid : 95 % ethyl alcohol을 3 : 2, 4 : 1 그리고 5 : 1로 희석한 혼합액으로 탈색 후 gel건조기(KPL)를 이용 건조시킨다.

2) 면역효소반응(western blot):

전기 영동하여 얻은 Gel을 nitrocellulose에 전기 이동시킨 후 PRRS spp의 항원을 표준 양성 및 음성 항체과 반응시켜 면역효소화적으로 관찰

하고자 Tsang(1982) 등의 방법에 준하여 western blot을 실시한다. 즉, 전기영동한 gel을 0.45 um nitrocellulose(Schleicher & Schull Co.)에 sandwich처럼 접착시킨 후 전기이동액(25mM Tris, 192 mM glycine, 4.7 M methyl alcohol)내에서 30 volt로 5시간 통전시킨 후, 90 volt에서 1시간 전기적으로 전이시킨다.

이 막을 gel로부터 분리시켜 항원의 blocking을 위하여 0.2% Tween 20 PBS pH 7.4에서 1주야 정치(4°C)시킨 후, 혈청을 0.05% Tween 20 PBS pH 7.4로 1 : 200희석한 액에서 1시간 동안 서서히 진탕시킨다. 혈청을 제거시킨 다음 0.1% Tween 20 / PBS pH 7.4로 10분/3회 세척, 다시 이 막 위에 Phosphatase labeled affinity purified swine IgG to goat IgG (KPL)를 1 : 1000으로 희석, 1시간 접착시킨 후, 0.1% Tween 20 PBS pH 7.4로 10분/2회 세척한 다음, PBS pH 7.4만으로 10분간 다시 세척한다. 이 nitrocellulose막에 기질용액(BCIP : NBT : 0.1 M Tris buffer/1 : 1 : 10 혼합)을 접착, 발색된 polypeptide의 반응대(bands)관찰하였다.

자연 감염된 PRRS 양성 혈청과 면역하여 얻은 혈청을 이용하여 IFA 방법으로 >1:124이상의 양성 혈청을 표준혈청으로 하였다.

(4) 임상병리학적 소견 관찰

전북의 "C" 목장에서 도축을 위하여 출하되는 돼지의 해체 검사에서 나타나는 폐질환 상태를 임상학적 소견을 관찰한데 이어서 실험실에서 사육하면서 접종한 생독 Vaccine 과 Subunit vaccine을 1차 접종한 다음, 4주 후에 추가접종 하였다. 이를 병리조직표본을 제조하여, 광학현미경하에서 병

리조직학적 소견을 관찰하였다.

1) 임상 소견: 모돈과 비육돈이 도축을 위하여 개흉하여 폐를 적출하여 임상적으로 폐질환의 분포상태를 육안으로 진단하였다.

2) 조직병리조직: 모돈과 자돈에서의 여러 가지 임상 소견을 나타내는 폐 조직을 적출하여 10% formalin액에 고정하여 상법으로 처리하여 5 μ m로 절편하여 hematoxylin & Eosin 염색하여 조직학적 소견을 광학현미경하에서 관찰하였다.

제 3 절 결 과

1. 폐 질환 발생 상황:

실험기간에 전북지역의 제한된 목장의 돼지를 대상으로한 폐 질환 상황을 관찰하였던 전국적인 규모의 충분한 역학적 조사가 이루어지지 못하였지만, 우리나라의 양돈장의 환경 조건이 PRRS나 어떤 하나의 질병이 단독적으로 감염되어 유행하지 않고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 어떤 한 예방약만으로 어떤 질병을 예방할 수 있는 형편이 아님을 알 수 있었을 뿐만 아니라 소화기계 질병이 모돈과 자돈에서 크게 유행하고 있어, 단순히 PRRS의 임상적 증세라고 할 수 있는 유,조산과 호흡기 질환을 주 증세로하는 돼지에 대한 순수한 피해 정도를 파악하는 것과 같은 양돈 농가의 피해 정도만을 평가하여 어떤 대책을 세우는 것은 불가능함을 알 수 있었으며, 예방접종약의 선택, 접종 방법도 각 양돈자의 특색에 맞게 세워야함을 알 수 있었다. 이 같은 상황을 근거로 하여 다음과 같은 관리 지침이 선진국의 양돈장에서 고려되고 있는 사육 계념을 펼쳐나아가야 할 것으로 기대된다. 즉, 청청 목장과 오염 목장을 구분하여 표 3과 같은 관리대책을 마련하여야 할 것으로 기대되는 바이다.

전북의 "C" 양돈장의 도축되는 100두의 모돈을 포함하여 전북과 광주 도축장에 도축되는 돼제에 대하여 도축되는 돼지에서 유행하고 있었던 질병은 표 1에서 보는 바와 같이 Pasteullosis, Glasser's 병 그리고 Mycoplasmosis 임상 증세나타나고 있었으나 Mycoplasmosis는 Pasteurellosis가 크게 유행하고 있어 임상적 소견을 관찰하는 것이 불가능한 예가 대부분이

었다. 더욱이 흉막염 증세를 심하게 나타내고 있었던 예에서는 복강에도 심한 복막염 증세를 나타내고 있는 예도 관찰되었다(그림 1). 한편, 비육돈(150두)를 관찰하였던 바, 표 4에서 보는 바와 같이 Mycoplasmosis(55/150두), Pasteurellosis (78/150두) 그리고 Glasser's Disease (25/150)가 발병하고 있어 모돈과는 약간 다른 폐 질병이 발생상황이었다.

표 3. 양돈장의 PRRS에 대한 관리 대책

양 돈 장		관리 대책 수립	비 고
청정 양돈 장		관리 철저, 매 분기 혈청 검사	혈청검사
양성 양돈장	번식돈	예방 접종 시행 항원 검색	예방 접종
	육성돈	폐사율 측정, 입식돈 항체가 측정	예방 접종 여부는 폐사율측정 후 결정
	복합양 돈장	모든의 조산, 사산, 유산을 측정	예방접종
비 고		인근 양돈장 상황 파악	

표 4. PRRS유행 양돈장 출하 도축 돼지의 호흡기 질환 상황(1997)

양돈장	돼 지		호흡기 질병 증후(두수)					정 상 폐소견 (%)
	구 분	두수	Glasser's Disease	Past 증세	Mycopla 증세	혼합 폐염	복막염	
"C" 양돈장	모 돈	100	22	69	-	79	4	21
	비육돈	150	25	78	55	105	-	43

비 고 : Past: Pasteurellosis

· Mycopla: Mycoplasmosis

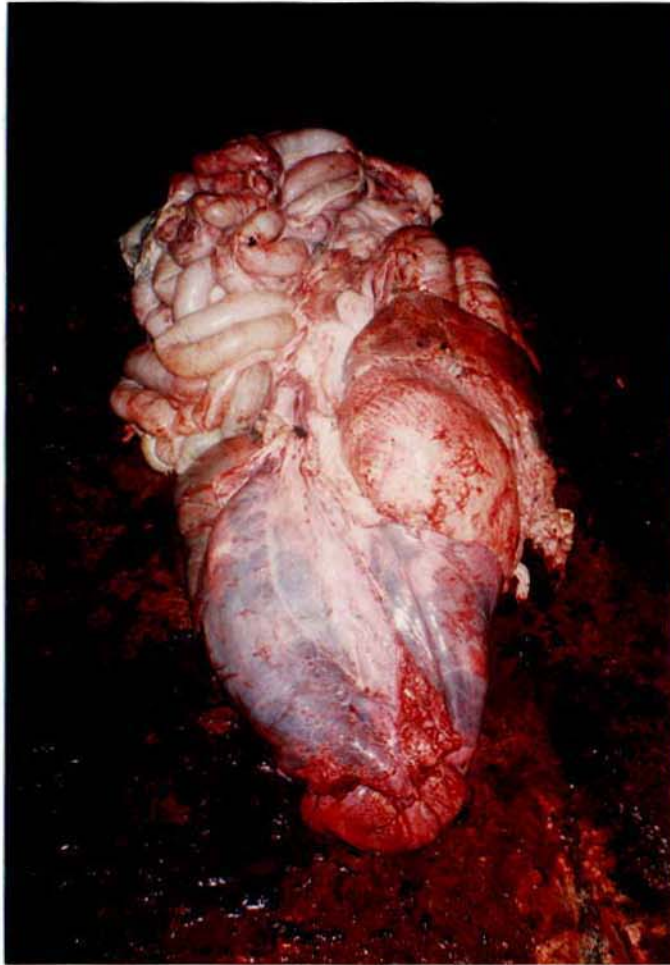


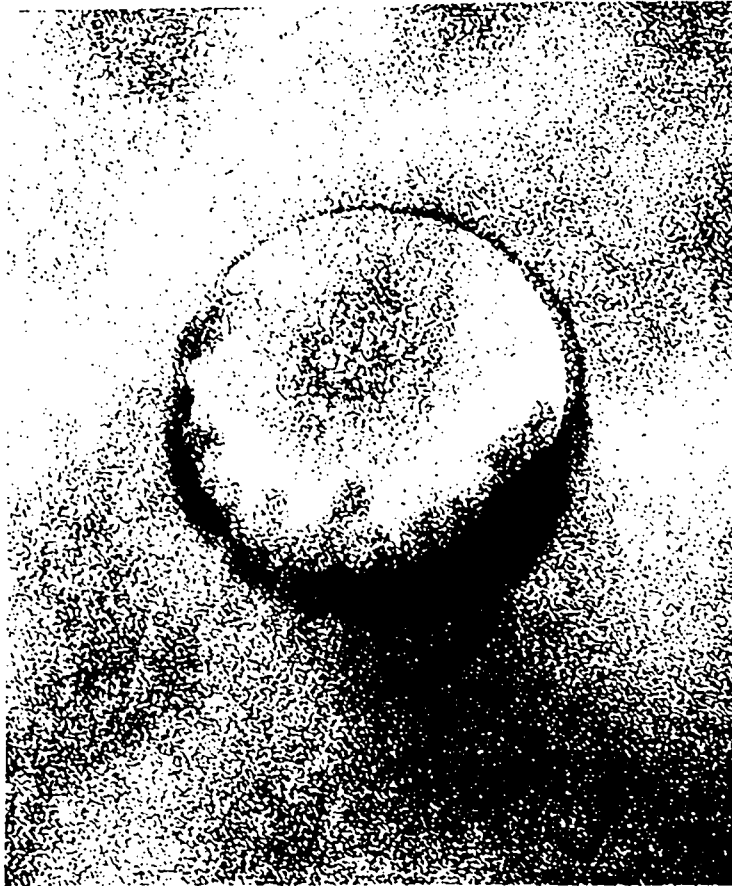
그림 1. 도돈에서 심합 흉막과 복막염 증세를 나타내는 예



그림 1. 도돈에서 심함 흉막과 복막염 증세를 나타내는 예

2. 전자현미경적구조

우리나라 양돈장에서 사육있고 있는 돼지로부터 PRRS virus의 형태를 고나찰하였던 바, 그림 2과 같이 150K에서 관찰하였을 경우 180 X 185 nm 크기의 원형 미립자로서 관찰되었다.



PRRS-Virus
988149 100.0KV X150K 50nm

그림 2. 우리나라에서 PRRS Virus의 전자현미경적 구조

3. 임상병리학적 소견 관찰

전북의 “C” 목장에서 출하되는 돼지의 해체 검사에서 나타나는 폐의 임상학적 소견을 관찰한바, 다음과 같은 소견을 얻었다.

1) 임상 소견: 모든 100두의 도체의 개흉하여 폐를 적출하여 임상적으로 폐 질환의 분포상태를 육안으로 진단하였던 바, 표 1과 4에서 보는 바와 같이 거의 모든 모돈의 폐 장기는 정상적 소견을 나타내는 예는 10%미만이었으며, 나머지는 Pasteurellosis, 홍막염, 그리고 Glasser's Disease를 나타내고 있었다. 비육돈에서는 주로 Mycoplasmosis 성 임상 소견과 Pasteurellosis 등이 관찰되고 있어 모돈에서의 임상 소견과는 차이가 있었다.

30일령의 5두 자돈의 폐 장기에 대한 임상 소견을 관찰하였던 바, 거의 정상적인 소견을 나타내는 임상적 소견을 나타내고 있었으며, 2두에서는 폐 침부에서 경증의 충혈정도의 소견을 나타내고 있었다. 이들 도축되는 모돈의 PRRS감염 정도는 27% 이었고 비육돈인 경우는 23% 정도 이었다.

