

최      중  
보    고    서

GOVP 12010441

636. off  
L293 E

돼지의 생산성 향상을 위한  
바이러스 및 기생충성 질병 방역대책

Preventive program for porcine  
viral and parasitic disease to improve production

연구기관  
서울대학교

농      림      부



# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지 생산성 향상을 위한 바이러스 및 기생충성 질병 방역대책  
과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 28

주관연구기관명 : 서울대학교 수의과대학

총괄연구책임자 : 이영순 (교수)

연 구 원 : 채찬희 (조교수)

연 구 원 : 박재학 (조교수)

연 구 원 : 윤희정 (조교수)

# 요 약 문

## I. 제 목

돼지 생산성 향상을 위한 바이러스 및 기생충성 질병 방역대책

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

세계 선진 각국이 자국의 이익을 위하여 한국을 포함한 개발도상국들에게 수출입 자유화 정책을 강력하게 요구하고 있으며, 많은 부분에서 수출입 자유화가 이루어지고 있는 현 시점에서 우리의 축산업을 보호하기 위하여는 축산물의 생산원가를 절감하여 국제경쟁력을 높이는 일만이 최선의 방책이라 사료된다. 축산업의 생산원가는 인건비, 육종 연구비, 토지 및 시설 투자비, 사료비 및 질병예방 방역비등으로 구성되는데 이를 절감시키기 위하여는 질병예방 방역비를 제외한 모든 비용은 축산업을 경영하는 사람이 조절하기가 매우 어려운 부분들이다. 물론 인건비를 줄이기 위하여 시설을 자동화해야하고 사료비를 줄이기 위하여 사료효율을 최대한으로 올리는 연구가 이루어져야 하며, 좋은 품종을 개발하여 최소의 사료급여로 최대의 증체효과를 올려야 하며, 토지 및 시설 투자비를 낮추기 위하여 값싸고 고품질의 시설물을 개발하는 것 등이 필요하다. 그러나 이러한 부분들은 매우 어려운 부분이지만 질병예방 방역비 부분은 질병의 발생, 진단, 치료 및 예방에 대하여 잘 이해한다면 상당부분의 방역비를 줄이고 생산성을 높일 수 있는 부분이다.

국민 식생활에 직접 관련이 있는 축산동물에서 전염성 질병은 심각한 상태이며, 최근 수입 개방에 따라 외래성 질병의 우려가 높아지고 있고, 특히 축산동물의 질병피해는 매년 축산 총생산액의 약 20%로써 그 손실액은 축산업 기반 자체를 위협하고 있는 실정이다. 그런데 질병의 예방, 진단, 치료에 이용되는 시약 및 기술은 외국에 거의 의존하고 있어 경제적 부담은 매우 크다.

본 연구의 목표는 현재 양돈사육농장에서 경제적인 피해를 크게 입히는 생식기, 호흡기와 소화기 질환을 일으키는 바이러스성 질환과 기생충성 질병을 효과적으로 예방하고 박멸하기 위한 질병 방역대책을 수립하여 국내 돈육시장이 개방되더라도 국내 양돈산업이 지속적인 경쟁력을 가질수 있도록 하기위함이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 효과적인 수행을 위하여, 돼지 생식기 호흡기 중후군 바이러스의 분리 및 항원성 변의, 국내 감염률 분포, 국내 분리주에 의한 포유자돈에서의 폐렴 유발 및 임신모돈에서의 유산 유발, 조직내 교잡법과 면역조직화학법에 의한 진단법 개발을 수행하였다. 돼지 코로나바이러스 감염에 대한 방제프로그램 연구를 위해서는 국내 돼지의 돼지 유행성 설사병 바이러스(PEDV) 항체를 조사하여 그 실태를 조사하고 경쟁적 ELISA법을 개발하여 돼지의 분변으로부터 항원을 검출하는 기법을 확립하고자 수행 하였다. 또한 새로운 진단법(분변과 장의 유제를 이용한 면역 전자현미경법)의 확립과 간접형광항체법,역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)법을 확립하고 한국에서 새로운 돼지 유행성 설사병 바이러스 분리를 위해서 수행되었다. 이러한 기법을 이용하여 초유결핍 자돈에서 새롭게 분리된 돼지 유행성 설사병 바이러스의 병원성(pathogenicity)를 입증하는 PAS 항체와 돼지 유행성 설사병 바이러스의 단크론 항체를 이용한 면역조직화학법을 확립하였다. 한편, 돼지 유행성 설사 바이러스 백신을 경구용으로 만들기 위하여 백신을 근육 투여한군과 경구 투여한 군으로 나누어 비교하고자 하였고 돼지에 감염 실험하여 확인한 돼지 유행성 설사병 바이러스를 이용하여 경구용백신을 만들어 안전성 및 효력시험을 하기위하여 본 연구를 수행하였다.이러한 결과를 토대로 경구용 돼지 유행성 설사병 바이러스 백신의 제조를 목표로 본연구를 수행하였다. 돼지의 생산성 향상을 위한 내외부 기생충성 질병의 방제프로그램을 연구하기 위하여 원충류, 선충류, 외부기생충, 흡충류 및 조충류에 대한 국내 분포 조사와 구충 효능 시험을 실시하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

국내에서 분리한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 항원성의 변이가 다양하며, 국내 모돈에서 높은 양성률 (45.2%)을 밝혀졌다. 국내 분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 포유자돈에게 전형적인 간질성 폐렴을 유발한다. 임신모돈에게 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 결과 유산과 사산을 유발하는 국내 분리 바이러스도 있고, 유산과 사산을 유발하지 않는 국내 분리 바이러스도 있는 것으로 확인되었다. 또한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 진단에는 조직내 교잡법 (in situ hybridization)이 매우 유용한 것으로 확인되었다. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 경우 바이러스의 항원성이 다양하기 때문에 현재 사용중인 상업백신이 농장마다 효과가 다르게 나타날 수도 있다. 국내 분리를 바이러스를 이용하여 실험적으로 포유자돈에서 간질성 폐렴을 유발하였다. 실험 감염 결과 국내 분리 바이러스도 전형적인 호흡기 질병을 유발하는 것으로 증명되었다. 또한 모돈에서 45.2%의 높은 혈청 양성률에도 불구하고 감염되는 바이러스에 따라서는 생식기 질환의 발생유무 차이를 관찰할 수 있다. 이러한 관찰은 중요한 의미로서 농장에서 단지 ELISA 검사법 등을 이용한 혈청검사만으로 모돈의 생식기 질환을 진단한다면 많은 오진이 유발될 수 있음을 증명하였다. 자돈에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 진단하는 방법에는 바이러스의 직접 분리방법이 있는데, 분리 방법은 시간과 경비가 많이 소모될 뿐만 아니라 신선한 가검물을 의뢰해야 되는 단점이 있다. 본 연구를 통해 개발한 조직내 교잡법을 이용하면 바이러스 분리없이도 폐장 등의 장기에서 바이러스의 핵산을 검출할 수 있다. 또한 조직내 교잡법은 포르말린에 고정된 조직을 사용할 수 있으므로 검사 장치의 상태에 크게 영향을 받지 않는 장점이 있다.

국내 돼지 유행성 설사병 바이러스의 항체가 검사에서 돼지의 45%에서 검출되었다. 돼지 유행성 설사병 바이러스 (PEDV) 감염을 분변이나 장내용물로 부터 진단할 수 있는 면역전자현미경법을 개발하였다. 본 연구에서 수행한 동물접종실험에서 감염된 8마리 중 2마리가 접종 18시간부터 설사를 나타내었으나 용모위축은 관찰되지 않았다. 접종 50시간에는 전체 감염자돈이 설사를 시작했다. 접종 62시간과

접종 71시간에 2마리의 동물이 매우 쇠약해졌고, 구토와 기립 불능을 나타내었다. 접종 100시간과 110시간에 감염 실험한 2마리의 자돈이 폐사되었다. 이번 연구에서는 백신의 안전성과 효과를 측정하고자 생체 실험을 수행하였다. 백신을 근육에 주사한 후에 어떤 임상 증상도 관찰되지 않았기 때문에 본 연구에서 사용한 PEDV는 안전한 것으로 밝혀졌다. 그러나 혈청중의 항체가 측정의 결과는 일정한 결과가 나오지 않았다. 근육내 백신을 투여하였을 때 혈청 항체가는 돼지 전염성 위장염 (TGE) 백신등과 함께 복합 투여한 군에서만 상승하였을뿐, 다른 동물에서는 1차면역시 정도로 상승한 것이외에는 2차추가접종시 상승하지 않았다. 그러나 이러한 결과는 ELISA에 의한 어느 정도의 혈청학적 결과 범위가 적당한 보호를 위한 실제 점막면역에 관련되어 있는지가 명확하지 않기 때문에 적당한 백신의 정확한 면역상태를 설명하기는 어렵다고 사료된다. 경구용 백신연구를 통하여 본연구에서 초유를 급여하고 PEDV 항원이 없는 돼지를 이용하여 실험을 수행 하였다. 그러나 그 결과 공격시험에서 백신을 투여한 돼지 뿐만아니라, 대조군의 돼지도 일부에서만 설사가 일어났고 통계학적으로 전혀 예측할수 없는 결과를 보였다. 이러한 결과에 대한 이유는 PEDV에 대한 면역반응의 변동이 돼지의 개체에 따라 심한 것이 이유로 추정된다. 향후 정확한 백신의 역가 실험을 위해서는 실험동물의 품질보증문제 (특정병원성 부재 동물생산, 무균동물생산등), PEDV에 대한 면역학적 전개 등이 집중적으로 연구되어 백신과 항체가 사이의 정확한 연관관계를 밝힐 필요성이 있다.

3년간에 조사된 총 두수는 14,983두로써 총 1,916두가 기생충에 감염되어 12.8%를 나타냈으며, 돼지회충 (5.0%), 콕시듐 (3.8%), 대장발란티디움 (1.4%), 외부 기생충 (1.3%) 및 돼지편충 (1.2%) 등의 순으로 높은 감염율을 보였다. 돼지의 발육 단계별로는 모돈이 기생충 감염율이 18.0% (153두)로 매우 높았으며, 육성돈이 11.0% (981두), 자돈이 10.5% (756두) 순으로 나타났다. 약제 구충효능의 실험 결과는 실험에 공시된 약제들이 모두 효능이 우수하였으며 투약 1주일 후에는 부분적으로 총란이 검출되었으나 투약 3주일 후부터는 총란이 검출되지 않았다. 이것은 투약 후 총체는 제거되었으나 장관내에나 돈사내에 오염된 총란이 완전히 제거되지 않아서 구충이 되었음에도 총란이 검출된 것으로 사려된다. 특히 I 약제나 D 약제는 장관 내 선충류 뿐만 아니라, 개선충인 외부 기생충까지 구충하는 효과가 있어서 1회 투

여로 돼지에서 문제시되는 장내 선충과 외부 기생충을 거의 제거할 수 있다는 장점이 있다. 특히 어린 자돈에서의 외부 기생충인 개선충에 이환시 증체저하를 가져와 경제적 손실이 크다. 그러나 이들의 병원체 확인 검사는 용이하지가 않다. 임상증상과 투약 후의 반응은 좋은 치료는 물론 진단으로써도 가치가 있다. 포유자돈에서 콕시듐증은 수년 전까지는 잘 알려지지 않은 질병이나 90년대 중반에 들어와서 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 요즈음 설사를 하는 포유자돈에 항생제 투여를 하여도 잘 듣지 않는 경우가 있는데 이때는 콕시듐증에 의한 설사를 의심할 수가 있다. 콕시듐증에 감염시 자돈의 심한 설사와 함께 증체 저하를 가져와 비육시에도 성장에 영향을 미칠 수 있다. 모돈 또는 웅돈에서는 분만사에 입실 전에 구충하고 분만사는 깨끗이 정소하고 소독할 것, 기생충은 비교적 열에 약하므로 뜨거운 물로 소독하고 소독액으로 재차 소독하는 것이 바람직하다. 후보 모돈이나 웅돈에 대하여는 해당 양돈장에 기생충이 박멸된 것이 확인되기 전까지는 매 2개월마다 구충을 하는 것이 바람직하다. 포유자돈에서는 항 콕시듐 제제로 3-7일령에 구충하고 이유 후 외부 기생충 구충제로 구충하는 것이 바람직하다. 외부 기생충 구충제로는 I 약제나 D 약제 등을 사용하는 것이 좋으며 이 약제들은 내부 선충류에 대하여도 구충효과가 우수하다. 육성돈에서는 현재 육성돈 사료에 구충제가 첨가되고 있으므로 이러한 구충제가 첨가된 사료를 급여하면 내부 선충류에 대한 문제는 해결될 수 있다. 구충제가 첨가되지 않은 육성돈 사료를 사용할 경우에는 이유 후 출하 2개월 전까지 2개월 간격으로 구충하는 것이 바람직하다.