2) 조직병리조직 소견 :

■ 정상적인 모돈 및 비육돈의 폐조직 표본에서는 그림 3에서 보는 바와 같이 정상적인 폐포강을 관찰할 수 있었지만, 대부분의 모돈 폐조직은 폐 간질조직은 비후되어 있고, 비후된 폐포 벽이 특색적으로 나타나고 있었으며, 염증성 세포의 고농도로 침윤되어 있었으며(그림 4), 폐포내와 폐포 간질층에는 fibrin양 화농성 물질이 증식, 채워지고 있었으며(그림5, 6)

폐포의 상피 세포층의 박리와 파괴가 관찰되었다(그림 7). 폐의 정상조직을 관찰할 수 없는 섬유소성 병변 소견이 관찰되고 있었다(그림 8). 일반적으로 모돈에 있어서는 PRRS의 감염 초기의 임상적 조직학적 소견이라고 할 수 있는 폐간질 조직의 비후나 염증세포의 침윤만을 나타내는 구분할 수 있는 예는 거의 없었다.

■ 자돈에서의 조직학적 임상 소견은 모돈과 비교하여 폐포가 정상적으로 관찰되고 있었으나 약간의 충혈 소견을 나타내었던 예의 조직에서는 interstitial lymphocytes가 관찰되었고 국소 충혈이 관찰되는 가하면, 임파구성 소기관지염(lymphocytic peribronchitis)(그림 9), 폐의 충혈 소견을 나타내고 있었던 예가 관찰되고 있었다, 또한 어떤 예에서는 약간 비후된 폐 간질층에는 대식세포(macrophages)와 임파구의 침윤이 관찰되어 마치 폐포벽이 비후된 것처럼 관찰되면, 폐포의 상피 세포는 정상적으로 관찰되고 있었다.