## SUMMARY

A total of 2132 sera from 160 swine farms (an average of 13.3 serum samples per farm) from throughout the Republic of Korea were determined to prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in sows. By ELISA, 964 out of 2132 sera tested (45.2%) and 111 out of 160 sampled herds (69.4%) were positive against PRRSV. Fifty two percent (964 out of 1823 sera) seropositive sera identified in sows from 111 herds classified as seropositive against PRRSV. A panel of three anti-envelope (E) protein MAbs (MAbs 15, 28, and 246) and anti-nucleocapsid (N) protein MAbs (MAbs SDOW17, VO17, and EP147) was used to investigate, by an indirect fluorescent antibody test, the antigenic variation of 12 Korean PRRSV, in comparison with those of a U.S. ATCC VR2332-derived attenuated vaccine strain and the reference European Lelystad PRRSV strain. Antigenic variations among Korean isolates of PRRSV were confirmed. In an experiment with 40 specific pathogen-free pigs aged 3 days, the distribution of a Korean isolate of PRRSV was assessed immunohistochemically and by in-situ hybridization for a period of 28 days after intranasal inoculation. The most consistent and intense labelling for PRRSV was in the lung, the virus persisting in pulmonary macrophages for at least 28 day. Other tissues and cells in which the virus was detected included macrophages and dendritic cells in the tonsil, lymph nodes, spleen and Peyer's patches, and macrophages in the hepatic sinusoids and adrenal gland. The experiment suggested that the pathogenesis of PRRSV infection may be summarized thus: initial entry of virus through tonsillar and pulmonary macrophages, followed within 3 days by viraemia and subsequent interstitial pneumonia. Immunohistochemistry and in situ hybridization methods for the detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

in formalin-fixed tissues were compared. Tissues sections originating from five aborted fetuses and four stillborn piglets naturally infected with PRRSV were specimens used in the comparison. The data demonstrate that the site of PRRSV localization in the prenatal piglet differs from that of the postnatal piglet. This work also demonstrated differences in pathogenicity between two Korean PRRSV isolates. The SNUVR980606 isolate of PRRSV caused abortion and delivery of stillborn near-term fetuses whereas the SNUVR970501 isolate did not.

In this study, we examined the ELISA titer of pigs. To identify porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) antigen in feces of diseased pigs, we developed competitive ELISA method and solid phase immune electron microscopy(SPIEM) with recombinant Fab as a rapid diagnostic method. In order to develop orally administrated vaccine, we studied experimental infection of PEDV in pigs and investigated safety and ELISA titer after oral or muscular inoculation of PEDV vaccine also in pigs. Among 100 pigs, 99 pigs showed antibody to PEDV. By the methods of competitive ELISA and SPIEM, we could detect virus antigen and virus particles in virus culture suspension, crude feces, and intestinal homogenates. The morphological examination also showed the overall morphological characteristics, which fit for PEDV. with Piglets, experimentally infected with PEDV, kept for clinical and pathological studies, had been sick from PIH 18 to 110. All experimental piglets except negative control group had shown diarrhea. In immunohistochemical observation, PEDV antigen were detected in the enterocytes of jejunum. Antigen was confined to the cytoplasm, especially villus tip and could not be detected in the nuclei. When the 4-weeks old pigs muscularly administrated with vaccine, no body weight loss or clinical signs were not seen. However, antibody titer to PEDV were not so high expected. Orally administrated pigs also show no significant body weight loss or clinical signs. The pigs were attacked by PEDV, pigs including control groups showed diarrhea.

In the survey of swine parasites, total parasites infection rate was 15.8% of 8,429 pigs. The infection rates of coccidia, *Ascaris suum*, *Trichuris suis* and *Balantidium coli* were 7.2, 6.5, 1.2 and 1.1%, respectively. In the experiment of drug efficacy, allmost of all drugs were very good efficacy to *Ascaris suum* and *Trichuris suis*. And the drug I and D were very good effective to *Ascaris suum*, *Trichuris suis* and ectoparasites. In lactating piglets, *Isospora* coccidiosis is some problem to them. Drug B was very effective to swine *Isospora* coccidiosis. The body weight gain and diarrhea were improved in the lactating piglets treated with Drug B.

여 백

# CONTENTS

|   |    |
|---|----|
| Chapter 1. Introduction .....   | 19 |
| Part 1. Objectives and importance of the study .....  | 19 |
| Part 2. The scope of the study .....  | 20 |
| Chapter 2. Preventive program for PRRSV .....   | 21 |
| Part 1. Introduction .....  | 21 |
| Part 2. Materials and Methods .....   | 29 |
| 1. Antigenic reactivity of PRRSV isolates in Korea .....  | 29 |
| 2. Comparison of ELISA and IFA .....  | 31 |
| 3. Seroprevalence of antibody to PRRSV using ELISA in Korea .....   | 33 |
| 4. Detection of PRRSV in the lungs of naturally infected pigs by in situ hybridization .....  | 33 |
| 5. Distribution of a Korean strain of PRRSV in experiemtnally infected pigs as demonstrated immunohistochemically and by in situ hybridization ..                             | 40 |
| 6. Immunohistochemistry and in situ hybridization for detection and localization of PRRSV from naturally aborted fetuses .....  | 43 |
| 7. Comparison of the antigen distribution of two Korean strains of PRRSV in fetuses from experimentally infected sows by immunohistochemistry and in situ hybridization ..... | 45 |
| Part 3. Results and Discussion .....  | 48 |
| 1. Antigenic reactivity of PRRSV isolates in Korea .....  | 48 |
| 2. Comparison of ELISA and IFA .....  | 50 |
| 3. Seroprevalence of antibody to PRRSV using ELISA in Korea .....   | 51 |
| 4. Detection of PRRSV in the lungs of naturally infected pigs by in situ hybridization .....  | 53 |
| 5. Distribution of a Korean strain of PRRSV in experiemtnally infected pigs as demonstrated immunohistochemically and by in situ hybridization .....                          | 59 |

|   |     |
|---|-----|
| 6. Immunohistochemistry and in situ hybridization for detection and localization of PRRSV from naturally aborted fetuses .....  | 68  |
| 7. Comparison of the antigen distribution of two Korean strains of PRRSV in fetuses from experimentally infected sows by immunohistochemistry and in situ hybridization ..... | 73  |
| Chapter 3. Preventive program for porcine coronavirus .....   | 79  |
| Part 1. Introduction .....  | 79  |
| Part 2. Materials and Methods .....   | 83  |
| 1. Seroprevalence of antibody to PEDV using ELISA and detection of PEDV ..  | 83  |
| 2. Detection of PEDV antigen by IFA .....   | 89  |
| 3. Distribution of a Korean strain of PEDV in experiemtnally infected pigs as demonstrated immunohistochemically .....  | 91  |
| 4. RT-PCR for PEDV .....  | 93  |
| 5. Safety and efficacy study for oral-administered PEDV vaccine ....  | 96  |
| Part 3. Results and Discussion .....  | 99  |
| 1. Seroprevalence of antibody to PEDV using ELISA and detection of PEDV ..  | 99  |
| 2. Detection of PEDV antigen by IFA .....   | 103 |
| 3. Distribution of a Korean strain of PEDV in experiemtnally infected pigs as demonstrated immunohistochemically .....  | 104 |
| 4. RT-PCR for PEDV .....  | 118 |
| 5. Safety and efficacy study for oral-administered PEDV vaccine ....  | 118 |
| Chapter 4. Preventive program of porcine parasitic disease .....  | 121 |
| Part 1. Introduction .....  | 121 |
| 1. Porcine parasitic diseases .....   | 121 |
| 2. The scope of the study .....   | 125 |

|   |         |
|---|---------|
| Part 2. Materials and Methods .....                           | 127     |
| 1. Prevalence of porcine parasitic diseases .....             | 127     |
| 2. Antiparastic effects of porcine parasitic diseases .....   | 128     |
| Part 3. Results and Discussion .....                          | 129     |
| 1. Prevalence of porcine parasitic diseases .....             | 129     |
| 2. Antiparastic effects of porcine parasitic diseases .....   | 136     |
| <br>Chapter 5. Application of the results .....               | <br>150 |
| <br>Chapter 6. Reference .....                                | <br>156 |
| Part 1. Preventive program for PRRSV .....                    | 156     |
| Part 2. Preventive program for porcine coronavirus .....      | 162     |
| Part 3. Preventive program of porcine parasitic disease ..... | 171     |

여 백

# 목 차

|  |    |
|--|----|
| 제 1 장 서론 .....   | 19 |
| 제 1 절 연구 개발의 목적과 중요성 .....   | 19 |
| 제 2 절 연구내용과 범위 .....   | 20 |
| 제 2 장 돼지의 돼지 생식기 호흡기 증후군 방제 프로그램 .....   | 21 |
| 제 1 절 서론 .....   | 21 |
| 제 2 절 재료 및 방법 .....  | 29 |
| 1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성 .....  | 29 |
| 2. 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 ELISA와 간접형광항체검사의 비교 ..   | 31 |
| 3. ELISA를 이용한 국내 모돈에서의 돼지 생식기 호흡기 바이러스 감염률 조사 ..   | 33 |
| 4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기<br>바이러스의 조직내 분포양상 .....                                | 33 |
| 5. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 면역조직화<br>학법 및 조직내 교잡법을 이용한 경시적인 바이러스의 분포양상에 관한 연구<br>..... | 40 |
| 6. 자연감염된 유산된 태자에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 분포 ..   | 43 |
| 7. 국내 분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 임신말기 모돈에서의 병원<br>성 실험 .....  | 45 |
| 제 3 절 결과와 고찰 .....   | 48 |
| 1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성. ....  | 48 |
| 2. 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 ELISA 와 간접형광항체검사의 비교 ..  | 50 |
| 3. ELISA를 이용한 국내 모돈에서의 돼지 생식기 호흡기 바이러스 감염률 조사 ..   | 51 |
| 4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기<br>바이러스의 조직내 분포양상 .....                                | 53 |

|   |     |
|---|-----|
| 5. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 면역조직화학법 및 조직내 교잡법을 이용한 경시적인 바이러스의 분포양상에 관한 연구 ..... | 59  |
| 6. 자연감염된 유산된 태자에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 분포 ..  | 68  |
| 7. 국내 분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 임신말기 모돈에서의 병원성 실험 .....                                     | 73  |
| <br>  |     |
| 제 3 장 돼지 코로나바이러스 감염에 대한 방제프로그램 .....  | 79  |
| 제 1 절 서론 .....  | 79  |
| 제 2 절 재료 및 방법 .....   | 83  |
| 1. 하리자돈의 돼지설사병 바이러스의 항체가 조사 및 항원의 검출 .....  | 83  |
| 2. 간접형광현미경에 의한 돼지유행성 돼지설사병의 진단법 .....   | 89  |
| 3. 자돈에 대한 새로운 PEDV 분리주의 감염실험 .....  | 91  |
| 4. PEDV의 RT-PCR 진단법의 확립 .....   | 93  |
| 5. 경구투여용 백신의 안전성 및 유효성 검정 .....   | 96  |
| 제 3 절 결과와 고찰 .....  | 99  |
| 1. 하리자돈의 돼지설사병 바이러스의 항체가 조사 및 항원의 검출 .....  | 99  |
| 2. 간접형광현미경에 의한 돼지유행성 돼지설사병의 진단법 .....   | 103 |
| 3. 자돈에 대한 새로운 PEDV 분리주의 감염실험 .....  | 104 |
| 4. PEDV의 RT-PCR 진단법의 확립 .....   | 118 |
| 5. 경구투여용 백신의 안전성 및 유효성 검정 .....   | 118 |
| <br>  |     |
| 제 4 장 돼지의 생산성 향상을 위한 내외부 기생충성 질병의 방제프로그램 .....  | 121 |
| 제 1 절 서론 .....  | 121 |
| 1. 돼지의 기생충성 질병 .....  | 121 |
| 2. 돼지의 기생충성 질병의 방제를 위한 연구 목적 .....  | 125 |

|   |     |
|---|-----|
| 제 2 절 재료 및 방법 .....                         | 127 |
| 1. 돼지 기생충의 분포조사 .....                       | 127 |
| 2. 돼지 기생충의 구충효능시험 .....                     | 128 |
| 제 3 절 결과와 고찰 .....                          | 129 |
| 1. 국내 사육 돼지의 기생충 분포조사 .....                 | 129 |
| 2. 돼지 기생충 구충제 치료 실험 .....                   | 136 |
| <br>  |     |
| 제 5 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 .....             | 150 |
| <br>  |     |
| 제 6 장 인용문헌 .....                            | 156 |
| 제 1 절 돼지의 돼지 생식기 호흡기 증후군 방제 프로그램 .....      | 156 |
| 제 2 절 돼지 코로나바이러스 감염에 대한 방제프로그램 .....        | 162 |
| 제 3 절 돼지의 생산성 향상을 위한 내외부 기생충성 질병의 방제프로그램 .. | 171 |