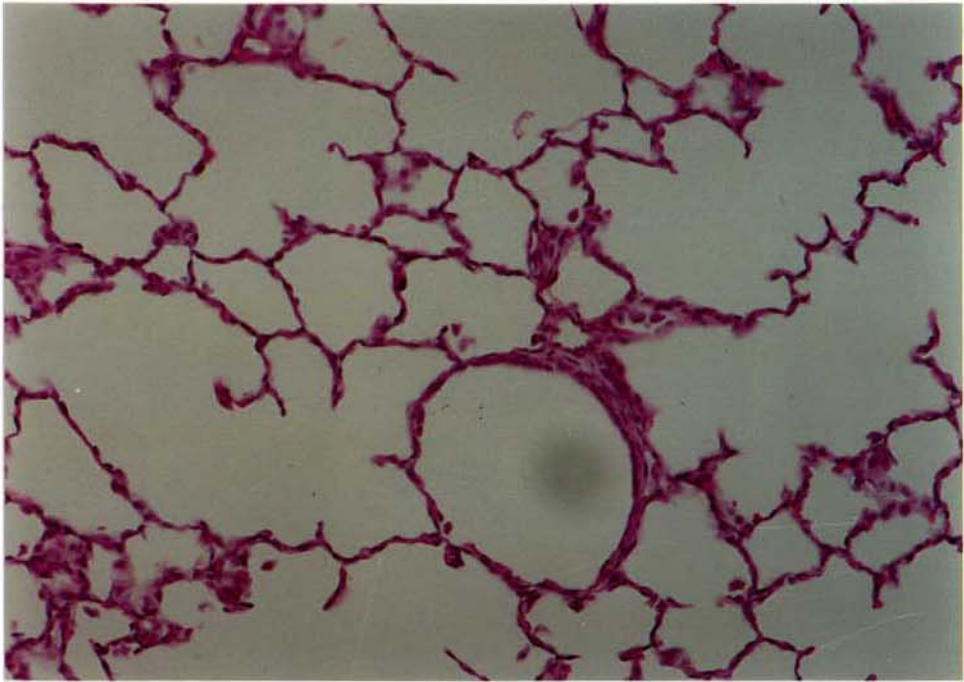


그림 3. 정상적인 폐조직 소견

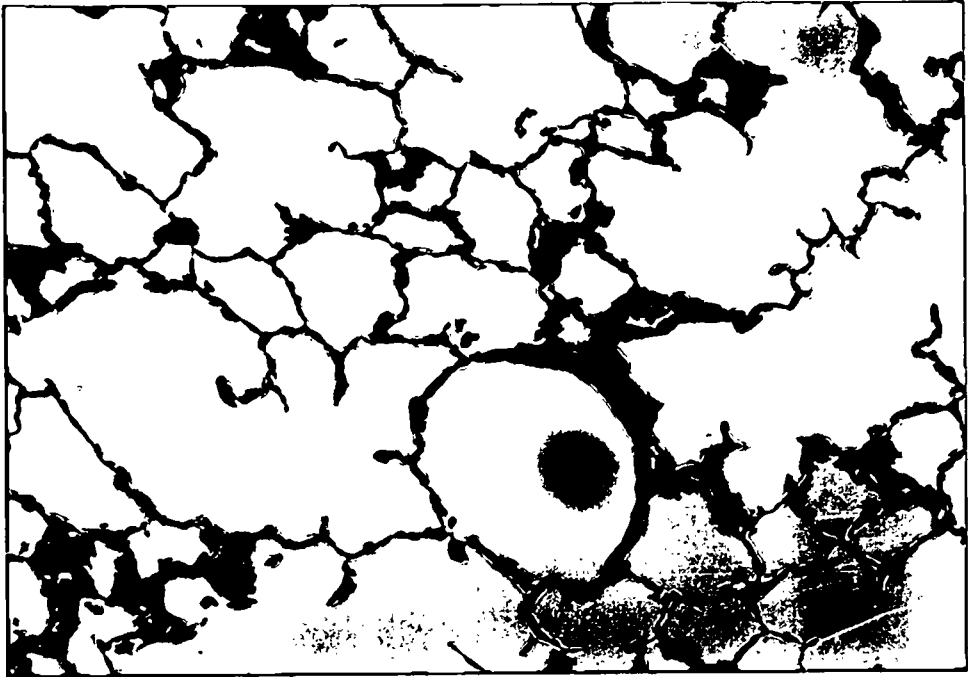


그림 3. 정상적인 폐조직 소견

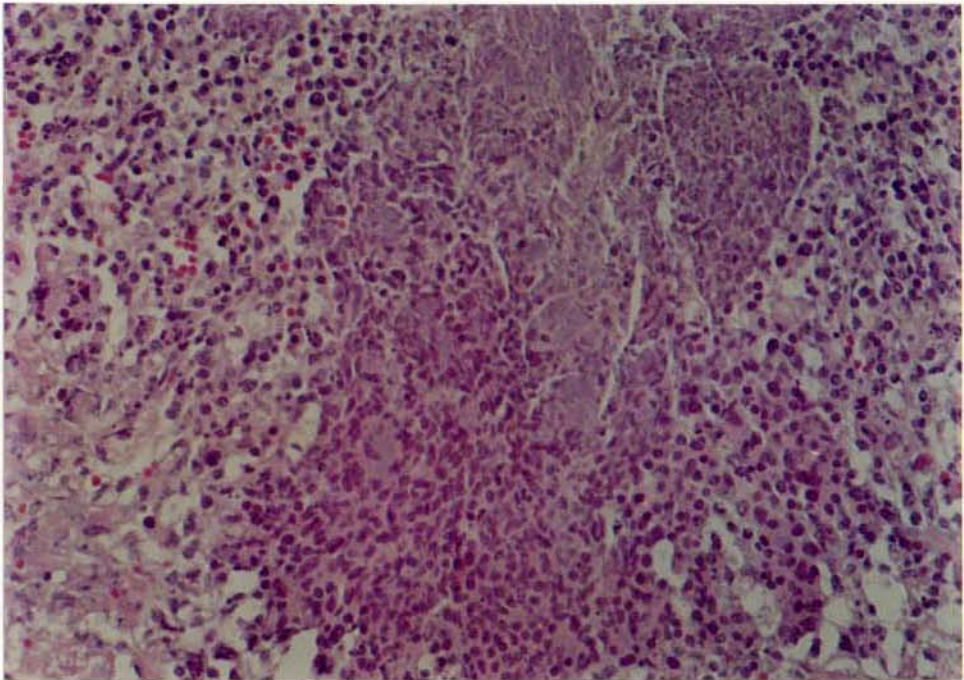


그림 4. 염증성 세포가 농후하게 침윤되어 있는 폐 조직소견

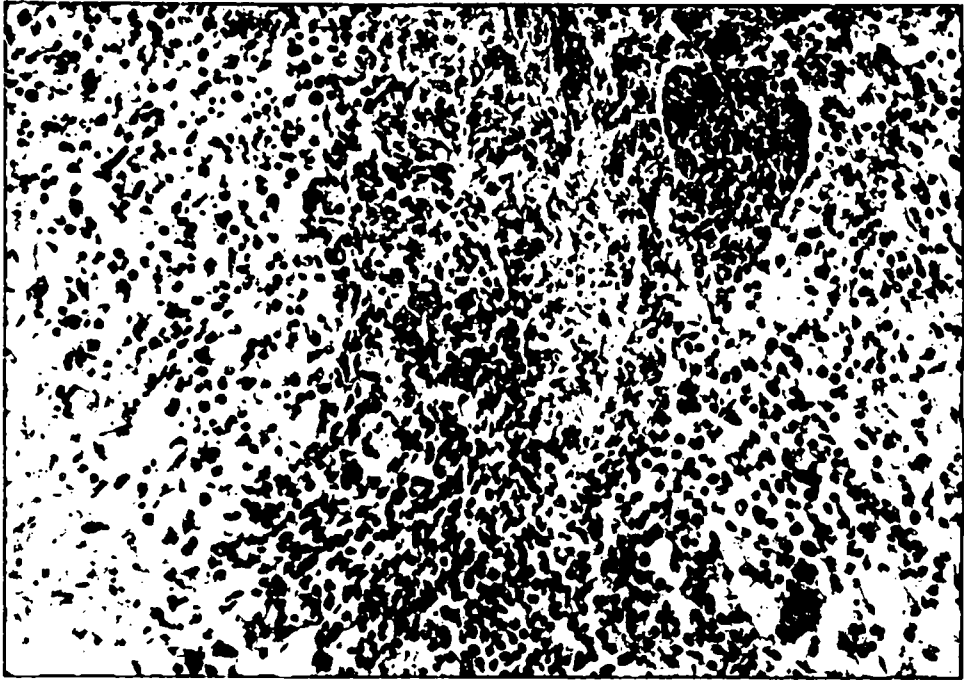


그림 4. 염증성 세포가 농후하게 침윤되어 있는 폐 조직소견

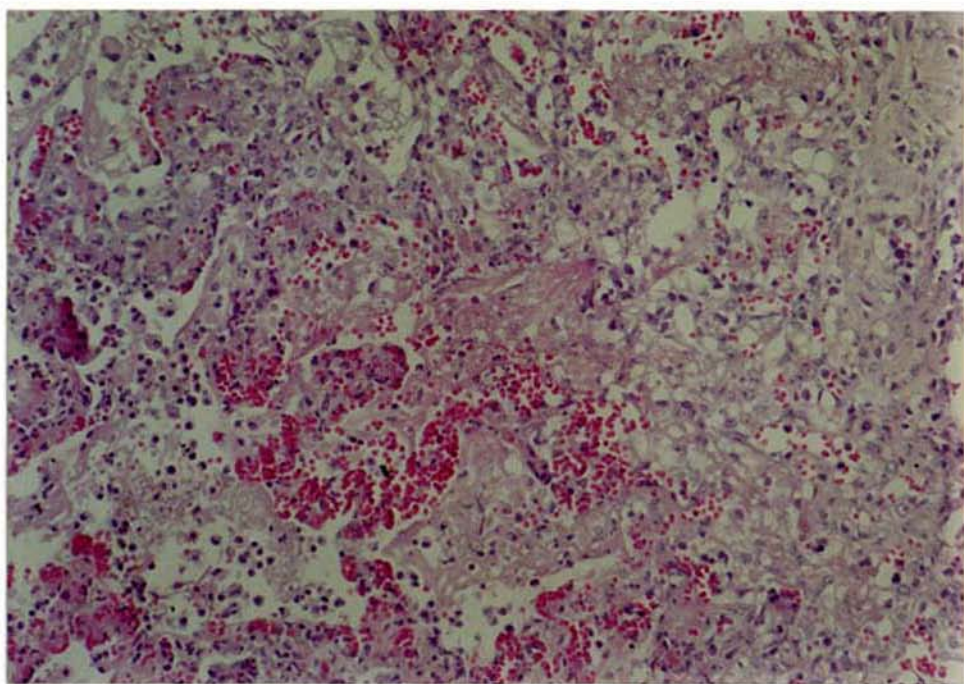


그림 5. 폐포내와 폐포 간질층에 fibrin양 물질이 충전된 폐 조직소견

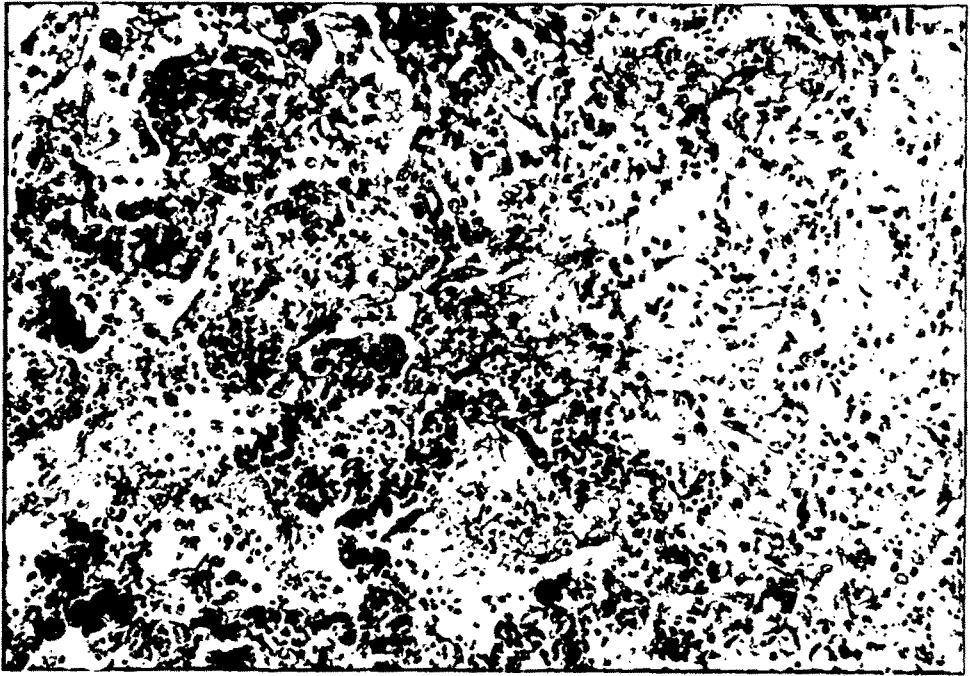


그림 5. 폐포내와 폐포 간질층에 fibrin양 물질이 충전된 폐 조직소견

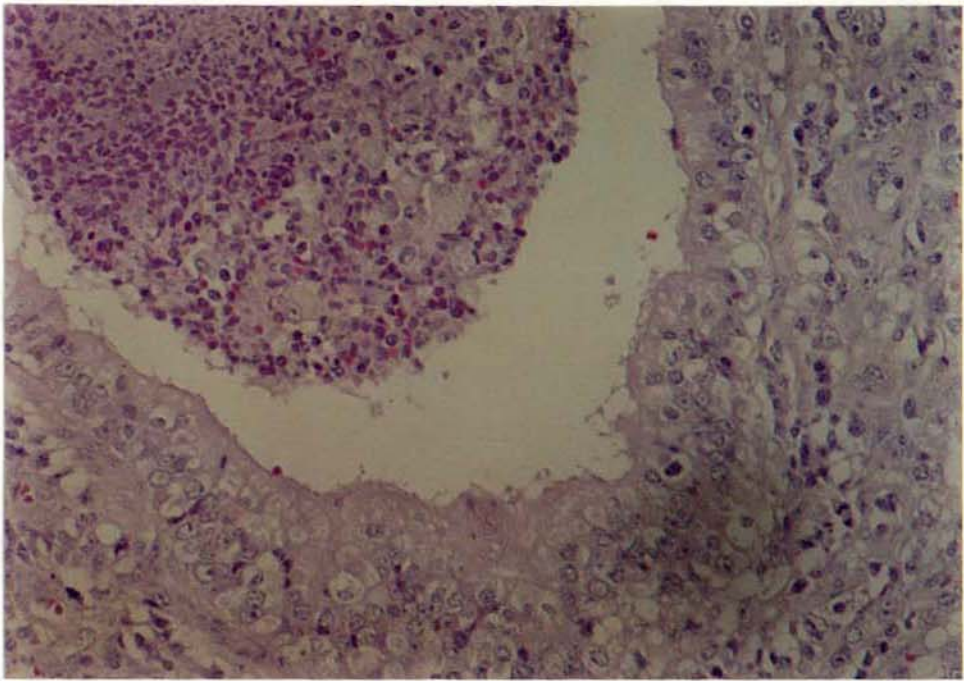


그림 6. 폐포내와 폐포 간질층에 화농성 물질이 충전되어 있는 소견



그림 6. 폐포내와 폐포 간질층에 화농성 물질이 충전되어 있는 소견

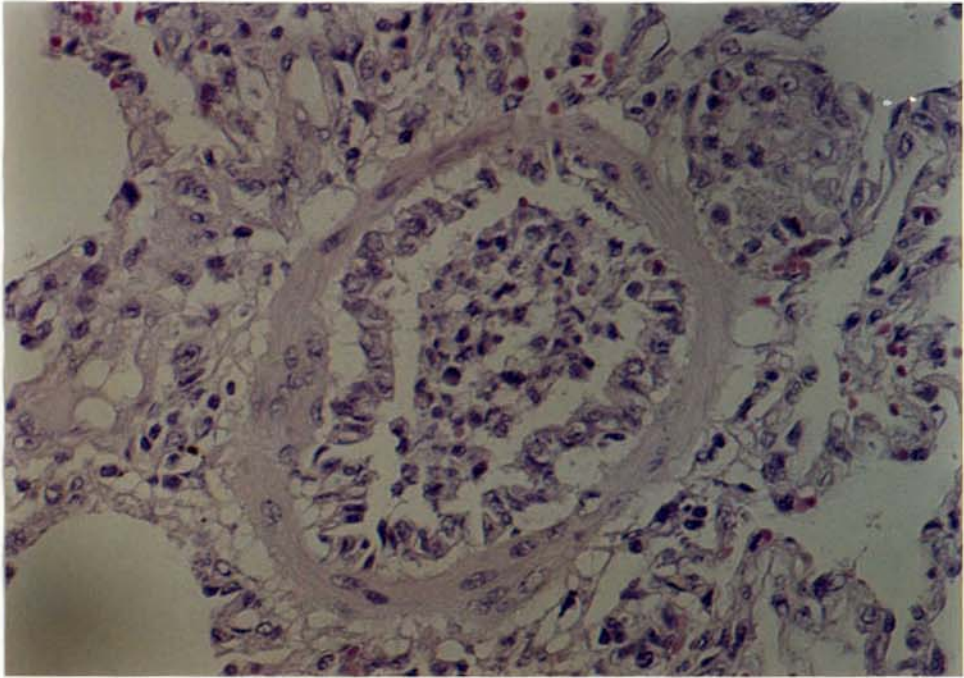


그림 7. 폐포의 상피 세포층의 박리와 파괴가 있는 폐 조직소견

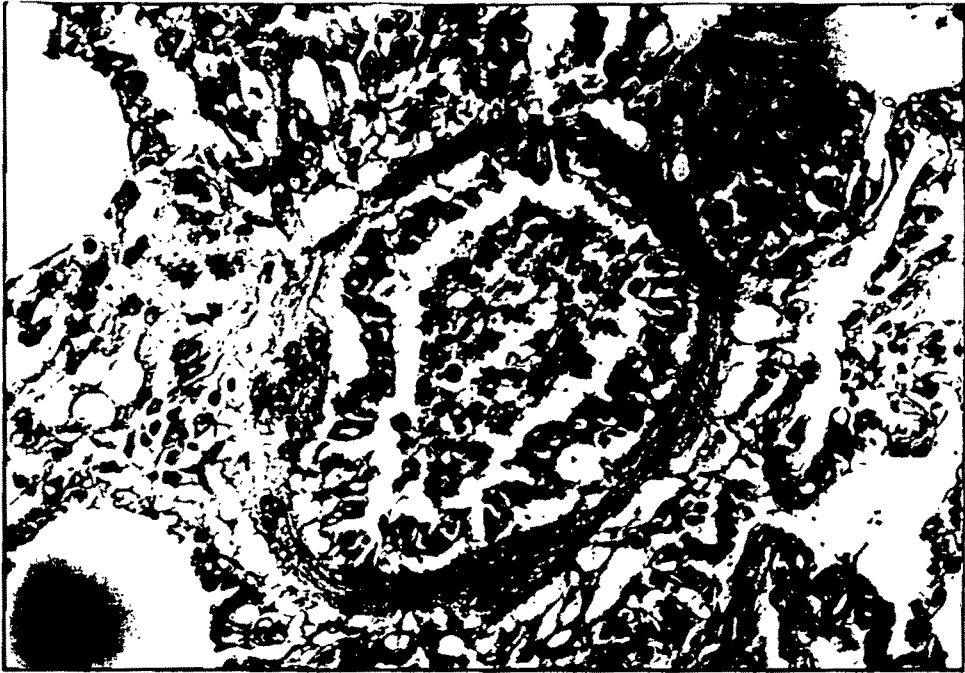


그림 7. 폐포의 상피 세포층의 박리와 파괴가 있는 폐 조직소견

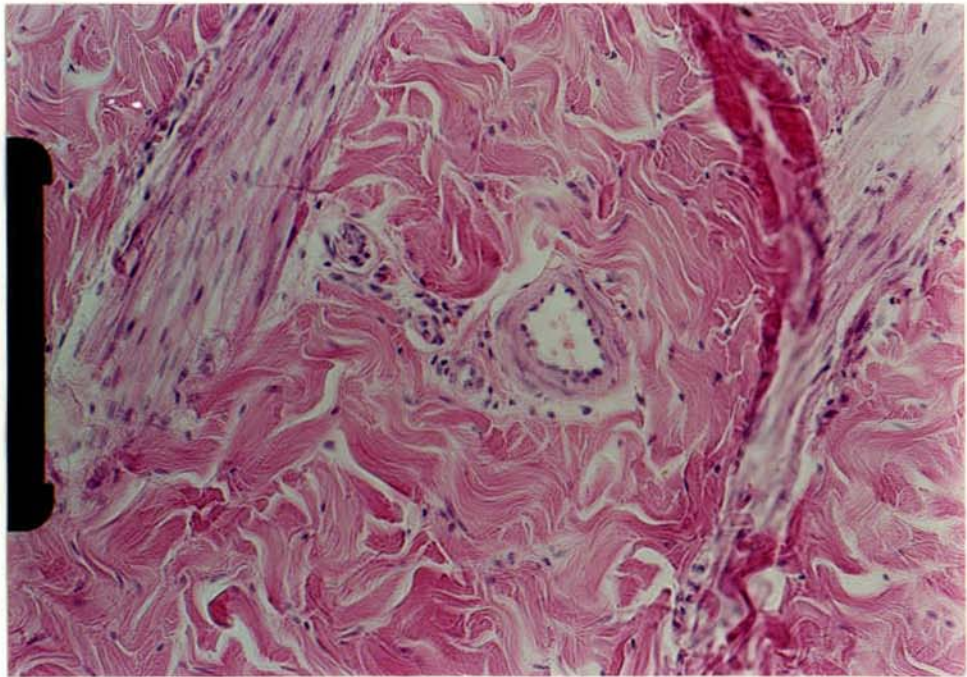


그림 8. 폐의 정상조직을 관찰할 수 없는 섬유소성 병변 소견

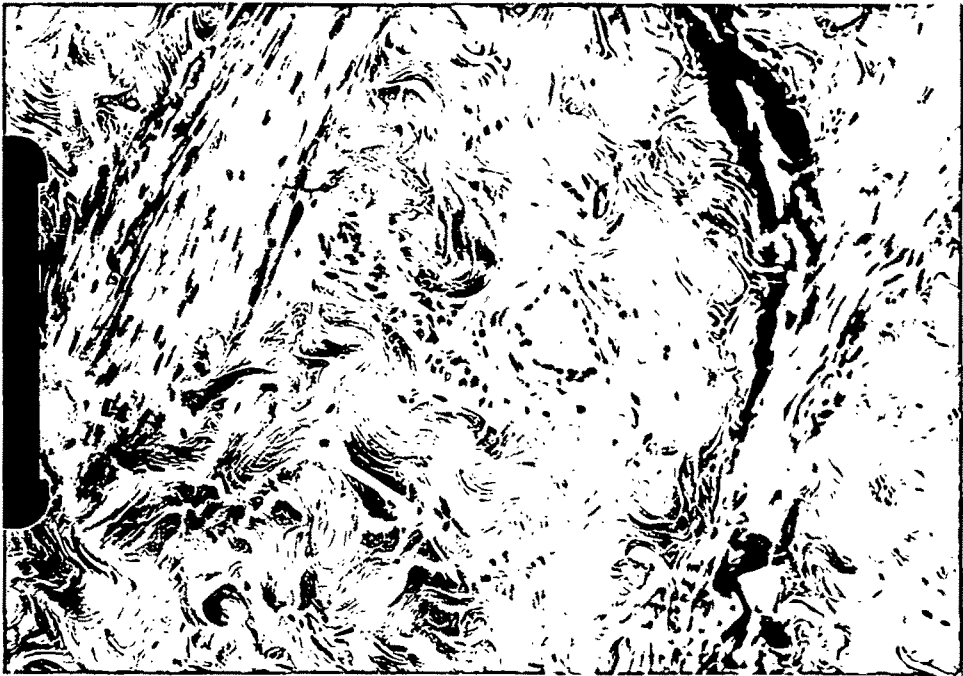


그림 8. 폐의 정상조직을 관찰할 수 없는 섬유소성 병변 소견

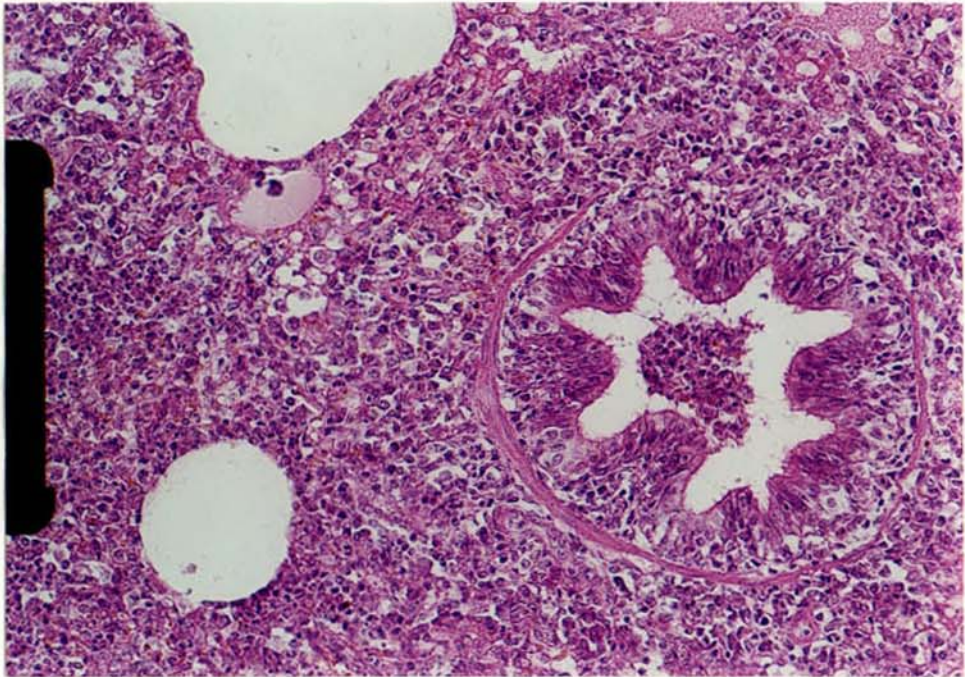


그림 9. 임파구성 소기관지염(lymphocytic peribronchitis) 소견

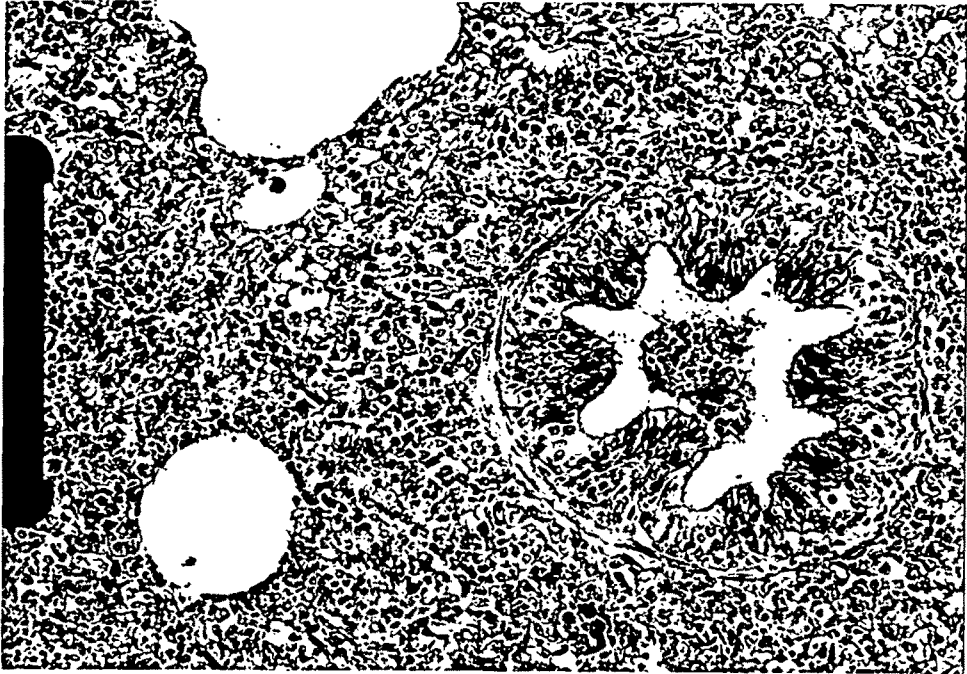


그림 9. 임파구성 소기관지염(lymphocytic peribronchitis) 소견

4. PRRS Virus 의 SDS-PAGE소견 및 Western blot 소견

1) SDS-PAGE소견:

MARC-145 Cell에 감염시키여 배양한 PRRS Virus를 회수하여 Triton-100으로 처리 수용성 항원에 대하여 SDS-PAGE에서 나타난 특이성은 그림 9 에서 보는 바와 같이 제 1열의 MARC-145 cell만의 항원성 물질은 110, 95, 85, 78, 77, 76, 70~30, 그리고 14 KD 등이 나타났으나, 제2열의 PRRS Virus에 감염된 항원에서는 85, 77, 75, 24, 18, 그리고 17 KD가 나타나고 있었다.

2) Western blot 소견:

IFA방법으로 자연감염된 PRRS양성 혈청과 음성 혈청을 이용하여 면역효소 반응을 관찰하였던 바, MARC-145항원에 대하여서는 양성 혈청에서는 95, 75 그리고 24KD의 Band가 나타나고, MARC-145세포에 PRRS virus를 감염된 항원에서는 희미한 반응대가 나타나고 있었으나 구분이 없었음. 한편 음성 혈청에서는 MARC-145 cell항원에 대하여서는 거의 반응하지 않았지만, 양성 혈청에 대하여서는 비특이 반응대가 105, 68 그리고 25KD가 나타나므로서 MARC Cell에 PRRS Virus가 감염된 항원에서는 항원, 항체 반응대 물질로서는 95, 74 그리고 24KD임을 알 수 있었다.

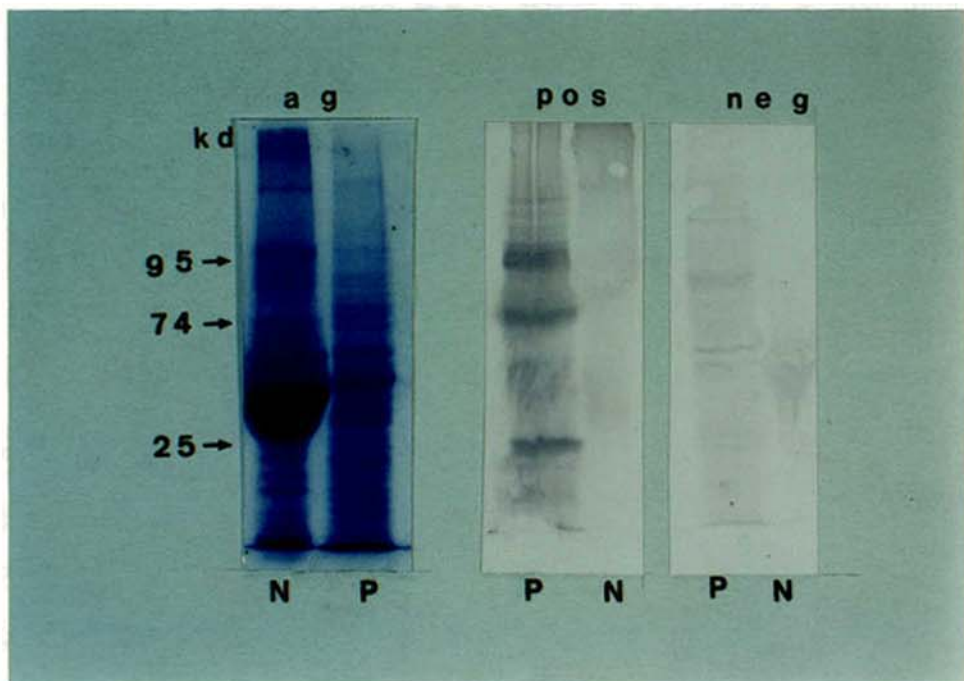


그림 10. SDS-PAGE 소견 및 Western blot 소견

ag: antigen

pos: positive serum

neg: negative serum

kd: kilodalton(molecular weight)

N: normal antigen

P: positive antigen

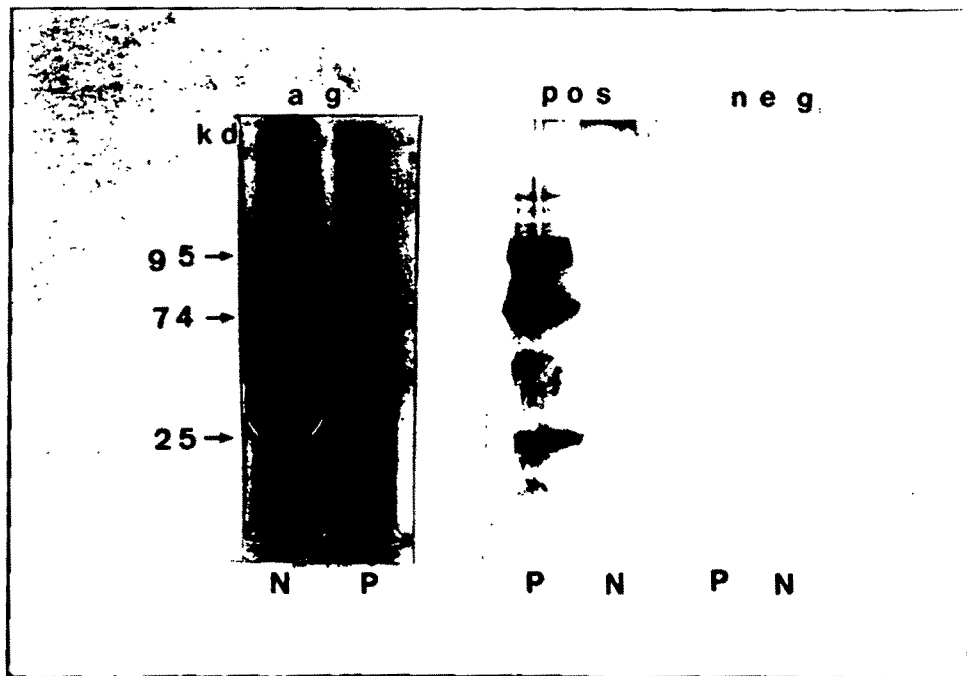


그림 10. SDS-PAGE 소견 및 Western blot 소견

ag: antigen

pos: positive serum

neg: negative serum

kd: kilodalton(molecular weight)

N: normal antigen

P: positive antigen

제 4 절 결 론

1. 전북지역의 한 양돈장에서 사육된 모돈에서의 폐 질환은 단독 감염된 예는 거의 없고 복합적인 감염 상태를 나타내고 있었고, 한 목장의 도축되는 폐의 임상병리학적 소견은 Pasteurellosis가 69%, Glasser's Disease 22% 그리고 흉막염 4%의 소견을 나타내었고 IFA방법에 의한 PRRS 감염율은 27%에 달하였다.

2. 도축되는 비육돈에서는 PRRS감염율은 23% 이었고 Mycoplasmosis는 35%, pasteurellosis 30 % 그리고 Glasser's Disease는 16 %로 관찰되고 있었고 전형적인 PRRS만의 임상적 폐의 염증성 소견만은 구분할 수 없었다.

3. 우리나라에서 분리된 PRRS virus의 크기는 투과전자현미경하에서 약 150,000배로 확대하여 관찰하였던 바, 180 X 185nm 크기의 원형의 미립자가 관찰되었다.

4. 국내 분리 PRRS Virus의 특이 항원성 물질은 85, 77, 75, 24, 18 그리고 17 KD물질이었으며, PRRS 양성혈청과의 면역 반응에서 나타난 특이 물질은 95, 74 그리고 24KD 등 이었다.

제 3 장 PRRS 진단 방법 연구

제 1 절 서 론

제 2 절 재 료 및 방 법

제 3 절 결 과

제 4 절 결 론

제 3 장 PRRS 진단 방법 연구

제 1 절 서 론

돼지 PRRS의 진단 방법은 혈청응집반응, 면역효소학적 반응, 분자생물학적 진단 방법이 활용될 수 있을 것이며, 많은 학자들은 세균이나 Virus성 질환의 진단을 위하여 끊임없는 연구를 수행하고 있으나, 농촌현장과 대학과 같은 실험실에서 손 쉽게 활용할 수 있는 진단 방법으로서 IFA와 면역확산법(Radial Immunodiffusion enzyme assay; RIDEA)를 확립하고자 하였다. 그 중에서 RIDEA의 원리는 항원과 항체를 결합한 후에 발색제에 의하여 나타나는 반응 형성대의 지름을 측정하여 항체의 역가를 간접적으로 측정하는 방법(Joo et al 1984)으로 이를 이용한 진단 방법으로서 돼지에서 *Mycoplasma hyopneumoniae*(Bereiter et al 1990), 말에서 *Equine rhinopneumonitis virus*(Gradil et al 1990)와 *Rhodococcus equi*(Takai et al 1990), 돼지에서 *Pseudorabies virus*에 대한 항체 검색(Goyal et al 1990, Joo et al 1984)에 이용된 보고가 있으며, 우리나라에서도 황 등(1993)이 일본뇌염 virus에 대한 항체 검색에 사용한 바 있었기에, 금번에 돼지의 PRRS의 혈청학적 진단 방법으로 활용할 수 있는 방안을 마련하고자 기초적인 실험을 수행하였다. 물론 이 진단 방법에 의한 항원 항체의 반응 정도를 비교하고자 IFA에서 측정된 항체가를 기준점으로 하여 비교시험하였던 바, 거의 일치되는 흥미있는 연구결과를 가져왔다. PRRS 감염 양성 판정을 위하여서는 무엇보다도

중요한 것은 진단용 항원의 감수성과 특이성이 가장 중요한 기준(Criteria)이다. 또한 우리나라의 양돈업이 기업화 추세에 있는 바, 모돈의 관리를 위하여서는 손쉽게 그리고 안전하게 진단할 수 있는 진단 방법의 확립은 양돈 사업에 보탬이 될 것으로 판단된다.

PRRS진단을 위하여 IFA 진단방법을 이용한 진단법이 혈청학적으로 활용되고 있다(Bautista et al 1993).특히 양돈 장에서의 PRRS감염은 아주 중요하여 새끼 돼지에서 약 42일간 지속적으로 감염 상태를 유지하는 것으로 알려져 있는 바, 항체 가는 감염 21일 경에 1:1024를 나타내며 임신 95일째에 번식 장애를 나타내었다(Bilodeau et al 1994). 물론 virus 의 동정을 위하여서는 몇 년이 소요되었지만 현재 우리나라 돼지 중 번식을 위한 돼지에서 격고 있는 경제적 손실을 최소화하기 위하여서는 PRRS의 감염 검색 방법, 예방약 생산 기술의 확립 등과 같은 연구가 있어야 할 것이다. 그리고 폐의 다른 질환의 발생과의 관련성 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 혈청의 준비

전북지역의 양돈장에서 사육되고 있는 모돈과 비육돈으로부터 각각 5두씩 채혈하여 진단 방법 확립을 위한 표준 혈청으로서 사용하였으며, 이들 혈청은 56°C에서 30분간 비등화시키어 사용하였다.

2. IFA 술식

① IFA용 plate 제작 : 75cm² 플라스크에 MARC 145 cell을 배양한 후 Trypsin- EDTA를 이용하여 cell을 부유시킨 후 96 well plate에 부유된 cell을 well에 각각 100 μ l씩 분주한다.

- 2일정도 5% CO₂ 상에서 배양하여 monolayer를 형성시킨다.
- 역가가 10³~10⁴TCID₅₀인 virus를 각 well 당 100 μ l씩 분주한다
(1번~10번까지 접종하고 11번과 12번은 접종하지 않음)
- 37°C, 5% CO₂ 상에서 48~60시간 배양한다.
- CPE가 70% 수준에 달하였을 때 배양을 중단한다.
- PBS(pH 7.2)로 2회 세척한 다음 Plate내의 물기를 제거한다.
- -20°C에 보관중인 absolute methanol을 각 well 당 100 μ l씩 분주하여 10분간 실온에서 방치한 후 공기중에 건조한 다음 밀봉하여 -20°C에 냉동 보관한다.

② 실험 방법 :

- 가검 혈청을 멸균 PBS(pH7.2)로 1:10으로 희석하여 접종 well에

100 μ l 접종함.

표준 양성, 음성 대조혈청을 주입(혈청은 1:10에서부터 1:248까지 희석한다).

37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감작시킴

PBS로 well 당 200 μ l씩 주입해 5회 세척

FITC-conjugate가 부착된 rabbit anti-swine IgG(KPL Co.)를 PBS로 1:2,000으로 희석하여 50 μ l씩 주입하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감작시킴.

PBS로 3회 세척

물기를 완전히 제거 후 형광하에서 관찰한다.

3. RIDEA 진단 kit의 준비

- ① 냉동 보관 중인 PRRS virus 항원을 carbonate buffer로 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 그리고 1:400 등으로 단계 희석하여 페트리디쉬에 5ml를 넣은 후 4℃에서 48시간 방치한다.
- ② 액을 버린 후 0.05% Tween 20 in PBS(pH 7.2)로 3회 세척한다.
- ③ 1% BSA가 함유된 PBS(pH 7.2)로 실온에서 3시간 방치한 후 액을 버린다.
- ④ 56℃로 식힌 agarose gel을 붓어 굳힌 후 지름이 3mm가 되도록 홈을 만든다.
- ⑤ 각 홈안에 가검혈청 15 μ l를 넣어 실온에서 overnight 시킨다.
- ⑥ peroxidase가 부착된 rabbit anti-swine IgG(KPL Co.)를 주입한다.
 - 페트리디쉬에서 조심스럽게 gel을 제거한다.
 - 0.05% Tween 20이 함유된 PBS(pH 7.2)로 3회 세척
 - peroxidase conjugate를 PBS를 이용 1:1,000으로 희석함
 - 페트리디쉬 안에 3ml를 주입하여 실온에서 45분간 방치한 후 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 3회 세척한다.
- ⑦ 50ml conical tube에 0.5ml ASA(5-aminosalicylic acid)와 0.5ml 0.3% H₂O₂를 넣은 후 20ml agarose를 conical tube에 넣은 후 잘 혼합하여 페트리디쉬에 3ml씩 넣은 다음 정확히 20분 후에 반응 정도를 관찰한다.

제 3 절 결 과

(1) 자연감염된 돼지 혈청에 대한 항체가 조사

1) IFA 방법으로 항체가 측정

- 전북의 한 양돈장에서 유,조산과 폐염증세가 있었던 노후 모돈 10두에 대하여 도체 검사 소견과 채혈한 혈청 10예를 가검혈청으로 삼아서 IFA역가를 측정하였던 바 양성 상태를 나타내는 예는 6두이었으며, 이 중 2예에서는 높은 항체가를 나타내었다.

- 그리고 이들 돼지에서 타 질병의 감염실태는 표 5에서 보는 바와 같이 Pasteurellosis 6 두, Mycoplasmosis 1두, Glasser 2두, 혼합감염 7예가 관찰되었다.

- 이들의 혈청에 대한 PRRS항체역가는 1:62에서 1:124로 나타내고 있는 예에서는 모두 혼합감염 상태를 나타내고 있었다. 또한 세균성 폐질환을 나타내지 않는 예는 2두가 있었으며, 이들은 PRRS음성 반응을 나타내었다.

표 5 모돈의 폐 질환 상태와 PRRS의 IFA역가

모 돈 (혈청 번호)	폐 질환				PRRS 항체역가
	Past	Myco	Glas	Mix In	
1	○			○	>1:124
2	○			○	>1:124
3		○	○	○	1:62
4					-
5			○	○	-
6	○		○	○	-
7	○			○	1:32
8					-
9	○		○	○	1:62
10					-

비고 : Past: Pasterellosis

Myco: Mycoplasmosis

Glas: Glasser

Mix In: Mixed infection

2. RIDEA 방법에 의한 항체가 조사 성적

IFA방법으로 PRRS양성으로 진단된 모돈과 음성으로 진단된 20두의 혈청을 이용하여 REDIA방법으로 PRRS 항원에 대한 면역반응을 관찰하였던 바, 그림 11에서와 같이 측정되었다. 이의 면역 반응은 그림 10에서 보는 바와 같이 양성과 음성의 구분이 용이하였다. 그리고 항원의 희석 배율은 1: 200의 희석 배율에서도 강한 면역 반응을 나타내고 있었다. 물론 적절한 항원과 혈청의 희석 배율 결정은 RIDEA에서 중요하게 작용하며, 본예에서는 항원의 단백질을 100mg/ml 활용하여 well에 주입한 후, 혈청은 희석치 않고 직접반응시키었다. 즉, 양성 혈청에서는 직경이 약 11mm 이상이었으나, 으묘성인 경우는 4~5mm로 나타나고 문제는 IFA에서 의양성 값을 나타내는 예가 7~8mm로 나타나므로써 구분이 잘 안되는 것이 하나의 단점이라고 할 수 있다.