여 백

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 중요성

이 연구의 수행 목적은 돼지에서 생산성을 저하시키는 돼지 생식기 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome), 돼지 유행성 설사병(porcine epidemic diarrhea) 및 기생충성 질병을 연구하여 돼지의 생산성 향상시키기 위함이다. 현재 우리나라는 질병의 진단 및 예방에 관한 연구가 절실히 필요하다. 매년 질병으로 인한 양돈 산업의 손해는 약 4,000억원에 달하고 있다. 양돈 산업이 발전 할수록 많은 양돈가들은 질병에 관심을 가지게 된다. 현재 양돈가들에게서 가장 문제가 되는 질병들이 돼지 생식기 호흡기 증후군, 돼지 유행성 설사 및 돼지 기생충 질병의 예방과 박멸이다. 이러한 질병에 의한 피해는 양돈 돈가의 생산비를 증가시키는 원인으로 작용하고 있을 뿐만아니라, 일반 소비자들에게도 적지 않은 부담이 되고 있으며 수출전선에도 가격 경쟁적인 측면에서 부정적으로 작용하고 있다. 이러한 이유등으로 인하여 돼지 축산 시장에 많은 피해를 야기시키는 이러한 질병을 방역함으로써 양돈산업을 발전시키는 중요한 역할을 할 수 있다. 이 연구의 수행결과로서, 돼지 생식기 호흡기 증후군의 항원 변이성(antigenic variation), 국내 감염률, 병원성 (pathogenicity), 진단법 개발 등을 통하여 질병을 예방하고 진단할 수 있는 유익한 연구 결과를 도출할 필요성이 제기된다. 또한 가장 높은 자돈 폐사의 원인체인 돼지 유행성 설사병의 특성, 병인론 및 백신효능 실험을 통하여 자돈 폐사를 감소시켜 생산성 향상에 기여 할 수 있고 돼지 생산성의 10% 저하를 유발하는 기생충성 질병을 효율적으로 방제 프로그램을 설정하여 과학적인 생산성 향상의 필요성도 제기되고 있다. 즉, 이 연구의 수행으로 돼지 생산성 향상시켜서 WTO 체제하에서 축산물 생산자들에게 희망을 줄 수 있을 뿐만 아니라 소비자들에게는 좀 더 양질의 축산물을 공급할 수 있게 된다.

## 제 2 절 연구내용과 범위

본 연구의 효과적인 수행을 위하여, 1차년도에는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 국내 감염률, 조직내 교잡법을 이용한 개발, 바이러스의 분리 등을 실시하고, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 면역 전자 현미경을 이용한 진단법과 역전사 중합효소 연쇄반응법 개발, 바이러스의 분리 등을 실시하고, 돼지 기생충성 질병의 국내 감염률을 연구한다. 2차년도에는 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 포유자돈에서의 호흡기 질환의 병원성 및 병인론을 연구하고, 돼지 유행성 설사병 바이러스에 대한 포유자돈에서의 소화기 질환의 병원성 및 병인론을 연구하고, 돼지 기생충성 질병의 국내 감염률과 포유자돈 및 비육돈에서의 구충 효능 실험을 실시한다. 3차년도에는 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 임신모돈에서의 생식기 질환에 대한 연구를 실시하고, 돼지 유행성 설사병에 대한 백신의 효능과 안정성에 대한 연구를 실시하고, 돼지 기생충성 질병에 대한 모돈에서의 구충 효능 실험을 실시하였다.

## 제 2 장 돼지의 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 방제 프로그램

### 제 1 절 서론

1987년 미국의 중서부에서는 임신말기 모돈의 유산과 포유자돈 호흡기 질병을 유발하는 돼지에서의 새로운 질병이 처음으로 보고되었다. 그 후 1990년 영국, 독일, 네덜란드등 유럽전역에서도 이러한 증상을 일으키는 질병이 보고되었다 (Wensvoort 등, 1991). 이 질병이 보고된 초기에는 이러한 증상을 일으키는 원인체가 밝혀지지 않아 1991년 이 질병에 대한 원인체가 분리될 때까지 이 질병은 mystery swine disease, swine infertility and respiratory syndrome (SIRS), porcine endemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), blue eared pig disease, Seuchenhafter spatabort der schweine등의 여러 가지 병명으로 불려지다가 (Goyal, 1993), 여러 가지 질병명으로 인한 혼란을 피하기 위해 1992년 미국 미네소타주의 미네아폴리스에서 열린 국제 심포지엄에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS)으로 공식 명명되었다. 1991년 네덜란드의 중앙 수의과학연구소에서는 돼지 폐포대식구를 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군을 유발하는 원인체를 최초로 분리하여 본 연구소가 위치한 네덜란드의 "Lelystad"의 지명을 붙여 Lelystad virus로 명명하였다 (Wensvoort 등, 1991). 그 후 미국에서도 생식기 호흡기 질병을 발현하는 돈군에서 병인체를 분리하여 SIRS virus로 명명하고 ATCC VR2332로 등록하였다. 그 후 이러한 원인체를 통합하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)로 명명하게 되었다 (Collins 등, 1992; Benfield 등, 1992). 국내에서도 1993년에 돼지에서 생식기 호흡기 증후군이 보고되었고 원인체도 분리되었다 (Kweon 등, 1994).

돼지 생식기 호흡기 증후군의 원인 바이러스인 PRRSV는 order

Nidovirales, family Arteriviridae, genus Arterivirus에 속하는 바이러스이다. 새로운 order인 Nidovirales는 nest를 의미하는 라틴계의 단어로 바이러스가 세포에 감염시에 3'말단에 공통적인 terminal을 가지는 nested set의 subgenomic mRNA를 갖는 데서 유래되었다 (Cavanagh등, 1997, Meulenberg등, 1993). Order Nidovirales에는 PRRSV가 속한 family Arteriviridae외에 family Coronaviridae가 속하는데 이들은 그 유전자의 구성이나 감염시에 mRNA의 발현양식이 유사하여 같은 조상으로부터 유래했을 것으로 생각된다. PRRSV가 속한 genus Arterivirus에는 equine arteritis virus (EAV), lactate dehydrogenase elevating virus (LDV), semian hemorrhagic fever virus (SHFV)등이 속하는데 이들은 PRRSV와 바이러스의 크기와 모양, 유전자의 크기와 구조단백의 성질 그리고 대식구에 대한 친화성등 매우 유사한 성질을 가지고 있다. 그러나 서로 교차반응은 일어나지 않는다 (Meulenberg등, 1993, Plagemann등, 1996).

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 약 15kb의 polyadenylation된 RNA를 가지고 있으며 8개의 ORF로 구성되어있다 (Meulenberg등, 1993, Mardassi등, 1994). 이 중 ORF 1a, 1b는 바이러스의 RNA dependent RNA polymerase를 전사하는 nonstructural gene으로 전체 유전자의 약 80%를 차지하며 1a와 1b는 모든 family Arteriviridae와 마찬가지로 pseudoknot의 구조로 overlapping되어 있다 (Conzelmann등, 1993). ORF2-7은 약 4kb정도의 크기로 바이러스의 구조단백을 전사하는 structural gene이며 바이러스가 폐포대식구에 감염되어 유전자를 발현할 때 6개-7개의 subgenomic mRNA를 합성해 낸다. 이들 subgenomic mRNA들은 3' 말단을 서로 공유하며 5'말단쪽에 nucleotide motif인 UCAACC인 서로 매우 유사한 염기서열을 leading sequence로 가지고 있다. 이 중 ORF7은 unglycosylated nucleocapsid protein (N)을 ORF6은 unglycosylated viral membrane protein (M)을 그리고 ORF5는 glycosylated envelope protein (E)을 각각 전사한다. ORF2-4는 glycosylated protein (GP2-GP4)을 전사하는 유전자이지만 아직 이들 단백질에 대한 정확한 기능은 밝혀져 있지 않다 (Meulenberg등, 1995, Nelson등, 1993). 이 중 N protein은 주로 면역반응이 유도되는 부분으로 이 부분에 대한 항체인 SDOW17은 PRRS의 진단에 가장 널리 쓰이고 있는 단클론 항체이다.

특히 이중 M과 E protein은 바이러스 표면에 노출되어 숙주와 바이러스사이의 면역반응에서 중요한 역할을 하는 구조로 여겨진다. 또한 ORF5에 의해서 만들어지는 단백질은 바이러스에 감염된 세포에서 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있으며 또한 ORF5 부분 및 ORF6-7부분은 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 의한 분석방법에 의해 변이주 및 백신주와의 구분에 이용할 수 있는 부분으로 보고되어 있다 (Wesley등, 1998, Gagnon등, 1998). 그리고 E protein과 ORF4에 의해서 만들어지는 단백질은 바이러스에 대한 중화항체의 형성을 유도한다. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 유전자적으로 크게 미국형 바이러스 (PRRSV VR2332-like strain)과 유럽형 바이러스 (LV-like strain)로 나뉘어 지는데 이들은 서로 약 60-70%의 유전자적 동일성을 가지지만 같은 바이러스형간에는 95%이상의 높은 동일성을 보인다 (Meulenbergt등, 1995).

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 single positive strand의 RNA바이러스로 지질막으로 둘러싸여 있으며 약 45-80nm정도의 크기로 그 내부에 25-30nm의 nucleocapsid core를 가지고 있다. 바이러스는 유기용매의 처리시에 쉽게 불활화되며 detergent인 sodium deoxyl cholate나 Triton X-100, NP-40등의 처리에도 쉽게 불활화된다. 또한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 어떤 동물의 적혈구와도 응집반응을 일으키지 않으며 비중은 1.18g/ml in CsCl, 1.23g/ml in sucrose 이다. 바이러스는 4℃에서는 비교적 안정하여 한달정도 감염력을 유지하며 -70℃에서는 수년간 안정하지만 36℃에서는 48시간안에 그리고 56℃에서는 45분안에 감염력을 완전히 잃는다. 또한 바이러스는 pH 5.0이하나 7.0이상에서는 90%이상 감염력이 감소한다 (Benfield등, 1992).

연구초기에 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 폐포대식구에 대해 높은 친화성을 나타내므로 초기에는 돼지의 폐포대식구를 이용하여 바이러스를 분리하였지만 그 후에 같은 대식구계통의 세포인 단핵구나 glial cell, 또는 비장의 대식구에 대해서도 바이러스의 친화성이 상당히 높으며 MA104세포주의 subpopulation인 CL2621, Marc145등에도 높은 친화성을 나타내서 이들 세포주를 이용하여 바이러스를 분리할 수 있게 되었다 (Kim등, 1993). Marc145를 이용하여

바이러스를 분리하게 된 후 전 세계적으로 많은 수의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 분리되었으며 이를 이용한 다양한 연구가 진행중이다.

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 감염된 돈군에서 발현되는 임상증상은 질병의 명칭에서도 알 수 있듯이 크게 생식기, 또는 호흡기와 관련된 임상증상을 관찰할 수 있다 (Collins 등, 1992; Yoon 등, 1992). 임신한 모돈이 감염되면 사산이나 자가용해된 태아의 분만을 특징으로 하는 임신말기의 유산 및 폐사율이 높은 허약자돈의 분만, 조산, 수태율의 현격한 감소 등의 증상을 나타내며 (Wensvoort 등, 1991; Collins 등, 1992), 웅돈이 감염된 경우에는 정액중 정자의 운동성의 감소를 관찰할 수 있다(Prieto 등, 1996). 포유자돈이나 육성돈에서는 호흡기 증상을 유발하며, 특히 4-10주령사이의 어린 자돈에서 특히 심한 호흡기 증상을 나타내는데 호흡기나 전신적으로 나타나는 증상으로는 바이러스 감염시에는 식욕부진, 그리고 이차적인 세균감염과 관련하여 발열을 나타내며 혈관염에 의한 혈관손상으로 인한 안구주위, 음낭 그리고 후지부위의 부종 (Rossow 등, 1994a) 및 귀끝부위나 사지말단에서의 청색증을 관찰할 수 있고 감염된 자돈은 복식호흡을 특징으로 하는 심한 호흡곤란 증세를 보이고, 10주 이상의 돈군에서는 특별한 증상없이 가벼운 감기정도의 증상을 나타낸다. 돼지 생식기 호흡기 증후군은 포유자돈과 육성돈에서 급성감염시도 문제가 되지만 지속감염을 일으켜 (Yoon 등, 1993) 감염돈군에서 장기간 문제를 유발할 수 있으며 바이러스에 감염되면 표적세포인 폐포대식구의 파괴로 인해 면역기능이 저하되므로 흉막폐렴이나 파스튜렐라성 폐렴, 글래서씨병, 연쇄상 구균증 등의 이차적인 세균감염과 오제스키병, 돼지 파보바이러스 감염, 돼지 인플루엔자 등의 바이러스에 의한 중복감염 (Reeth 등, 1996)을 용이하게 하는 문제를 유발하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 감염된 자돈에서의 폐사율을 높이는 역할을 한다 (Zeman 등, 1993; Molitor 등, 1993).