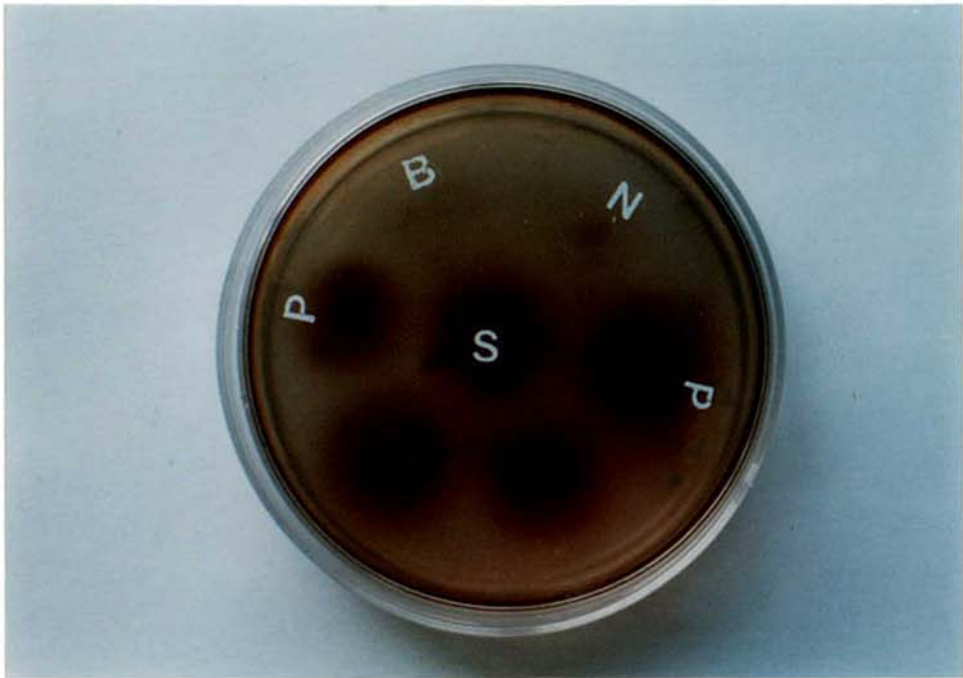


그림 11. PRRS항원에 대한 PRRS양성과 음성 혈청의 면역 반응

S: 표준 양성 혈청

B: 공백(Blank)

P: 가검혈청중 양성 반응의 예(positive)

N: 음성 반응 혈청(Negative)

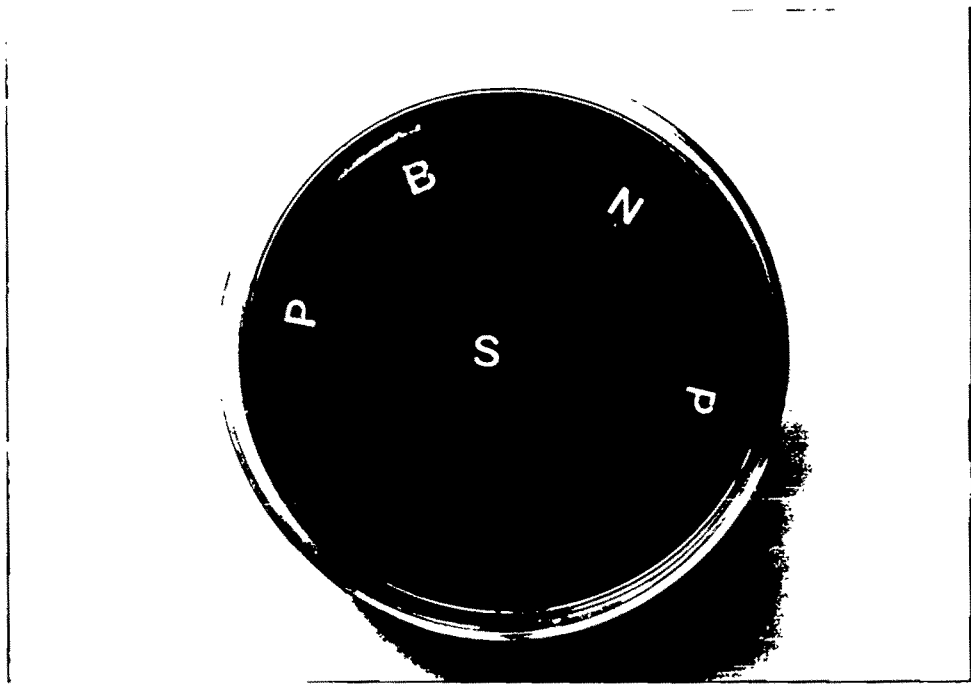


그림 11. PRRS항원에 대한 PRRS양성과 음성 혈청의 면역 반응

S: 표준 양성 혈청

B: 공백(Blank)

P: 가검혈청중 양성 반응의 예(positive)

N: 음성 반응 혈청(Negative)

표 6. 모돈의 혈청에 대한 PRRS 항원을 이용한 IFA와 RIDEA치의 비교

IFA RIDEA (mm)	<1:10	1:32	1:64	1:128	1:256	합 계
4 ~ 6	4					4
7 ~ 9		2	1			3
10 ~ 11			2	3	4	9
12 ~ 14			1	1	2	4
합 계	4	2	4	4	6	20

4) RIDEA Kit의 가치 평가

돼지의 20예를 무작위로 선발하여 IFA와 RIDEA치를 비교하였던 바, 표 6과 같은 결과를 얻었다. 즉, IFA가 높으면 RIDEA의 크기가 크고 작으면 작게 관찰되었다. IFA치가 >1:256 이상인 경우는 모두 >14mm 이상으로 관찰되었으며, 역가가 1: 124인 경우에는 대부분 11-13 mm의 반응을 나타내었다. 이로서 그림 11에서 보는 바와 같이 RIDEA방법은 우리 농촌 현장에서 손쉽게 활용할 수 있고 그 결과를 오랫동안 어떤 변화 없이 보존(약 1년 정도)이 가능한 진단 방법이라고 생각된다.

제 4 절 결 론

돼지의 PRRS진단 방법으로 활용되고 있는 IFA방법이 복잡하고 야외 목장에서 직접 활용하기에는 고가의 기기가 필요하며, 숙련이 필요하였으며, 손쉽게 정확한 감염여부를 밝힐 수 있는 진단용 KIT를 생산하고자 Redial Immunodiffusion Enzyme Assay(RIDEA)방법을 PRRS진단에 활용하기 위한 술식을 확립하고자 시도하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MARC-145 Cell에서 배양한 PRRS Virus를 회수하여 준비한 PRRS 항원을 이용한 IFA에서 음성으로 측정된 혈청은 RIDEA에서도 전혀 반응을 하지 않았으며,

2. IFA에서 1:64 정도의 역가를 나타내는 경우에는 RIDEA에서는 직경이 11mm이상으로 관찰되고 있어 양성 판정이 손쉬워 누구나 활용이 가능할 것으로 믿어진다.

3. 그러나, 미약한 면역 반응을 나타내 그 직경이 약 5~7mm로 나타날 경우에는 진단의 정확도가 떨어질 것으로 판단되는 단점이 있으나, 양성 체를 찾아내는 데는 간편한 진단 방법이라고 생각되어 산업화가 가능할 것으로 판단되었다.

제 4 장 PRRS 예방약의 생산 시험

제 1 절 서 론

제 2 절 재 료 및 방 법

제 3 절 결 과

제 4 절 결 론

제 4 장 PRRS 예방약의 생산 시험

제 1 절 서 론

최근의 PRRS증세를 나타내는 돼지의 수가 증가할 뿐만아니라 대규모 화되고 있고 돼지 사육 두수의 증가와 더불어서 PRRS에 대한 혈청학적 검색에서도 약 30% 정도의 양성 반응을 나타내고 있는 실정을 감안하여 보건데 신속한 예방에 관한 관심이 커지고 있다고 사료되는 바이다. 많은 양돈장에서는 번식장애와 호흡기 증세를 가져오는 PRRS의 예방을 위하여 예방접종을 실시하는가 하면 자돈의 구입 경로에 대한 관심을 배가시키고 있는 실정이다. PRRS의 예방을 위하여 검토될 수 있는 vaccine은 시판되고 있는 생독 백신과 불활화 vaccine 그리고 Subunit vaccine이 있을 수 있으며, 최근에는 타 세균과의 혼합 백신을 활용할 수 있을 것이다.

PRRS Virus의 생독 백신은 유행지역에서 활용가치가 높은 것으로 알려져 있으며, PRRS가 전혀 발병하고 있지 않은 지역의 농장에서의 예방약 접종은 예방용 virus 의 전파가 이루어질 기회를 주겠지만 안전한 것으로 알려져 양돈장에서의 활용이 크게 환영 받고 있다. 본 연구자는 국내에서 병원성이 있는 virus로서 분리된 virus를 배양하여 Subunit vaccine을 생산하여 실험적으로 접종한데 이어서 "H" 연구소에서 보유하고 있는 PRRS Virus를 불활화하여 자돈에게 면역성 항체를 형성할 수 있도록 자돈시기에 항원을 주입하였을 경우 면역항체 형성이 기대되어Subunit Vaccine과 불

활화 PRRS 백신과 *Mycoplasma sp*를 혼합한 혼합 백신을 활용하였을 경우 면역효과를 다르게 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

또한 우리나라 농장의 불량한 환경 여건상 일반 세균성 호흡기 질병이 크게 유행하고 있는 바, 자돈시기에 PRRS의 예방할 경우에 예방효과에 의한 임상 병리학적 소견을 파악하는 것은 용이하지 않음을 알 수 있었다. 본연구 시험에서는 예방약을 불활화하여 4주령과 8주령에 각각 접종하므로서 항체 형성만을 관찰하였을 뿐 도전시험은 수행하지 않았다. 예방약을 혼합하여 접종하는 방법의 시도는 양돈 산업의 규모가 확대되어 짐에 따라서 번식기계 질환, 소화기계 그리고 호흡기계 질환에 감염되었을 경우 직접적인 피해를 받게 되므로 양돈업계에서는 질병 방역에 큰 관심을 갖고 있는 실정이다. 불활화 예방약의 접종은 면역효과가 미약하여 임상적으로는 큰 기대를 꾀할 수 없겠지만 interleukin 과(Zuckermann et al 1999) 같은 몇가지의 면역활성촉진제를 adjuvant로서 활용한다면 어떤 질병에 대하여 청청 농장인 경우에는 활용가치가 있을 것으로 기대되는 바이다. 본 예에서는 PRRS를 불활화하여 Oil Vaccine으로 준비하여 자돈에게 접종하므로서 폐염증세만을 관찰하였지만 임신돼지에게 PRRS Virus를 불활화하여 접종한 Plana-Duran(1997)에 의하면 유산율이나 출생후 48시간 이내에 사망율이 대조군과 비교하여 월등히 낮은 것으로 보고하고 있는 바, 이에 대한 조사연구의 필요성이 기대된다.

외국에서도 PRRS에 감염된 돼지에서의 타세균의 감염이 어떤 영향을 끼칠 것인가는 항상 중요시되는 부분이라고 할 수 있을 것이다. 돈단독

인 경우에 있어서는 PRRS를 예방접종한 돼지에서 순화 돈단독 예방접종 시 돈단독균의 회수율이 적고, 임상 증세도 낮게 나타나고 있음을 보고되고 있음을 보건데(Sakano et al 1997) 타세균과 혼합 백신개발에 대한 가치 평가는 앞으로 있어야 할 것으로 판단된다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. PRRS Virus 항원용 생산

국내에서 분리한 혈청을 MARC 145 cell에 감작시킨 후, PRRS virus에 접종하여 얻은 감염 Cell을 건국대학교로부터 분양받아서 활용하였다. MARC 145 cell을 175 square 플라스크에 배양하여 3~5% fetal bovine serum(FBS)을 함유한 α -MEM 배지로 배양한다. 이와 더불어서 배양된 MARC 145 cell을 96 well에 옮겨 48시간 배양하여 monolayer가 형성되면 PRRS virus를 접종하여 CPE(cytopathic effect)가 약 70% 수준으로 형성되면 배양을 중단하고, 곧 PRRS virus를 회수하여 각종 예방약 생산 그리고 진단용 항원 등의 실험에 사용하였다.

① 실험실적 PRRS virus 항원 준비

- MARC-145 Cell의 배양으로 monolayer가 형성된 플라스크 virus를 접종하여 CPE가 70% 수준으로 형성되면 $4,000 \times g/30$ 분간 원심하여 cell pellet과 상청액(S1)을 분리한다.
- 0.85% saline을 cell pellet의 100배 정도 주입하여 잘 섞어 준 후 $4,000 \times g/30$ 분간 원심분리 한다.
- cell pellet을 버리고 상청액(S2)을 모은다.
- 모아진 상청액(S1+S2)을 $21,000 \times g/18$ 시간 원심분리하여 상청액을 버리고 모아진 pellet의 50배 만큼의 0.85% saline을 넣어 잘 섞어 준 후 $21,000 \times g/18$ 시간 원심분리한다.

- 상청액을 버리고 모아진 pellet의 200배 만큼의 saline을 넣고 180,000×g/40분간 원심분리하여 모아진 pellet을 saline으로 1,000배 희석하고 triton X 100을 0.2% 가하여 4℃에서 overnight stirring한다.
- 37℃에서 1시간 방치한 후 15,000×g/10분간 원심하여 PRRS virus를 모아 항원으로 준비한다.

② 산업적 항원생산 : MARC-145 Cell을 잉요한 항원의 다량 생산은 “H”연구소에서 생산하여, 냉동건조한 시작품을 활용하였다.

2. 시험용 돼지의 선정 및 목장 :

① 실험실적 실험: 4주령의 자돈 10두를 구입하여, 대학 목장에서 사육하면서 Subunit vaccine과 시판되고 있는 생독 PRRS 예방 접종 시험에 각각 5두씩 선발하여 사용하였다.