감수성 있는 자돈에 감염된 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 국소 임파절에서 일차 증식한 후 수시간안에 혈관내로 침입하여 viremia를 일으키고 그 후 표적기관인 폐장의 폐포대식구에서 증식하는 것으로 알려져 있으며, 감염된 돼지는 비루나 침을 통해서 바이러스를 분비하고 viremia가 지속되는 동안에는

혈액중에 바이러스가 존재하며 감염된 용돈의 경우 viremia와 관련되어 정액을 통해서도 바이러스를 분비한다 (Yeager 등, 1993; Dee 등, 1994; Christopher-Hennings 등, 1995; Prieto 등, 1996). 또한 오줌이나 변을 통해서도 바이러스는 분비된다(Yoon 등, 1993). 바이러스에 감염되지 않은 감수성 있는 돼지가 바이러스를 분비하는 감염돈과 접촉하거나 (Zimmerman 등, 1993) 감염돈군의 비감염돈군으로의 이동, 감염농장에서의 차량이나 기구를 통한 전파도 가능하고, 바이러스가 포함된 정액을 이용한 인공수정시에도 감염이 이루어 질 수 있으며 (Yeager 등, 1993; Dee 등, 1994; Christopher-Hennings 등, 1995; Prieto 등, 1996), 모든 감염된 경우 임신말기에 태반을 통해서도 감염이 이루어진다. 그리고 공기를 통한 전파도 가능한데 이는 돈군 내에서의 바이러스의 전파는 비감염돈과 감염돈의 접촉전파가 주된 역할을 하지만 (Christianson 등, 1992) 돈군과 돈군사이의 전파는 그 전파속도로 볼 때 아마도 공기에 의한 전파가 바이러스의 전파에 상당히 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있다 (Zimmerman 등, 1993; Dee 등, 1994).

병리조직학적 관찰을 통한 돼지 생식기 호흡기 증후군의 진단은 호흡기 증상이 있는 자돈에서 관찰되는 폐포벽의 비후, type II 폐포세포의 증생, 그리고 기관지 내강내에 탈락피사된 세포와 폐포대식구의 축적을 특징으로 하는 간질성 폐렴을 통해서 (Halbur 등, 1995a; Halbur 등, 1995b; Rossow 등, 1995; Halbur 등, 1996) 그리고 단크론 항체나 다크론 항체를 이용한 면역조직화학적 기법을 통해 폐장 및 기타 다른장기의 대식구와 심장의 내피세포에서 바이러스의 구조단백에 대한 검출이 가능하다 (Halbur 등, 1995b; Halbur 등, 1996).

최근에는 감염된 조직뿐만 아니라 바이러스가 포함된 분비물이나 정액, 혈액에서도 핵산 증합 효소반응을 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 RNA를 검출해 낼 수 있다 (Suarez 등, 1994; Mardassi 등, 1994; Christopher-Hennings, 1995). 그리고 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 특이적으로 반응하는 probe를 제작하여 조직내 교잡법을 수행함으로써 조직내에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 RNA를 검출할 수 있다 (Larochelle 등, 1996; Sur 등, 1996). 조직내 교잡법은 핵산 증합 효소반응과는 달리 조직에서의 RNA추출과정이 필요하지 않으며 조직내에서 실행하므로 바이러스가 증식하는

위치를 알아 낼 수 있는 장점이 있으며 (Larochelle 등, 1996), 만성감염시처럼 바이러스가 발현하는 단백질의 양이, 아주 적은 경우에도 바이러스의 RNA를 검출할 수 있으므로 면역조직화학기법에 비해서도 민감도가 높아 돼지 생식기 호흡기 증후군과 같이 만성, 지속감염이 있는 바이러스성 질병의 진단에 매우 유용하다 (Sur 등, 1996).

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 주로 감염된 돈군으로부터 임신한 모돈에 호흡기를 통해 감염되며 바이러스에 감염된 모돈은 가벼운 발열이나 재채기등의 가벼운 임상증상을 나타내거나 무증상으로 혈청내의 항체가만 양성으로 변하기도 한다. 일반적인 호흡기를 통한 바이러스의 감염외에도 바이러스에 감염된 웅돈이 체액 특히 정액을 통하여 바이러스를 분비하므로 바이러스에 감염된 웅돈과 자연교미를 가지거나 바이러스에 감염되어 바이러스를 배설하는 웅돈으로부터 채취한 정액으로 인공수정을 거친 모돈은 바이러스에 감염되게 되어 그 돈군이 바이러스에 노출되게 된다. 바이러스에 노출되어 감염된 모돈은 다양한 정도의 번식장애를 유발하는데 번식장애의 경우 처음발병으로부터 약 10-12주에서부터 4-6개월간 지속되며 유산은 빠르면 종부후 22일에서 109일까지 일어날 수 있다. 바이러스에 감염된 모돈에서 태어난 태자는 사산 및 미라화, 허약자돈 및 정상자돈등 다양한 구성을 보인다 (Hooper 등, 1992, Mengeling 등, 1994). 그밖에 바이러스에 감염된 모돈에서 불임 및 재발정이 지속적으로 발생하기도 한다. 일반적으로 실험감염이나 자연발생례에서 바이러스에 의한 유산은 주로 임신말기에 감염되어 임상증상을 유발하였으나 최근에는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 변이주로 생각되는 바이러스에 의해서 돈군에서의 백신여부나 감염된 모돈의 임신일령에 관계없이 높은 유산율을 나타내는 신종 돼지 바이러스성 유산 증후군이 보고되어 있다.

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 감염된 모체에서 태아로의 정확한 감염경로 감염된 모돈의 폐장에서 일차증식한 후 바이러스혈증을 통하여 임신말기나 혹은 바이러스가 태반을 통과할 수 있는 시기에 태반을 통해서 바이러스가 태아에 감염되어 전형적으로 임신말기에 유산이나 사산을 하거나 허약자돈의 분만이나 조기분만을 일으킨다. 바이러스에 감염된 모돈의 태반을 통하여 감염된

태아조직에서는 바이러스의 증식은 일어나고 이로인해 유산 및 사산을 일으키지만 유산이나 사산된 태아의 조직에서는 바이러스가 쉽게 불활화되어 바이러스를 검출하기 어렵고 다만 허약자돈이나 정상적으로 분만된 돼지는 바이러스에 감염되어 태어난다.

실험감염을 통하여 보면 바이러스가 태반을 통과하여 태아에 감염되는 시기는 주로 임신말기이며, 이는 태반의 투과성이 임신말기 이전과 이후에 변화함으로써 바이러스의 태반통과가 임신중기 후반에가서야 가능하기 때문으로 알려져 있다 (Christianson등, 1993). 그러나 일부 실험에 의하면 임신초기나 중기에서도 드문 경우이기는 하지만 태반을 통한 바이러스의 감염이 가능하다. 또한 임신초기에 바이러스가 태반을 통과하여 태아에 감염되는 경우에도 수정란이 착상하는 데는 영향을 주지 못하며 태아를 죽일 정도의 능력도 안되는 것으로 알려져 있다 (Lager등, 1996). 바이러스를 직접 태아에 노출시키는 경우에도 바이러스는 임신 모든일령의 태아에서 증식이 가능하지만, 임신중기이후의 태아에서만 주로 유산이나 사산등의 이상을 일으킨다 (Mengeling등, 1994, Christianson등, 1993).

돼지 생식기 호흡기 증후군의 감염을 진단하기 위한 혈청학적 진단방법에는 간접형광항체법, immunoperoxidase monolayer assay (IPMA), ELISA, 바이러스 혈청중화법등의 방법이 사용되고 있으며 (Albina등, 1992, Morrison등, 1992, Yoon등, 1992, Benfield등, 1992, Wensvoort등, 1991), 이중 간접형광항체법과 IPMA방법은 돼지 생식기 호흡기 증후군이 발생할 초기부터 널리 사용되는 방법으로 간접형광항체법의 경우 미국 및 캐나다 등지에서 주로 사용하는 방법이며 IPMA방법의 경우는 주로 유럽에서 공식적으로 사용되고 있는 방법이다. 간접형광항체법은 질병발생 초기부터 현재까지 가장 널리 사용되고 있는 혈청학적 진단방법으로 다른 검사방법에 비해 검사의 특이성이 높고 검사비용이 적게 든다는 장점이 있지만 검사방법이 번거로워서 한번에 많은 혈청을 검사하기 어려우며 형광현미경을 사용하여 검사자가 주관적인 판단으로 양성과 음성여부를 판단해야 하므로 검사자에 따라 판단이 달라질 수 있다는 단점이 있다. 반면에 ELISA방법의 경우에는 현재 상업화된 키트가 있으므로 다른 방법에 비하여 민감도가 높으며 사용이 편리하고 검사시 특별한 기술이 필요하지 않으므로 한번에 많은 혈청을

검사할 수 있으며 그러면서도 검사의 오차가 적은 장점이 있다. 그러나 ELISA를 검사하기 위해서는 ELISA를 위해 특별히 필요한 세척기나 고가의 ELISA reader가 필요하여 처음 시설에 고가의 실험비가 들어가는 것과 현재의 실정으로 상업화된 kit를 사용하므로 다른 방법들에 비해 실험단가가 매우 비싸다는 단점이 있다. 그러나 이러한 두가지 방법의 단점에도 불구하고 두가지 방법은 돼지 생식기 호흡기 증후군외에도 바이러스성 질환을 혈청학적으로 진단하는 데 가장 널리 쓰이고 있는 방법이다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성.

#### 가. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 분리

국내에서 문제가 되고 있는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 분리하기 위해 호흡기 증상이 심하거나 위축의 증상으로 서울대학교 수의과대학에 부검 의뢰된 포유자돈 및 이유자돈의 폐장조직과 임신말기 유산을 보이는 돈군의 모돈 혈청 및 유사태아 또는 동복의 허약자돈 혈청과 폐장조직에서 바이러스분리를 시도하였다. 먼저 부검시 적출한 약 2g 정도의 폐장 및 기타조직을 멸균된 포셉과 가위를 이용하여 세절한 후 이를 20ml의 DMEM에 넣고 Stomacher를 이용하여 2분간 균질화(homogenization)하였다.

균질화후 원심분리한 상층액을 0.8 $\mu$ m pore size의 syringe filter로 여과한 후 0.2 $\mu$ m pore size의 syringe filter로 멸균한 후 25cm<sup>2</sup> tissue culture flask에 monolayer를 형성하고 있는 Marc 145 세포주나 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대해 항원 및 항체 음성인 이유자돈의 폐장으로부터 추출한 폐포탐식세포에 접종하여 2일간격으로 세포변성효과 (CPE)를 관찰하였으며, 관찰도중 세포변성효과가 관찰된 샘플은 freezing and thawing을 3회 반복한 후 3000rpm에서 10분간 원심한 상층액을 75cm<sup>2</sup> tissue culture flask에 준비한 세포에 다시 접종하여 바이러스를 증식배양 (propagation)하였다. 증식배양된 바이러스는 약 5ml씩 분주하여 사용할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

1차 접종후 1주일간 세포변성효과를 보이지 않는 샘플은 freezing and thawing을 3회 반복한 후 3000rpm에서 10분간 원심한 상층액을 다시 접종하여 1주일간 관찰하였다. 2차 접종후 1주일 안에 세포변성효과를 보이는 샘플은 위에서의와 동일한 방법으로 증식배양하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였으며, 2차 접종시에도 세포변성효과를 나타내지 않는 샘플은 다시 3차 접종한 후 일주일간 관찰하고 세포변성효과를 보이지 않으면 감염성의 바이러스를 포함하고 있지 않은 것으로

간주하고 배양액을 -70℃에 보관하였다.

분리된 바이러스는 단계별로 10진 희석하여 96 well의 culture plate에 접종한 후 각각의 well에서 세포변성효과를 관찰하는 방법으로 바이러스의 역가를 측정하여 바이러스의 특성분석을 위하여 사용하였다.

#### 나. 단클론 항체를 이용한 항원 변이성 연구

실험에 사용한 단클론 항체는 바이러스의 N protein에 특이적으로 반응하는 것으로 알려진 SDOW17, EP147, VO17의 세가지 단클론 항체와 E protein에 특이적으로 반응하는 것으로 알고있는 Mab15, 28, 246을 사용하였다.