② 산업용 예방약(시작품): 전북의 “ C ”목장의 Landrace 자돈을 4주령과 8주령으로 구분하여 4개 단위 구분하여 각각 80두씩 시험 접종하였다.

3. 예방약의 종류와 준비

1) PRRS subunit vaccine의 생산 :

육안적으로 정상적으로 보이는 PRRS음성인 4주령(암)의 자돈 5두를 구입하여, 대학의 실험 목장에서 일반적인 자돈 사료를 구입하여 사육하면서 Subunit vaccine을 근육접종한 후에 4주와 8주후에 형성된 항체를 IFA방법으로 항체가와 중화항체를 측정하였다. 실험실에서 생산한 MarC-145 Cell에서 배양한 virus를 회수하여 MARC-145 cell을 eagle minimum Medium으로 배양하여 CO₂ incubator에서 배양하여, CPE가 약 70% 수준의 monolayer를 형성하였을 때 배양을 중단한 다음 항원을 생산하였음.

2) 불활화 PRRS백신 :

불활화 PRRS virus백신은; 다량 생산을 위하여 "H" 연구소에 의뢰하여 Virus 배양하여 불활화 시킨 냉동건조한 백신을 활용하였다.

3) 혼합 vaccine의 생산:

"H" 연구소가 보유하고 있는 *Mycoplasma hypopneumoniae*를 액체배지에 배양하여 균수가 약 5억 ~ 10억 CPU/dose에 달하였을 때, 배양을 중단하고 Formalin으로 불활화한 후에 PRRS virus를 동일한 량을 넣어서 냉동건조보호제를 주입하여 냉동건조 백신으로 생산한 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

4) 생독 PRRS vaccine 구입:

시중에서 시판되고 있는 " B "사의 생독 PRRS Vaccine 구입하여 전북대학교 시험목장에서 사육중인 5두의 4주령의 자돈에게 접종 한 후 항체를 얻었다.

4. 혈청의 준비

1) Subunit vaccine:

상기의 자돈을 전북대 목장에서 사육하고 있는 5두에게 1차 접종한 후 다시 4주 후에 추가 접종한 후, 2주간격으로 3개월간 채혈, 혈청을 분리, 보관하여 56℃에서 비동화시키 사용하였다.

2) 생독 PRRS Vaccine ;

전북대 목장에서 사육하면서 PRRS 음성인 4주령의 자돈 5두를 구입하여 1차, 그리고 추가 접종한 후에 2주간격으로 3개월간 채혈, 혈청을 분리, 보관하여 56℃에서 비동화시키 사용하였다.

3) 불활화 PRRS 단독 감염 시킨 혈청 :

전북의 "C"목장에서 사육중인 4주령의 자돈(78두) 과 8주령의 자돈(80두)에게 1차 접종한 후 4주후에 추가 접종한 후에 각군에서 무작위로 2주간격으로 5두씩 채혈하여 혈청을 분리, 56℃에서 비동화하여 실험에 활용하였다.

4) 불활화 PRRS 및 Mycoplasma phyopneumonia Vaccine 혈청:

전북의 "C"목장에서 사육중인 4주령의 자돈(80두)과 8주령의 자돈(80두)에게 불활화 PRRS 백신을 80두에게 PRRS와 Mycoplasma phyopneumonia를 불활화하여 1차 접종한 후 4주후에 추가 접종한 후 접종한 후 2주간격으로 약 60일간에 걸쳐서 무작위로 5두씩 채혈, 56℃에서 비동화시키여 사용하였다.

5. 면역 항체 측정 방법

1) 중화항체를 측정:

- 대형 Flask에 MARC-145 Cell을 Minimum Essential Medium Eagle 배지에서 배양하면서 monolayer가 형성되면 이를 1% Trypsin 처리하여 회수하였다.
- 96 Well에 배지를 50 μ l을 분주하며,
- 채혈한 혈청을 50 μ l을 넣은 다음 계속 희석한다(A \Rightarrow H)
- PRRS Virus(4 TCID₅₀) 배양액을 50 μ l 넣고
- Trypsin 처리한 MARC-145 Cell 100 μ l넣고
- CO2 Incubater에서 5일간 배양하여 CPE의 형성 유무로서 중화항체를 측정한다.

2) IFA 진단

IFA용 plate 제작 : 75cm² 플라스크에 MARC 145 cell을 배양한 후 Trypsin- EDTA를 이용하여 cell을 부유시킨 후 98 well plate에 부유된

cell을 well에 각각 100 μ l씩 분주한다.

- 2일정도 5% CO₂ 상에서 배양하여 monolayer를 형성시킨다.
- 역가가 10³~10⁴TCID₅₀인 virus를 각 well 당 100 μ l씩 분주한다
(1번~10번까지 접종하고 11번과 12번은 접종하지 않음)
- 37°C, 5% CO₂ 상에서 48~60시간 배양한다.
- CPE가 70% 수준에 달하였을 때 배양을 중단한다.
- PBS(pH 7.2)로 2회 세척한 다음 Plate내의 물기를 제거한다.
- -20°C에 보관중인 absolute methanol을 각 well 당 100 μ l씩 분주하여 10분간 실온에서 방치한 후 공기중에 건조한 다음 밀봉하여 -20°C에 냉동보관한다.

② 실험 방법 :

- 가검 혈청을 멸균 PBS(pH7.2)로 1:10으로 희석하여 접종 well에 100 μ l 접종함.
- 표준 양성, 음성 대조혈청을 주입(혈청은 1:10에서부터 1:248 까지 희석한다).
- 37°C에서 1시간 감작시킴
- PBS로 well 당 200 μ l씩 주입해 5회 세척
- FITC-conjugate가 부착된 rabbit anti-swine IgG(KPL Co.)를 PBS로 1:2,000으로 희석하여 50 μ l씩 주입하여 37°C에서 1시간 감작시킴.
- PBS로 3회 세척
- 물기를 완전히 제거 후 형광하에서 관찰한다.

3. RIDEA 진단 kit :

- ① 냉동 보관 중인 PRRS virus 항원을 carbonate buffer로 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 그리고 1:400 등으로 단계 희석하여 페트리 디쉬에 5ml를 넣은 후 4℃에서 48시간 방치한다.
- ② 액을 버린 후 0.05% Tween 20 in PBS(pH 7.2)로 3회 세척한다.
- ③ 1% BSA가 함유된 PBS(pH 7.2)로 실온에서 3시간 방치한 후 액을 버린다.
- ④ 56℃로 식힌 agarose gel을 붓어 굳힌 후 지름이 3mm가 되도록 홈을 만든다.
- ⑤ 각 홈안에 가검혈청 15 μ l를 넣어 실온에서 overnight 시킨다.
- ⑥ peroxidase가 부착된 rabbit anti-swine IgG(KPL Co.)를 주입한다.
 - 페트리디쉬에서 조심스럽게 gel을 제거한다.
 - 0.05% Tween 20이 함유된 PBS(pH 7.2)로 3회 세척
 - peroxidase conjugate를 PBS를 이용 1:1,000으로 희석함
 - 페트리디쉬 안에 3ml를 주입하여 실온에서 45분간 방치한 후 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 3회 세척한다.
- ⑦ 50ml conical tube에 0.5ml ASA(5-aminosalicylic acid)와 0.5ml 0.3% H₂O₂를 넣은 후 20ml agarose를 conical tube에 넣은 후 잘 혼합하여 페트리디쉬에 3ml씩 넣은 다음 정확히 20분 후에 반응정도를 관찰한다.

제 3 절 결 과

1. 생독 PRRS vaccine 과 Subunite Vaccine의 항체가 측정

시중의 생독 PRRS Vaccine(상품)과 Subunite vaccine을 5두의 4주령 자돈에게 접종한 후 항체 형성정도를 중화항체가를 이용하여 측정하였던 바, 표 7에서 보는 바와 같이 Subunite vaccine을 접종한 자돈에서는 접종량을 100mg나 200mg 투여하면 큰 차이 없이 4주후에 중화항체가가 약 3.1 그리고 4.2정도로 나타났었으며 이는 8주까지도 유지되는 것을 관찰하였다.

또한 시중에서 판매되고 있는 PRRS Virus 예방약을 접종하였던 바, 2주부터 항체가 형성되 4주와 8주에는 높은 중화항체가를 보이고 있었다. 즉, Subunite vaccine의 효과는 시중에서 판매되고 있는 예방약 보다는 면역원성이 낮게 측정되었다.

또한, 이들 혈청을 이용하여 중화항체가와 REDIA의 면역 반응과의 관계를 규명하기 위하여 관찰하였던 바, 표 8에서 보는 바와 같다. 즉, 중화항체가가 2.5인 경우에는 RIDEA의 직경은 6mm정도에 달하였으며, 중화항체가가 3.1인 경우는 8mm로서 상승하는 양상을 나타내었다.

표 7. 생독 PRRS vaccine과 Subunit Vaccine 의 중화항체역가

예방약		예방접종후(주)		2주	4주	추 가 접 종	8주
		10	1 두				
Subunit vaccine (mg/dose)	100	2 두	2.5	3.1		4.1	
	200	2 두	2.5	4.3		4.5	
	시 중 PRRS vaccine		5두	3.2		5.4	5.3

NE: Nil

표 8. 생독 PRRS vaccine과 Subunit vaccine의 중화항체역가와 RIDEA의 반응 크기의 비교

예 방 약		예방접종후(주)		추 가 접 종	8주
		2주	4주		
Subunit vaccine (100mg/dose)	중화항체가	2.5	3.1	가	4.1
	RIDEA (mm)	6	8		8
시 중 PRRS vaccine	중화항체가	3.2	5.4	접 종	5.3
	RIDEA (mm)	7	12		12

2. 불활화 PRRS Vaccine

(1) 4주령의 자돈에서의 면역효과 :

불활화한 PRRS 예방약을 근육접종한 후 10일, 17일, 25일(추가접종) 그리고 58일에 각각 채혈하여 얻은 혈청을 이용하여 IFA와 RIDEA를 측정 하였던 바, 표 9에서 보는 바와 같이 10일 후에는 거의 항체 형성 정도를 관찰할 수 없었으며, 15일 후에는 1:32의 항체 역가를 형성하다가 25일 이후에는 1:128로 상승하다가 60일 후에는 다시 저하되는 소견을 나타내었으며, RIDEA는 IFA의 역가가 상승하는 것과 거의 비슷하게 그 크기가 크게 관찰되어 그 직경이 약 10mm에 달하였다.

그러나 PRRS virus 와 *Mycoplasma sp*를 불활화하여 접종한 예에서는 IFA에 의한 항체가가 약간 낮게 관찰되었으며, RIDEA역시 약간 낮게 관찰되었지만 항체의 형성은 확인할 수 있었다.

(2) 8주령의 자돈에서의 면역효과:

불활화한 PRRS 예방약을 근육접종한 후 10일, 17일, 25일(추가접종) 그리고 58일에 각각 채혈하여 얻은 혈청을 이용하여 IFA와 RIDEA를 측정 하였던 바, 표 9에서 보는 바와 같이 10일 후에는 거의 항체 형성 정도를 관찰할 수 없었으며, 15일 후에는 1:10의 항체 역가를 형성하다가 25일 이후에는 1:64로 상승하다가 58일 후에는 다시 저하되는 소견을 나타내었으며, RIDEA는 IFA의 역가가 상승하는 것과 거의 비슷하게 그 크기가 크게 관찰되어 그 직경이 약 8mm에 달하였다.

그러나 PRRS virus 와 *Mycoplasma sp*를 불활화하여 접종한 예에서

는 IFA에 의한 항체가가 약간 낮게 관찰되었으며, RIDEA역시 약간 낮게 관찰되었지만 항체의 형성은 확실하였다.

표 9. 불활화 PRRS 예방약과 혼합예방약의 항체가 비교

실험군 연령		접종후 일			접종	58	폐사율	
		10	15	25				
4주령	PRRS (Ⅰ군)	IFA	<10	32	추 가 접 종	64	3%	
		RIDEA(mm)	4	7		10		
	PRRS+ Myco (Ⅱ군)	IFA	<10	32		64	32	4%
		RIDEA(mm)	4	6		9	8	
8주령	PRRS (Ⅲ군)	IFA	<10	10		64	32	6%
		RIDEA(mm)	4	6		8	8	
	PRRS+ Myco (Ⅳ군)	IFA	<10	10		64	32	5%
		RIDEA(mm)	4	6		8	8	

비고 PRRS: Porcine Respiratory Reproductive syndrom

IFA: Indirect Flourscene Antibody Assay

RIDEA: Redial immunodifussion Enzyme Assay

(3) 폐사율 조사: 100일간의 사육기간에 걸쳐서 4주령의 자돈에서는 폐사율은 불활화 PRRS 백신은 3%이었으며, 혼합백신은 4%이었다. 그러나 8주령에 접종한 경우는 PRRS단독 접종시에는 6%이었고, 혼합백신인 경우는 5%로서 낮게 관찰되었다.