단클론 항체와 반응시키기위한 항원 plate를 제작하기 위해서 Marc 145세포주에 적용시킨 각각의 분리주를  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50/50 $\mu$ l</sub>로 희석한 후 48 well culture plate에 monolayer를 형성하고 있는 Marc 145세포주에 각 well당 50 $\mu$ l의 바이러스를 접종하였으며 각 well에 대한 음성 대조군으로는 바이러스대신 DMEM배지를 50 $\mu$ l씩 접종하였다. 바이러스를 접종한 후 24시간후에 각 well에서 상층액을 제거한 후에 0.01M PBS를 각 well당 500 $\mu$ l씩 넣어 3회 세척한 후 cold absolute ethanol을 각 well당 200 $\mu$ l씩 넣은 후 4℃에서 10분간 고정하였다. 고정 후 항원 plate는 clean bench에서 10분간 완전히 건조시킨 후에 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다.

각각의 분리주와 단클론항체의 반응성을 알아보기 위해 각각의 바이러스가 접종된 well과 대조군 well에 각각의 단클론 항체를 0.1% Tween 20이 첨가된 0.01M PBS(PBTS)에 300배 희석한 항체희석액을 100 $\mu$ l씩 넣고 37℃ humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 이것을 일차 증류수로 10회 세척하고 그 후 FITC가 표지된 anti mouse Immunoglobulin을 PBTS로 100배 희석하여 희석액 100 $\mu$ l를 각 well에 넣은 후 37℃ humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 이것을 일차 증류수로 10회 세척하고 clean bench에서 10분간 건조시킨 후 형광현미경을 사용하여 세포질내에 한정되어 관찰되는 형광반응을 관찰하였다.

## 2. 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 ELISA 와 간접형광항체검사의 비교

### 가. 가검혈청

검사에 사용한 혈청은 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 혈청검사의뢰된 가검혈액 100건으로 검사의뢰된 혈액은 혈액응고과정을 거친 후에 3000rpm에서 30분간 원심하여 그 상층액을 취하고 혈청을 사용시까지 -20℃ 냉동고에 보관하였다. 검사시 보관된 혈청을 해동하여 사용하였다.

### 나. ELISA 검사방법

가검혈청은 검사시 키트내에 들어있는 혈청희석액으로 1:40으로 희석한 각각의 혈청을 바이러스가 coating되어 있는 well과 이에 대한 음성대조군의 well에 100 $\mu$ l씩 각각 넣었으며 kit내에 들어있는 양성대조혈청과 음성대조혈청을 각각 3개와 2개의 well에 넣은 후 25℃에서 30분간 반응시키고 Tween 20이 포함되어 있는 PBS로 5회 세척한 후 horse raddish peroxidase (HRP)가 표지되어 있는 2차항체 (anti swine IgG) 100 $\mu$ l를 모든 well에 넣고 25℃에서 30분간 반응시킨 후 다시 5회 세척한 후 세척액을 제거한 후 HRP의 수용성 기질인 tetramethylbenzidine (TMB)를 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣은 후 상온에서 15분간 반응하여 발색시켰다. 발색이 다 끝나면 hydrofluoric acid로 반응을 중지시킨 후 ELISA reader를 이용하여 630 nm의 파장에서 흡광도를 읽고 각각의 혈청에 대한 흡광도를 양성대조혈청과의 흡광도의 비율을 계산하여 가검혈청에 대한 양성여부를 결정하였다.

계산하는 방식은 다음과 같으며 가검혈청과 양성대조혈청의 흡광도간의 비율(S/P)이 0.4이상이면 양성혈청으로 판정하였다.

$$S/P = \frac{\text{바이러스 well에서의 흡광도} - \text{음성대조well에서의 흡광도(가검혈청)}}{\text{바이러스 well에서의 흡광도} - \text{음성대조well에서의 흡광도(양성대조혈청의 평균)}}$$

#### 다. 간접형광항체검사

간접형광항체검사를 위해서 먼저 검사를 위한 항원 plate를 제작하기 위해서 바이러스는 국내분리주인 SNU970501 PRRSV를 사용하였다. 바이러스를 Marc 145 세포주에 적용시킨 후  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50/50 $\mu$ l</sub>로 희석한 후 이것을 96well culture plate에 monolayer를 이룬 Marc145 세포주에 한 well에는 바이러스를 50 $\mu$ l를 그리고 다른 well에는 DMEM배지를 50 $\mu$ l씩 넣어 배양하였다. 바이러스 접종후 24시간 후에 각각의 well에서 배양액을 제거하고 0.01M PBS 200 $\mu$ l씩을 넣어 3회 세척하였다. 세척후 각 well에 100 $\mu$ l의 차가운 absolute ethanol을 넣어 10분간 고정하였다. 고정후 ethanol을 제거하고 항원 plate를 clean bench안에서 10분간 건조하여 완전히 말린 후 검사시까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

혈청검사시에는 가검혈청을 0.1% tween 20이 포함되어 있는 PBS로 1:20과 1:100으로 희석한 후 각각의 희석액을 바이러스를 접종한 well과 배지를 접종한 음성대조 well에 각각 100 $\mu$ l씩 넣은 후 37 $^{\circ}$ C humified chamber에서 1시간동안 반응시킨 후 혈청을 제거하고 일차증류수로 10회이상 세척한 후 모든 well에 FITC가 표지된 2차항체 (anti-swine IgG)를 100 $\mu$ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C humified chamber에서 1시간동안 반응시킨 후 이차항체를 제거하고 일차증류수로 10회이상 세척한 후 cleann bench에서 5분간 말리고 형광현미경으로 관찰한다. 형광현미경으로 관찰했을 때 바이러스를 감염시킨 well의 세포의 세포질에서 형광반응이 확인되면 양성으로 판정한다.

가검혈청에 대해 1:20과 1:100에서 모두 양성반응이면 양성으로 판정하고 1:20에서 음성인 경우는 음성으로 판정하며 1:20에서는 양성이고 1:100에서 음성인 경우는 검사를 다시 실시하여 검사결과를 판정한다.

### 3. ELISA를 이용한 국내 모돈에서의 돼지 생식기 호흡군 바이러스 감염률 조사

#### 가. 가검혈청

1995년에서 1996년 사이에 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 160개 돈군의 2132개의 혈청을 commercial ELISA kit (Herdchek<sup>®</sup>; IDEXX)를 이용하여 혈청중의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 특이적으로 반응하는 항체를 검출하였다. 검사 의뢰된 혈액은 혈액응고 과정을 거친 후에 3000rpm에서 30분간 원심한 후 상층의 맑은 혈청만을 채취하였으며 채취된 혈청은 검사 시까지 -20℃에 보관하고 검사시 해동하여 검사에 사용하였다.

### 4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 조직내 분포양상

#### 가. 실험동물 및 부검시 적출조직의 처리

실험에 사용한 동물은 1996년에 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 부검의뢰된 호흡기 증상을 보이는 자돈 7두를 사용하였으며 부검의뢰된 자돈은 일반적인 부검과정을 거친 후 이차적인 세균감염의 여부와 마이코플라스마의 감염여부를 조사하기 위해 신선한 폐장조직의 일부를 적출하였으며 적출된 신선한 조직에서 5% 면양의 혈액이 포함되어 있는 혈액배지에 접종하여 세균분리 시도하였으며 마이코플라스마감염여부를 알아보기 위해서는 신선한 폐장조직을 동결절편기로 절편한 후 여기에 FITC가 표지되어 있는 마이코플라스마에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 이용하여 형광항체검사를 실시하였다. 또한 자돈의 폐장조직에서 바이러스의 감염여부나 이차적인 세균감염등의 여부를 조사한 조직병리학적 관찰을 위해 조직의 일부를 10% 중성 포르말린에 고정한 후 약 24-48시간 후에 알코올 탈수과정 및 xylene 치환과정, 파라핀침투과정등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 조직병리학적 관찰 및 조직내 교잡법을 이용한 조직내의 바이러스의 핵산분포양상을 알아보기 위해 사용하였다.

#### 나. 적출된 자돈의 폐장에서 시행한 세균감염여부 검색

부검시 적출된 자돈의 폐장에서 5%의 면양혈액이 함유되어 있는 혈액배지를 사용하여 세균분리를 시도하였다. 흉막폐렴균 또는 *Haemophilus parasuis*균 감염여부를 알아보기 위해 배지 위에 도말된 면 바로 옆으로 NAD를 생산하는 포도상구균을 같이 도말하였다. 부검후 바로 세균배양을 시도하여 최초 세균배양후 24시간 후에 혈액배지위에 성장하는 세균의 집락을 확인하였으며 세균집락중 폐장에서 질병을 일으키고 있는 것으로 생각되는 전체적인 양상의 세균집락을 다시 혈액배지에 이차 계대하였다. 이차 계대후 24시간 정도 지난 후 집락이 어느정도 크기로 성장하면 그람염색, oxidase검사, catalase사, indol 생산능시험, 운동성시험등의 시험을 거쳐 세균을 동정하였다. 일차의 세균분리에서 세균분리를 위해서 도말된 표면의 옆으로 도말한 포도상구균의 옆으로 위성현상이 관찰되는 집락은 흉막폐렴균이나 *Haemophilus parasuis*균의 동정을 위하여 X 인자와 V 인자 의존성 시험 및 urease검사를 실시하여 세균을 동정하였다.

자돈의 폐장에서 마이코플라스마의 감염여부를 알아보기 위해 부검시 적출된 신선한 돼지의 폐장조직을 실험에 사용하기 전까지 -70℃의 deep freezer에 보관한 후 검사시에는 이를 동결절편용 OPC compound에 포매한 후 -20℃로 setting되어 있는 동결절편기를 사용하여 약 6-10 $\mu$ m정도의 두께 poly-L-lysine이 처리되어 있는 슬라이드위에 절편한 후 -20℃에 보관하고 있던 cold acetone에 10분간 고정한 후 상온에서 10분간 건조시키고 이를 검사시까지 -20℃에 보관하였다. 동결절편하고 acetone으로 고정된 조직을 형광항체염색을 시행하기 전에 비특이적인 반응을 줄이기 위해 0.1% tween이 함유되어 있는 0.01M PBS(pH7.4)에 10분간 먼저 담그어 둔 후 슬라이드를 털어 물기를 적당히 제거하고 FITC가 표지되어 있는 마이코플라스마에 대한 단클론 항체를 0.1% tween 20이 함유되어 있는 0.01M PBS(pH7.4)로 50배 희석한 후 조직당 2-300 $\mu$ l를 가한 후 humidified chamber에 넣어 37℃에서 1시간 반응시킨 후 0.1% tween 20이 함유되어 있는 0.01M PBS(pH7.4)로 10분간 3회 세척하고 이를 증류수에 5분정도 담근 후 꺼내고 슬라이드를 완전히 말리고 형광현미경으로 관찰하기 위해 wet mounting media를 한방울 정도 떨어뜨린 후 깨끗한 cover slip으로 덮은 다음 형광현미경으로 관찰하였다. 형광항체검사를 거친 조직에서 주로 기관지의 상피세포의 주위에서

관찰되는 형광반응을 확인하여 마이코플라스마의 감염여부를 확인하였다.

#### 다. 병리조직학적 관찰

호흡기 증상으로 부검의뢰된 자돈을 부검후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 파라핀 포매된 폐장조직을 microtome으로 약 4-5 $\mu$ m 두께로 절편하여 일반적인 조직처리과정에 사용하는 슬라이드위에 올린 후 36 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 정도 두어 완전히 물기를 말린 후 xylene에 5분간 3회정도 담그어 조직내에 침투되어 있는 파라핀을 완전히 제거한 후 100%, 95%, 90%, 80%, 70%의 알코올에 차례대로 담그어 조직을 함수시켰다. 함수후 Harris hematoxylin으로 2분정도 염색한 후 흐르는 수돗물에 약 5분간 완전히 세척하여 염색된 조직이 적당하게 보라빛을 보이면 다시 증류수에 1분정도 담근 후에 80% 알코올에 5분간 담그어 둔다. 그 후 eosin염색액에 약 6분간 염색한 후 80% 알코올로 3회 세척한 후 90%, 95%, 100% 알코올에 차례대로 담그어 조직에서 완전히 수분을 탈수 시킨다. 탈수 후 조직을 xylene에 5분간 3회정도 담그어 투명화과정을 거친후 Canada balsam을 약간 떨어뜨리고 적당한 cover slip을 올려서 mounting한다. 부검후 일반적인 처리과정을 거쳐 표본 슬라이드로 만들어진 조직을 광학현미경으로 관찰하여 병리조직학적 병변을 관찰한다.

#### 라. 조직내 교잡법을 위한 조직 처리

조직내 교잡법을 실시하기 위한 조직은 조직병리학적 관찰을 위해 파라핀에 포매된 조직을 사용하였으며 포매조직은 실험중에 조직이 슬라이드에서 떨어지는 것을 방지하고 슬라이드에 존재하는 불순물로 인한 비특이반응을 줄이기 위해 특수한 세척과정과 표면에 AEC처리를 거친 슬라이드위에 microtome으로 조직을 5 $\mu$ m정도의 두께로 절편하였다. 절편후 약 40 $^{\circ}$ C정도의 oven에서 12시간 정도 말려서 완전히 물기를 제거하고 조직이 슬라이드위에 강력하게 부착하도록 하였다.

#### 마. 조직내 교잡법을 위한 RNA 추출

국내에서 심한 호흡기 증상을 보이는 자돈에서 분리된 돼지 생식기 호흡기

증후군 바이러스를 Marc 145 세포주에 접종한 후 70%정도의 세포변성효과를 보이면 세포배양상층액을 제거하고 tissue culture flask의 바닥에 붙어 있는 세포에서 바이러스의 핵산을 추출하였다. 핵산추출을 위해서 상층액을 제거한 tissue culture flask에 3ml의 Trizol LS reagent (Gibco BRL)를 넣은 후 잘 흔들어서 바닥에 붙어 있는 세포들이 모두 떨어지게 한 후 상온에서 10분간 정체시킨다. 그 후 Trizol LS reagent를 처리한 세포추출물을 멸균되어 있는 새로운 15ml 원심분리용 시험관에 옮기고 여기에 0.8ml의 chloroform을 가한 후 vortex를 이용하여 잘 섞어준 후 10분간 상온에서 정체시킨다. 약 10분후 투명한 상층액이 적당히 분리되면 4℃ 7500rpm으로 15분간 원심하여 투명한 수용액층과 하얀색을 보이는 변성된 단백질층 그리고 가장 하단의 유기층으로 완전히 분리한다. 원심분리후 상층의 수용액층을 불순물이 섞이지 않도록 가능한 한 많은 양을 채취하여 멸균된 새로운 시험관에 옮기고 여기에 동량의 isopropanol을 넣어 준 후 상온에서 약 15분간 정체시킨다. 그 후 시험관을 4℃ 10000rpm에서 30분간 원심분리하여 바이러스의 핵산을 침전시키고 원심후 상층액을 제거하고 여기에 2ml의 70% cold ethanol을 가하여 가볍게 세척하여 시험관벽과 바이러스의 핵산에 남아있는 여분의 isopropanol을 제거하여 준 후 시험관을 4℃ 10000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하여 바이러스의 핵산을 제외한 ethanol과 소량의 isoproanol을 제거한다. 상층액을 제거한 후 시험관을 뒤집어서 clean bench에서 약 30분간 건조하여 남아있는 물기를 제거하고 여기에 DEPC가 처리된 멸균된 3차 증류수를 150 $\mu$ l 정도 가하여 역전사반응 (reverse transcription reaction)에 사용한다.

#### 바. 역전사반응

바이러스에 감염된 세포에서 추출한 RNA를 1 $\mu$ l, DEPC처리된 멸균된 3차 증류수를 8 $\mu$ l, 그리고 50pmole의 oligo(dT)나 random hexamer를 1 $\mu$ l를 0.2ml thin wall PCR tube에 넣은 후 PCR machine을 사용하여 80℃로 10분간 가열하고 이것을 곧바로 얼음에 넣는다. 여기에 2.5mM dNTP를 4 $\mu$ l, 10X PCR buffer (1.25mM MgCl<sub>2</sub>)를 4 $\mu$ l, RNase inhibitor (Perkin Elmer) 50U, MuLV reverse

transcriptase (Perkin Elmer) 200U을 넣어 총 반응양을  $20\mu\text{l}$ 로 맞추고 후에  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시켜 역전사반응을 실행한 후  $99^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 가열하여 남아있는 역전사효소를 불활화시킨 후 핵산중합효소반응에 이용할 때까지  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

#### 사. 중합효소반응

앞의 역전사반응을 통하여 바이러스의 RNA를 cDNA로 전환한후 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특이적인 염기서열을 증폭하기 위하여 sense primer (5'-ATGGCCAGCCAGTCAATCA-3'; position 51 to 69) 와 antisense primer (5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTG-3'; position 464 to 488)를 각각 이용하여 중합효소반응을 실시하였다. 중합효소반응을 위해서 역전사반응을 통하여 만들어진 cDNA  $20\mu\text{l}$ 에 10X PCR buffer (1.25mM  $\text{MgCl}_2$ )  $10\mu\text{l}$ ; 2.5mM dNTP  $8\mu\text{l}$ , sense와 antisense primer를 각각 25pmole씩 넣은 후에 핵산분해효소가 검출되지 않는 3차 증류수를  $60\mu\text{l}$  넣어 총 반응양을  $100\mu\text{l}$ 로 하였다. 위와 같은 반응의 내용물을 모두 섞은 후에  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시켜 cDNA를 반응전에 먼저 denaturation시키고  $94^{\circ}\text{C}$  30초,  $58^{\circ}\text{C}$  25초,  $72^{\circ}\text{C}$  30초의 기본 cycle을 35회 반응시킨 후 마지막으로  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시켰다. 그 후 전기영동으로 결과를 확인하기 전까지  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 중합효소연쇄반응을 거쳐 증폭된 핵산을 확인하기 위해 0.5mg/ml Ethidium bromide를 함유한 0.9% agarose에 전기영동하여 특이적인 크기의 밴드를 확인하였다.

#### 아. Digoxigenin labeling of cDNA probe by random labeling

중합효소연쇄반응의 산물을 전기영동하여 바이러스에 특이적으로 반응한 433base-pair의 증폭산물을 확인한 후 핵산이외의 여분의 primer나 염기성분들을 제거하고 순수한 DNA만을 추출하기 위해서 DNA purification kit (Promega)를 이용하여 증폭된 cDNA를 정제하였다. 정제를 위해서 약  $300\mu\text{l}$ 의 PCR product를 핵산중합효소반응에 의해 만든 다음 여기에 DNA purification kit내에 있는 direct DNA purification 용액을  $100\mu\text{l}$ 와 resin을 1ml 넣은 후 vortex를 이용하여 잘 섞어 주었다. 그 후 이것을 3ml 주사기에 옮겨 붙고 주사기 앞에 kit내에 있는

DNA정제용 column을 연결한 후에 주사기로 밀어내어 주사기안의 내용물을 모두 제거한다. 그 후 다시 주사기에 80% isopropanol을 2ml을 넣고 밀어내어 주사기와 column내부의 불순물들을 세척하여 제거한 후에 column을 뽑아서 새로운 microcentrifuge tube에 꼽고 1000rpm으로 1분간 원심하여 column내에 남아 있는 여분의 isopropanol을 제거한다. 그 후 다시 column을 새로운 멸균된 microcentrifuge tube에 꼽고 여기에 50 $\mu$ l의 멸균된 3차 증류수를 50 $\mu$ l 넣고 이것이 column에 완전히 흡수되도록 2분정도 상온에 정체시킨다. 정체후 column이 꽂힌 microcentrifuge tube를 10000rpm에서 2분간 원심하여 column내에 있던 DNA를 회수한다.

정제과정을 거쳐 회수된 DNA 15 $\mu$ l를 digoxigenin (DIG) labeling and detection kit (Boehringer Mannheim)에 있는 random hexamer mixture 2 $\mu$ l, dNTP mixture (DIG이 표지된 dUTP 포함) 2 $\mu$ l와 Klebow enzyme 1 $\mu$ l를 넣어 최종 반응양을 20 $\mu$ l로 맞춘 후에 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 반응하였다. 반응 후 반응용액에 2 $\mu$ l의 0.2M EDTA(pH8.0)을 넣어 반응을 정지시키고 여기에 2.5 $\mu$ l의 lithium chloride와 75 $\mu$ l의 100% cold ethanol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 2시간 동안 정체시켜 digoxigenin이 표지된 DNA를 침전시켰다. 침전과정후 이것을 4 $^{\circ}$ C, 14000rpm으로 30분간 원심분리하고 원심후에 상층액을 제거하고 200 $\mu$ l의 70% cold ethanol을 넣어 가볍게 세척하여 준 후 이것을 다시 5분간 간단히 원심하고 상층액을 완전히 제거한 후 vacuum dryer를 이용하여 완전히 물기를 말렸다. 물기가 완전히 마르면 여기에 멸균된 3차 증류수나 TE buffer를 50 $\mu$ l 넣어 표지된 DNA를 흡수시켰다.

표지된 cDNA probe는 10진 희석하여 10<sup>4</sup>배까지 희석한 후 미리 희석한 농도별 표준 DNA와 함께 Nylon membrane (Boehringer Mannheim)에 2 $\mu$ l씩 떨어뜨린 후 UV lamp아래에 5분간 정체시켜 DNA를 membrane에 고정시키고 이것을 세균배양용 petridish에 넣고 maleic acid buffer (pH 7.0, buffer 1)에 넣고 5분간 membrane을 적신 후에 buffer를 제거하고 비특이적인 반응을 제거하기 위해 1 $\times$ blocking buffer (buffer2)에 10분간 담가둔 후 buffer를 제거하고 alkaline phosphatase conjugated sheep anti DIG IgG를 1 $\times$ blocking buffer에 10000배 희석하여 petridish에 넣어 30분간 반응시켰다. 반응 후 maleic buffer로 2회 간단히

세척한 후 여기에 detection buffer (pH9.5, buffer 3)를 넣어 5분간 정체시킨 후 detection buffer에 NBT/BCIP를 녹인 발색시약을 넣고 발색을 관찰한다. 발색을 시작한지 약 5분후부터 발색을 관찰하며 약 3-4시간정도 관찰하여 희석된 probe와 표준 DNA와의 발색정도를 비교하여 표지된 probe의 농도를 결정한다.

#### 자. 조직내 교잡법

조직내 교잡법을 실시하기 위해 일반적인 처리과정을 거쳐 슬라이드에 부착된 조직은 먼저 60°C 오븐에서 20분간 정체시켜 조직내에 침투해 있는 파라핀을 어느정도 녹인 후에 이것을 xylene에 5분간 2회 처리하여 완전히 파라핀을 제거한다. 파라핀 제거후 100%, 70%, 50% 알코올에서 5분씩 2회 처리하여 조직을 함수시킨 후 함수된 조직을 DEPC처리된 증류수에 30초간 담근 후 이것을 PBS(pH7.4)에 5분간 담근다. 그 후 조직을 0.2N HCl에 상온에서 20분간 처리하여 단백질을 제거시키고, 100 $\mu$ g/ml의 proteinase K (Gibco BRL)에 37°C에서 20분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 냉장에서 10분간 고정하고 전기적인 비특이반응을 줄이기 위해 0.1mM Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride (0.25%)를 가하여 2회 acetylation시킨 후 2 $\times$ SSC에 10분간 2회 처리하여 hybridization에 사용하였다.

Hybridization에 사용하기 위해 적절한 농도 (1ng/ $\mu$ l)로 희석된 probe 50 $\mu$ l에 hybridization buffer를 500 $\mu$ l 첨가하여 끓는 물에서 15분간 가열하여 cDNA probe를 denaturation시키고 이를 바로 얼음에 집어 넣고 조직당 25-50 $\mu$ l의 probe를 떨어뜨린 후 멸균된 cover slip을 기포가 들어가지 않도록 주의하여 조직에 덮고 조직이 마르지 않도록 cover slide의 주위를 rubber cement로 밀봉하였다.

Hybridization과정후 조직으로부터 cover slip을 제거하고 4 $\times$ SSC에 상온에서 10분간 2회, 2 $\times$ SSC에 37°C에서 10분간 2회 그리고 상온에서 10분간 2회, 0.2 $\times$ SSC에 상온에서 10분간 2회 세척하였다.

차. 조직내에서 hybridization된 cDNA의 면역조직화학적 검출

Hybridization과 posthybridization wash가 끝난 조직은 먼저 maleic acid buffer 에 10분간 처리한 후 면역조직화학적검출시 비특이반응을 줄이기 위해 1×blocking buffer에 40분간 처리하고 조직에 alkaline phosphatase conjugated anti DIG IgG를 1×blocking buffer에 1:500으로 희석하여 조직에 blotting한 후 humidified chamber에 넣어 37℃에서 1-2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 maleic acid buffer (pH 7.5)로 상온에서 10분간 1회 세척한 후 1×blocking buffer에서 10분간 2회 세척하고 그 후 detection buffer (pH 9.5)에 상온에서 5분간 처리한 후 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium(NBT)과 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)를 detection buffer에 섞어 조직에 blotting한 후 양성반응이 관찰되기까지 암상자에 상온에서 3-8시간동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 TE buffer에 담그어 반응을 중지시키고 증류수로 세척한 후 0.5% methyl green으로 약 3회-20회 정도 담그어 대조염색하고 증류수에 세척한 후 조직을 말려서 탈수하고 xylene에 5분간 담근 후 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다.