(4) IFA와 RIDEA치의 비교

자연감염된 돼지의 5예를 무작위로 선발하여 IFA와 RIDEA치를 비교하였던 바, 표 4와 같은 결과를 얻었다. 즉, IFA가 높으면 RIDEA의 크기가 크고 작으면 작게 관찰되었다. IFA치가 >248이상인 경우는 모두 >14mm 이상으로 관찰되었으며, 역가가 124인 경우에는 대부분 11-13 mm의 반응을 나타내었다. 이로서 그림 2에서 보는 바와 같이 RIDEA방법은 우리 농촌 현장에서 손쉽게 활용할 수 있고 그 결과를 오랫동안 어떤 변화 없이 보존(약 1년 정도)이 가능한 진단 방법이라고 생각된다.

제 4 절 결 론

자돈에서의 PRRS 예방약을 불활화, Subunit vaccine, 그리고 혼합 백신을 1차 접종한 후 4주후에 추가 접종한 후 2주간격으로 채혈하여 항체의 형성을 측정하였으며, 이들의 임상병리학적 소견을 관찰하기위하여 5두를 선정하여 무작위로 도축 관찰하였고, 시험 종료시점에 있어서의 폐사율을 비교 관찰하였던 바 다음과 같은 임상적 결과를 얻었다.

1. PRRS Virus subunit vaccine를 4주령의 자돈에게 단백질량을 100mg/dose로 접종한 후의 항체 형성량을 중화항체가로 측정하였던 바, 2주 후에는 2.5, 4주 후에는 3.1이었으나 추가접종한 4주 후에는 4.1로서 관측되었다. 생독 백신 접종에서는 중화항체가는 2주 후에는 3.2, 4주 후에는 5.4 그리고 추가 접종 4주 후에는 5.3이었다.

2. PRRS불활화 백신을 4주령의 돼지에게 접종한 후의 IFA와 RIDEA에서 얻어진 항체가를 비교하였던 바, 15일 후에는 모든 돼지에서 높은 항체 형성정도를 확인 할 수 있었고, 25일 후에는 1:128 그리고 58일 이후에는 1:64를 나타내고 있었으며, RIDEA에서도 25일 후에는 7mm이상의 면역반응을 나타내었다.

3. 혼합백신을 접종한 4주령의 자돈에서는 접종한 후 25일 이후에는 IFA가가 1:64이었으나 8주령에 접종한 예에서도 1:64의 항체 역가를 나

타 내었다.

4. 불활화 PRRS 단독 백신을 접종한 4주령의 군(I)에서의 폐사율은 3%이었으며, 8주령에 접종한 군(III)에서는 6%로서 관찰되었다. 그러나 혼합백신을 접종한 4주령의 군(II)에서는 4%이었고, 8주령에 접종한 군에서는 5%이었다.

6. 혼합백신을 4주령에게 접종한 군(II)에서는 4%의 폐사율을 나타내었고 8주령에 접종한 군(IV)에서는 6%에 달하였다.

제 5 장 참고 문헌

김봉환(1982) 자돈의 병원성 대장균증에 관한 연구. 대한수의학회지. 22(2):155-159.

김승재, 박남용(1997) 돼지의 생식기 및 호흡기 증후군 진단을 위한 in situ hybridization 기법의 응용. 대한수의학회지 37(4):793-807.

조길재, 김봉환(1989) 영남지방 돼지의 *Pasteurella multocida* 감염 상태 및 분리균의 생화학적 특성. 대한수의학회지. 29(4): 479-485.

김재훈, 황의경, 배유찬, 손현주, 박중원, 윤용덕(1995) 면역전자현미경(IEM) 기법 및 immunogold conjugate 면역전자현미경(IGC-IEM) 기법을 이용한 돼지 분변내 PED바이러스의 검출. 35(3):575-581.B

박남용, 조경오(1994) 돼지의 유행성 설사(Porcine Epidemic Diarrhea) 의 진단을 위한 면역 조직화학적 기법의 응용. 대한수의학회지. 34(4):805-813.

Bautista EM., Goyal SM., Collins JE(1993) Serologic survey for Lelystad and VR02332 strains of porcine respiratory and reproductive syndrome(PRRS) virus in US swine herds. *Journal*

of Veterinary Diagnostic Investigation. 5(4):612-614.

Bereiter, Young TT, Joo HS, Ross RF(1990) Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet. Microbiol.* 25(2-3):199-192.

Bilodeau R., Archambault D., Vezina SA, Sauvageua R., Fournier M., Dea S.(1994) Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 58(4):291-298.

Bautlista EM, Goyal SM, Yoon IJ, Joo HS, Collins JE(1993) Comparison of porcine alveolar macrophages and CL2621 cells for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus and antiPRRS antibody. *J Vet Diagn Invest.* 5:163-165.

Benfield DW, Neison B, Coilins JE, Harris L, Goyal SM, Roblson D, Christianson WT, Morrison RB, Gorcyca D, Chladek D(1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest.:*

4:127-133

Christianson WT, Joo H S(1994) Porcine reproductive and respiratory syndrome: A Review. *Swine Health and Production*. 2(2):10-26.

Collins J(1992). International symposium on SIRS/PRRS. *American Assoc Swine Pract News*. 4:1.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Gorcyca DE, Chladek DW, Morrison RB(1991). Swine infertility and respiratory syndrome (mystery swine disease). MN *Swine Con for Vet*. 9/15-17, St. Paul pp200-205.

Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, Harris L, Hennings JC, Shaw DP, Goyal SM, McCuilough S, Morrison RB, Joo HS, Gorcyca D, Chladek D(1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus(isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*. 4:117-126

Collins JE(1991) Newly recognized respiratory syndromes in North American swine herd. *American Assoc Swine Pract News*.

1991; 3:7-11.

Dee Sa, Joo HS, Park BK, Molitor TW, Bruna G(1998) Attempted elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from a seedstock farm by vaccination of the breeding herd and nursery depopulation. *Vet Rec.* 1242(21):569-572.

Dee SA & Joo H(1997) Strategies to control PRRS: a summary of field and reserach experiences. *Vet Microbiol.* 55:347-353.

Dial D, Hull BD, Oison CL, Hill HT, Etickson GA(1990). Mystery swine disease: impilcation and needs of the North American swine industry. MSD Com Mig, Donver. Livesiock Consorvation. 10/6.

Edwards S, Robertson IB, Wilesmith J, Kilner C, Paton D, Drew T, Brown I, Sands J(1992). PRRS(blue-eared pig disease) in Great Britain. *American Assoc Swine Pract News.* 4:32-36

Frey M, Eerntsse K, Landgraf J, Pearson J, Chladek D(1992). Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Service Laboratories (NVSL). *American Assoc Swine Pract News .* 4:31.

Goyal SM, Joo HS, Mourning JR, Mcpherson SW, Goyal K(1987)
Comparison of three serotests for the detection of
pseudorabies antibodies in pig. *Com Immunol Microbiol Infec
Dis.* 10(3-4):167-171.

Gradil C, Joo HS(1988) A radial immunodiffusion enzyme assay for
detection of antibody to equine rhinopneumonitis virus(EHV-1)
in horse serum. *Vet Microbiol.* 17(4):315-322.

Hwang YO, Jun MH(1993) Evaluation of radial immunodiffusion
enzyme assay(RIDEA) for detection of antibody to Japanese
B encephalitis virus. *Kor J Vet Public Hlth.* 17:307-319.

Kang S Y(1992) Development of diagnostic methods for rotavirus
from pigs using monoclonal antibody. *대한수의학회지.*
32(4):569-577.

Kim D K, Yeo S G(1989) Serotypes of *Staphylococcus hyicus* subsp
hyicus isolated from pigs. *대한수의학회지.* 29(4):475-478.

Kim B H, Kweon CH, An S H, Rhee J C(1992) Pig viral disease
causing reproductive failure in Korea. *J Kor Vet Medi Sci*

32(3):365-368.

Kay RM., Done SH., Paton DJ(1994) Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. *Veterinary Record*. 135(9):199-204.

Laemmli, V. K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

Kuwahara H., Nunoya T., Tajima M., Kato A., Samejima T.(1994). An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 56:901-909.

Loula T. Mystery pig disease. *Agri-Practica*. 1991, 12: 23-34

Morrison R, Bautista E, Goyal S, Collins J, Anneill J. Seroprevalence of SIRS virus in the United States in 1990. *American Assoc Swine Pract News*. 1992; 4:47.

Nielsen TL, Nielsen J, Have P, Baekbo P, Hoff-Jorgensen R, Botner A(1997) Examination of virus shedding in semen from

vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 54:101-112.

Ohlinger V, Weiland F, Weiland E, Mettenleiter T, Haas B, Visser N, Ahl R(1992). Some aspects of the virus causing PRRS in Germany. *American Assoc Swine Pract News.* 4:16.

Ohlinger V, Haas B, Salimulier A, Beyer J, Visser N, Welland F(1992). In vivo and in vitro studies on the immunobiology of PRRS. *American Assoc Swine Pract News.* 4:24

Ohlinger VF, Ahl R, Haas B, Mattenleiter TC, Rziha HJ, Saalmuller A, Straub OC, Visser N, Weiland E, Weiland P(1991). The German experience with the swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). *MN Swine Con for Vet.* 9/17,. St. Paul. Addendum.

Oleksiewicz MB, Botner A, Madsen KG, Storgaard T(1998) Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet-Microbiol.* 64(1):7-22.

- Paton DJ, Brown I, Done S, Scott AC(1991) Laboratory investigations of "blue-eared pig disease in Great Britain. *European Comm Seminar on PRRS*. 11/4-5. Brussels, "9.
- Pirzadeh B, Dea S(1998) Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*. 79:989-999.
- Pointon AM, Byrt D, Heap P(1985) Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Aust Vet J*. 62(1):12-18.
- Polson DD, Marsh WE, Dial GD(1990). Financial implication of mystery swine disease(MSD), MSD Com Mtg, Denmark. Livestock Conservation Institute 10/6, 8-28
- Puran-Duran J, Bastons M, Urniza A, Vayreda M, Vila X, Mane H(1997) Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol*, 55(1-4):361-370.
- Rossow K, Bautista E, Goyal SM, Shaw DP et al(1990) The effect of pig age on clinical disease and immunopathogenesis of SIRS virus infection. *American Assoc Swine Pract News*

4:26.

- Quaife T(1989). Scramble is on to solve mystery disease. *Swine Practitioner*. July: 5-10. Stevenson GW., Van Alstine WG.
- Kanitz CL(1994) Characterization of infection with endemic porcine reproductive and respiratory virus in a swine herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 204(12):1938-1942.
- Sakano T, Shibata I, Naminatsu T, Mori M, Ono M, Uruno K, Osumi T(1997) Effect of attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine in pigs infected with porcine reproductive respiratory syndrome virus. *J Vet Med Sci*. 59(11):977-981.
- Shin J, Torrison J, Choi CS, Gonzales SM, Crabo Bg, Mplitor TW(1997) Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Vet Microbiol*. 55:337-346.
- Suarez P., Zardoya R., Prieto C., Solana A., Tabares E., Bautista JM. Castro JM(1994) Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction(RT-PCR). *Archives of Virology*.

135:89-99.

Takai S, Kazama N and Tsubaki S(1990) Radial immunodiffusion enzyme assay for antibodies to *Rhodococcus equi* in horse sera
Jpn J Vet Sci. 52(3):653-655.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BK(1999) *Mycoplasma hyponeumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol.* 37(3):620-627.

Tsang VCW et al(1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques(EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Method in Enzymology.* 92:337-391.

Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanftz CL(1993). Diagnosis of PRRS. *Swine Health and Production.* 1993; 1:24-28.

Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanftz CL(1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyponeumoniae* infection in young pig. *Vet. Microbiol* 49:297-303.