## 5. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 면역조직화학적 및 조직내 교잡법을 이용한 경시적인 바이러스의 분포양상에 관한 연구

### 가. 바이러스와 세포주

실험에 사용한 바이러스는 1997년 심한 호흡기 증상을 발현하여 서울대학교 수의과대학에 부검의뢰된 5주령의 이유자돈의 폐장에서 Marc 145세포주를 이용하여 분리하였으며 분리된 바이러스 (SNU970501 PRRSV)는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 특이적으로 반응하는 primer를 이용한 역전사 중합효소연쇄반응 및 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대해 특이적으로 반응하는 단클론 항체인 SDOW17로 간접형광항체법을 시행하여 분리한 바이러스가 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스임을 확인하였다. 분리한 바이러스를 다시 Marc 145세포주에

접종하여 증식시킨 후 바이러스의 역가를 결정하고 바이러스의 역가를  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml로 희석하여 -70℃에 보관하였다가 접종시 해동하여 접종하였다.

#### 나. 실험동물 및 실험계획

실험동물은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대해서 항체음성인 돈군에서 구입한 항원, 항체음성인 포유자돈 40두를 시험에 사용하였으며 40두중 24두는 접종군으로 16두는 음성대조군으로 사용하였다. 실험에 사용한 포유자돈은 농장에서 구입후 학교로 이송한 후 혈청을 채취하여 항원 및 항체검사를 하였으며 이송후 3일후에 24두의 실험군에는 개체당  $10^6$ TCID<sub>50</sub>/ml의 바이러스를 2ml씩 기도를 통하여 직접 접종하였다. 나머지 16두의 음성대조군에는 동량의 세포배지 (DMEM)를 접종군과 동일한 방법으로 접종하였다. 접종후 접종군과 대조군은 분리수용하였으며 경시적으로 임상증상을 관찰하였다.

바이러스 접종후 경시적인 바이러스의 분포와 병변의 진행양상을 관찰하기 위해 접종후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일, 28일에 접종군 3두와 음성대조군 2두를 부검하여 폐장 및 기타장기에서의 육안병변을 관찰하였으며 바이러스분리 및 역전사 중합효소연쇄반응을 위해 핵산을 추출하기 위해 자돈의 혈액과 멸균한 가위와 포셉을 사용하여 자돈의 폐장을 적출하였으며 폐장 조직병리학적 관찰, 면역조직화학기법, 조직내 교잡법을 위해서는 부검시에 적출된 폐장, 편도, 심장, 임파절, 신장, 간장, 비장, 흉선, 췌장, 소장, 대장, 뇌등의 전신장기는 10% 중성 포르말린에 24-48시간 고정후에 탈수 및 xylene 치환과정, 파라핀 침투과정등의 일반적인 조직처리과정을 거친 후에 파라핀에 포매하여 보관하였다.

#### 다. 바이러스 분리 및 역전사 중합효소연쇄반응

실험1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 분리 방법을 이용하였다.

실험4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 조직내 분포양상의 역전사 반응 와 중합효소연쇄반응 방법을 이용하였다.

#### 라. 조직병리학적 관찰

바이러스 감염후 경시적으로 부검을 실시한 후 적출된 자돈의 전 장기는 10% 중성 포르말린에 고정된 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 파라핀 포매하고 microtome으로 일반적인 슬라이드에 약 4-5 $\mu$ m 두께로 절편하였다. 절편 후 36 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 정도의 건조과정을 거친 후 탈파라핀과정, 흡수과정을 거치고 일반적인 조직병리학적 관찰에 사용되는 H&E 염색을 실시한 후 탈수과정과 투명화과정을 거쳐 Canada balsam을 약간 떨어뜨리고 적당한 cover slip을 올려서 mounting하여 광현미경으로 관찰한다.

제작된 조직병리슬라이드는 폐장에서 우선 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 감염이 특징적인 병변인 염증세포로 인한 폐포벽의 비후 및 기관지강, 세기관지강과 폐포강에서의 괴사된 세포의 침윤등을 관찰하였으며 그외의 장기에 대해서도 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 실험감염 및 자연감염의 예에서 관찰되는 실질장기의 입파구성 염증의 분포 및 실질장기내에서의 혈관의 괴사로 인한 괴사성 염증의 유무를 관찰하였다.

#### 마. 면역조직화학기법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 항원검출

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 실험감염되어 경시적으로 부검을 실시한 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매된 조직을 면역염색과정중 조직이 슬라이드에서 떨어지는 것을 방지하기 위해 일반슬라이드에 ploy-L-lysine을 처리한 슬라이드위에 5 $\mu$ m정도의 두께로 절편을 제작한 후 탈파라핀화 과정을 거친후 일차중류수에 30초간 담그어 여분의 알코올을 제거한 후에 0.1% tween 20이 첨가된 0.01M PBS에 5분간 담그어 둔 후 슬라이드를 꺼내어 조직의 주위를 Dako pen으로 칠한 후 protease K를 100 $\mu$ g/ml의 농도로 희석하여 조직에 200-300 $\mu$ l 정도 떨어뜨린 후 humidified chamber에 슬라이드를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리하여 바이러스의 항원을 복구시킨 후에 슬라이드를 PBTS에 30초간 2회 세척하여 조직에 남아있는 protease K를 세척해내고 슬라이드에서 물기를 적당히 제거한 후 normal goat serum를 PBTS로 10배 희석하여 조직에 300 $\mu$ l 정도 떨어뜨린 후 상온에서 40분정도 반응시켜 비특이적이 반응을 줄인다. 그 후 슬라이드를 세척하지 말고 슬라이드

위의 희석된 normal goat serum만을 제거한 후 다시 조직에 SDOW17·단클론항체를 PBTS로 300배 희석하여 조직에 300 $\mu$ l정도 떨어뜨리고 humidified chamber에 넣어 36 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C로 냉각된 PBTS로 10분씩 3회 세척하여 특이적으로 결합되지 않는 항체를 조직에서 완전히 제거한다. 일차항체반응과 세척후 PBTS에 100배 희석된 이차항체 (alkaline phosphatase conjugated goat anti mouse IgG)를 조직에 300 $\mu$ l정도 가한 후 humidified chamber에 넣어 36 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C로 냉각된 PBTS로 10분씩 3회 세척하여 특이적으로 결합되지 않는 항체를 조직에서 완전히 제거한다. 이차항체반응 및 세척후에 alkaline phosphatase의 기질인 fast red를 Tris buffer (pH9.5)에 녹인 후 조직에 300 $\mu$ l정도 가한 후 humidified chamber에 넣어 상온에서 약 10분에서 발색이 일어날 때까지 관찰한후 발색이 적당히 일어나면 TE buffer (pH8.0)에 넣어 발색을 중지시키고 슬라이드를 일차증류수에 담그어 발색이 끝난 여액을 완전히 세척한다. 증류수에 세척한 후에 Mayer's hematoxylin으로 3분간 대조염색하고 슬라이드를 흐르는 수돗물에서 5분간 세척한 후 조직을 일차·증류수에 담근 후 crystal mounting solution으로 wet mounting한 후 상온에서 30분간 건조하고 광학현미경으로 관찰한다.

바. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 핵산검출

실험4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 조직내 분포양상의 조직내 교잡법 실험방법을 이용하였다.

사. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈의 전신 임파절에서의 바이러스의 분포양상

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 접종군 24두의 자돈중 접종후 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일, 28일령의 각각 2두에 대해 악하임파절, 액와임파절, 기관기관지 임파절, 중격임파절, 장간막임파절, 내장골임파절, 천서경임파절, 인후두임파절등의 8개의 임파절에서 경시적으로 바이러스가 전신의 임파절에 분포하는 양상을 알아보기 위해 면역조직화학법과 조직내 교잡법을

이용하여 바이러스의 항원 및 핵산을 검출하였다.

## 6. 자연감염된 유산된 태자에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 분포

### 가. 실험동물

1997년에서 1998년 사이 돈군에서의 집단적인 유산을 보여 유산의 원인을 진단하기 위해 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 부검의뢰된 유산태아중 역전사 중합효소연쇄반응을 통해 돼지 생식기 호흡기 증후군의 감염에 의한 유산으로 판명된 9건의 유산태아조직에 대해 바이러스분리 및 조직병리검사, 면역조직화학기법, 조직내 교잡법등의 실험을 실시하였다.

### 나. 바이러스분리

실험1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 분리 방법을 이용하였다.

### 다. 역전사 중합효소 연쇄반응

실험4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 조직내 분포양상의 역전사 반응와 중합효소연쇄반응 방법을 이용하였다.

### 라. 유산된 태아조직에서 조직병리학적 관찰

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염으로 유산된 유산태자의 조직에서 조직학적 병변을 관찰하기 위해서 부검을 실시한 후 적출된 태자의 폐장, 신장, 간장, 비장, 편도, 흉선, 뇌, 소장등의 장기는 10% 중성 포르말린에 고정한 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 일반적인 슬라이드에 약 4-5 $\mu$ m 두께로 절편하였다. 염색과정중 조직이 탈락하는 것을 방지하기 위해 절편 후 건조과정을 거친 후 탈파라핀과정, 합수과정을 거쳐 H&E 염색하여 조직을 광학현미경으로 관찰하였다.

마. 면역조직화학기법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 항원검출

실험5. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 면역조직화학법 및 조직내 교잡법을 이용한 경시적인 바이러스의 분포양상에 관한 연구의 면역조직화학기법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 항원검출 방법을 이용하였다.

바. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 핵산검출

실험4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 조직내 분포양상의 조직내 교잡법 실험방법을 이용하였다.

## 7. 국내 분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 임신말기 모돈에서의 병원성 실험

가. 바이러스 및 세포주

본 실험에 사용한 바이러스는 호흡곤란 증세를 보이는 자돈으로 분리한 SNU970501 PRRSV와 1998년 대구지역에서 모돈군에서 폭발적인 유산증세를 보여 진단의뢰된 유산태아로부터 역전사 중합효소연쇄반응을 통해서 돼지 생식기 호흡기 증후군으로 진단한 유산태아 조직으로부터 분리한 SNU980606 PRRSV를 접종에 사용하였다.

접종에 사용할 바이러스는 Marc-145 세포주에 적응시킨 후 배양하여 세포접종후 세포변성효과가 70%이상 관찰되면 세포와 세포배양액을 3회 동결 및 해동을 반복한 후 3000rpm에서 10분간 원심한 후 상층액을 채취하고 상층액을 단계별로 10진 희석하여 Marc-145 세포주에 접종하여 바이러스의 역가를 결정한 후 접종시까지 -70℃에 보관하였다.

#### 나. 실험동물 및 실험설계

실험에 사용한 두 개의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 분리주에 대해서 SNU970501에 대해서는 4두의 모돈을 SNU980606에 대해서는 2두의 모돈을 접종에 사용하였다. 실험에 사용한 모돈은 최근 6개월간 모돈군에서 집단적 및 산발적인 유산의 발생이 없으며 모돈군의 혈청검사결과 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대해 음성인 돈군에서 구입하였다. 실험에 사용할 모돈은 농장에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 오염되지 않은 정액을 사용하여 인공수정하여 임신이 확인된 모돈을 임신 80일령에 농장에서 학교로 이송하였으며 이송후 약 10일간 사육후 분만 3주전인 임신 90-91일령에  $1 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml 역가의 바이러스를 분무하는 형태로 양쪽 비강으로 10ml정도를 접종하였다. 접종 후 모돈은 매일 모돈에서의 임상증상 및 유산여부등을 관찰하였다.

실험감염후 유산을 일으키면 유산된 태자는 태자의 생존여부를 확인하고 곧바로 부검을 실시하였으며 분만일전에 조기분만하여 생존한 자돈의 경우 초유를 먹인 후에 모돈에서 분리하여 대용유로 사육하여 임상증상을 관찰하면서 경시적으로 부검하여 유산태자와 마찬가지로 바이러스분리, 병리조직학적 검사, 면역조직화학법, 조직내 교잡법을 시행하였다. 유산한 모돈의 경우 유산후 1일 후에 부검을 실시하여 육안적인 병변을 관찰하고 폐장에서 바이러스 분리 및 역전사 중합효소연쇄반응을 수행하였으며 모돈의 전장기에 대해서는 10% 중성 포르말린에 고정하여 다음 실험에 사용하였다.

분만기일까지 유산하지 않는 모돈의 경우 분만예정일에 부검하여 모돈의 자궁으로부터 태아의 폐사여부를 관찰하고 각각의 태아에 대해서 유산태자에서 수행한 대로 처치하여 실험에 사용하였고 모돈 역시 바이러스분리 및 병리조직학적 관찰등의 실험을 수행하였다.

#### 다. 바이러스 분리 및 역전사 중합효소연쇄반응

실험1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 분리 방법을 이용하였다.

실험4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기

호흡기 바이러스의 조직내 분포양상의 역전사 반응 와 중합효소연쇄반응 방법을 이용하였다.

라. 유산된 태아조직에서 조직병리학적 관찰

실험감염후 유산태자 및 허약자돈, 모돈은 부검을 실시한 후 전신장기를 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정한 후 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 일반적인 슬라이드에 절편하고 H&E 염색하여 조직을 광학현미경으로 관찰하였다.

마. 면역조직화학기법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 항원검출

실험5. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 면역조직화학법 및 조직내 교잡법을 이용한 경시적인 바이러스의 분포양상에 관한 연구의 면역조직화학기법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 항원검출 방법을 이용하였다.

바. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 핵산검출

실험4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스 조직내 분포양상의 조직내 교잡법 실험방법을 이용하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특성.

국내에서 분리된 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 변이정도를 알아보기 위해 1996년에서 1998년 사이에 서울대학교 수의과 대학 병리학 교실에 의뢰된 돼지 가검물로부터 바이러스의 분리를 시도하였다. 분리된 바이러스에 대해서 바이러스의 변이정도를 알아보기 위해 E 단백질에 특이적으로 반응하는 3가지의 단클론 항체와 N 단백질에 특이적으로 반응하는 3가지의 단클론 항체에 대해 간접형광항체법을 이용하여 검사를 시행하여 본 결과 대부분의 분리주는 6가지의 단클론 항체에 모두 반응하는 분리주로 12주중 10주로 약 83%를 차지하였으며 그외에 E 단백질에 대한 항체에는 모두 반응하지 않았으나 N 단백질에 대한 항체에는 모두 반응하는 분리주가 2주로 분리주중 8.5%를 차지하였고, 그외에 6개의 항체에 대해 각기 다르게 반응하는 분리주들이 2주씩 있는 4가지의 양상이 관찰되었다.

Table 1. Antigenic variation among Korean PRRSV isolated determined by indirect fluorescent antibody test with anti-E protein and anti-N protein monoclonal antibodies.

| No. of PRRSV isolate | Indirect fluorescent antibody test |    |     |             |      |       |
|----------------------|------------------------------------|----|-----|-------------|------|-------|
|                      | anti-E MAbs                        |    |     | anti-N MAbs |      |       |
|                      | 15                                 | 28 | 246 | SDOW17      | VO17 | EP147 |
| 8                    | +                                  | +  | +   | +           | +    | +     |
| 2                    | -                                  | -  | -   | +           | +    | +     |
| 1                    | -                                  | -  | -   | -           | -    | -     |
| 1                    | -                                  | -  | -   | +           | +    | -     |

본 실험에서 8개의 분리주를 대상으로 하여 여러 가지 단클론 항체를 이용한 간접형광항체법을 이용하여 바이러스의 타입을 분석한 결과 놀랍게도 국내에서 분리되는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 모두 미국형의 바이러스임을 확인하였다. 이는 국내로 유입되는 모돈 및 웅돈의 규모가 미국지역에서 유입되는 돈군의 규모와 유럽에서 유입되는 돈군의 규모가 비슷하다는 것을 고려해 볼 때 상당히 놀라운 결과라 할 수 있을 것이다. 이러한 결과는 앞으로 유럽에서 국내로의 돈군의 유입시에 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 감염된 돈군을 철저히 색출해 내어 유럽형의 국내 유입을 방지해야 한다는 앞으로의 방역대책을 제시하는 결과이다. 왜냐하면 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 두가지 주된 혈청형인 미국형과 유럽형의 바이러스는 서로 혈청학적 교차반응을 일으키고 같은 바이러스로 확증되었지만 서로 각각의 바이러스에 대한 항체가 서로 다른 바이러스의 감염을 방어하는 데 효과적이지 않다는 실험결과들이 다수 보고되어 있기 때문이다. 즉 미국형 바이러스에 면역된 개체는 이 후 미국형의 같은 타입의 바이러스의 감염에 대해서는 어느정도 효과적으로 방어할 수 있지만 유럽형의 다른 형의 바이러스에 감염시는 효과적으로 감염을 방어할 수 없다는 뜻이다.

또한 국내에서의 분리주에 대해 어느정도의 항원성의 변이를 보이는가를 실험하기 위해 다양한 단클론 항체를 사용하여 바이러스의 항원성의 변이를 알아본 결과 물론 더 많은 분석이 필요하겠지만 약 83%정도의 바이러스가 같은 형태의 반응성을 보였고 그 밖에 17%정도는 주요하게 관찰되는 형태와 다른 형태로 일정한 반응의 형태가 없음이 관찰되었다. 이것은 국내에서 문제가 되고 있는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스간에 서로 간과할 수 없는 항원성의 변이가 있을 것으로 생각하게 하는 자료이다.

이상의 실험결과는 국내에서 이미 혈청검사로 국내에서 돼지 생식기 호흡기 증후군이 만연되어 있다는 것을 확인하였지만 바이러스의 분리를 통해서 이유자돈의 질병에서 상당히 중요한 부분을 차지하고 있다는 것을 확인하였으며 실험에서 분리한 다양한 바이러스들은 앞으로 국내에서 국내의 실정에 맞는 백신을 개발한다거나 새로운 진단법을 개발하는 데 있어 유용한 자료로 사용될 것으로

사료된다.

## 2. 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 ELISA 와 간접형광항체검사의 비교

검사에 사용한 100개의 혈청에 대해 ELISA검사에서 양성인 97개의 혈청에 대해 간접형광항체검사법에서는 95개만이 양성으로 판정되었으며 나머지 2개의 혈청은 음성으로 판정되었다. 한편 ELISA검사에서 음성인 3개의 혈청은 간접형광항체검사결과 2개의 혈청은 음성으로 나머지 1개의 혈청은 양성으로 판정되었다.

Table 2. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect fluorescent antibody test (IFA)

|     |          | ELISA    |          |
|-----|----------|----------|----------|
|     |          | positive | negative |
| IFA | positive | 95       | 1        |
|     | negative | 2        | 2        |

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 그 지역이나 바이러스분리주들 간에 상당히 심한 변이를 보이는 것으로 보고되어 있다. 바이러스에 대한 감염여부를 알아보는 혈청학적 검사방법을 위해서는 바이러스의 항원이 필요하게 되는 데 상업화된 ELISA 키트의 경우 미국에서 분리된 표준균주를 사용하였으며 각국에서 간접형광항체검사나 IPMA에 사용하는 바이러스의 경우 물론 표준균주를 사용하는 경우도 있겠지만 대부분 그 나라의 분리주를 사용하게 된다. 이번 실험결과 간접형광항체법과 ELISA검사결과의 차이는 약 3%정도로 민감도나 특이성에서 그다지 차이가 난다고 할 수 없을 것으로 생각되며 이번 실험에서의 결과의 차이는 물론 실험방법에 따른 오차를 생각할 수 있겠지만 간접형광항체법검사에 사용한

국내분리주와 상업화되어 있는 ELISA 키트에 사용한 표준균주의 차이에서 오는 오차도 무시할 수 없을 것으로 생각된다.

돼지 생식기 호흡기 증후군의 감염을 진단하는 혈청학적 검사방법으로는 아직까지도 미국 및 캐나다등지에서는 그 지역의 분리주를 이용한 간접형광항체법을 일반적으로 사용하는 형편이며 최근 들어 간접형광항체법이나 유럽에서 혈청검사시 주로 사용하는 IPMA방법을 대신할 만한 여러 가지 ELISA방법이 보고되고 있다.

ELISA의 경우 간편하고 한번에 대량의 샘플을 검사할 수 있다는 장점이 있지만 IPMA에 비해서 모체이행항체의 검출에 대해서는 민감도가 떨어진다는 보고도 있다. 물론 최근 들어 돼지 생식기 호흡기 증후군을 혈청학적으로 진단하기 위해서 간편함 때문에 ELISA를 이용한 방법이 증가하는 추세에 있지만 이러한 ELISA방법과 그 나라의 분리주를 이용한 간접형광항체법을 이용한다면 좀 더 정확한 검사결과를 얻을 것으로 생각된다.

국내에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염은 이미 만연되어 있는 실정이며 이에 대한 정확한 정보의 추가 및 이에 대한 대책마련을 위해서는 국내의 실정에 합당한 혈청검사기법의 확립이 요구되어 진다고 하겠다. 따라서 앞으로 국내에서의 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 혈청검사에서 국내 실정에 맞는 혈청검사방법을 확립하기 위해서는 좀 더 많은 국내분리주의 확보하고 이를 기본자료로 하여 분리주들중 국내의 분리주를 대표할 수 있는 가장 흔하게 분리되는 타입의 바이러스를 이용한 간접형광항체검사 및 국내의 돼지 생식기 호흡기 증후군 분리주에 대한 공통적인 항원부위의 확인과 이를 이용한 ELISA등의 검사기법의 개발이 필요하다고 사료된다.

### 3. ELISA를 이용한 국내 모돈에서의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 감염률 조사

서울대학교 수의과대학 병리학교실에 1995년에서 1996년사이에 의뢰된 160개 돈군의 2132개의 돼지 혈청에서 ELISA방법을 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 양성률을 조사한 결과 전체 가검 혈청에 대해서는 2132개의 혈청 중 964개인 46.5%에서 160개의 돈군에 대해서는 111개 돈군이 의뢰된 혈청 중

1개 이상이 양성으로 나타나 69.4%의 양성률을 나타내었으며 지역적으로는 경기도에서 71.9% (69/96), 경상도에서 71.4% (20/28), 강원도에서 66.7% (2/3), 충청도에서 61.9% (13/21), 그리고 전라도에서는 58.3% (7/12)의 양성률을 나타내었다. 농장규모별로는 모든 100두 이하의 돈군에서는 60.9% (28/46), 모든 100-200두 규모의 돈군에서는 70.7% (53/75), 그리고 모든 200두 이상의 돈군에서는 76.9%(30/39)의 양성률을 나타내었으며 계절별로는 봄에는 61.3% (19/31), 여름에는 63.6% (35/55), 가을에는 73.7% (28/38), 그리고 겨울에는 68.3% (43/63)의 양성률을 나타내었다. 이러한 농장규모별, 계절별 돈군의 양성률을  $\chi^2$  test를 이용하여 각 변수간에 그 유의성의 차이를 비교해 본 결과 농장규모( $\chi^2=2.64$ ,  $p=0.267>0.05$ )와 계절별( $\chi^2=1.56$ ,  $p=0.699>0.05$ )로 양성률의 유의성 있는 차이가 없었다.

실험을 실시한 1996년 현재 국내에서의 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 양성률은 전국의 전체적인 돈군에 대해 약 70% 정도로 상당히 높은 수준이며 이는 이 당시까지 국내에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 백신을 사용하지 않았으므로 이러한 높은 수준의 양성률은 모두 자연감염에 의한 것으로 추정된다. 물론 이번 혈청검사의 대상의 돈군이 무작의적으로 선택된 전국적인 규모의 돈군이 아니고 서울대학교 수의과 대학 병리학교실에 혈청검사 된 것이므로 이 실험의 결과가 전체적인 국내의 감염정도를 정확히 나타내고 있다고는 할 수 없지만 본 실험의 결과로 미루어 볼 때 국내에서 돼지 생식기 호흡기 증후군은 이미 국내에 만연되어 감염되어 있는 실정이라고 할 수 있으며 이에 대한 대책이 시급히 요구되는 실정이다. 또한 현재까지의 실험결과에 따르면 돼지 생식기 호흡기 증후군은 본 바이러스에 의한 질환보다는 바이러스 감염으로 인한 속발성의 세균질환이나 이차적인 바이러스의 감염이 문제가 되므로 이미 돼지 생식기 호흡기 증후군이 만연되어 거의 모든 농장에 상재된 현재의 시점에서는 이러한 이차적인 세균질환 및 바이러스질환관리에도 돈군의 사양관리 및 방역대책에 신경을 써야 할 것으로 생각된다.

본 실험은 국내 최초로 전국적인 규모의 돈군을 대상으로 실시한 혈청검사결과로 본 실험의 결과로 국내에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염정도를 파악할 수 있게 되었으며 또한 이 자료는 전국적으로 돼지 생식기

호흡기 증후군의 감염에 대한 대책마련에 기초가 될 것으로 생각된다.

#### 4. 자연감염된 자돈의 폐장에서 조직내 교잡법을 이용한 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 조직내 분포양상

##### 가. 조직병리학적 검사결과

호흡곤란 증상을 보이는 7두의 자돈의 폐장을 병리조직학적으로 관찰해 본 결과 7두에서 정도의 차이는 있으나 대식구나 임파구등의 침윤과 type II 폐포세포의 증식으로 인한 폐포벽의 비후와 폐포강내와 기관지내강내에 괴사, 탈락된 폐포세포와 폐포대식구의 축적을 관찰할 수 있었다. 그 외에도 일부의 경우에서 2차적인 세균감염에 의한 화농성 기관지성 폐렴소견을 관찰할 수 있었으며 일부에서는 기관지 주위나 혈관주위에 임파구의 증식도 관찰할 수 있었다. 조직병리학적 검사를 실시한 7두의 자돈중 대식구나 임파구의 침윤으로 인한 폐포벽의 비후가 7두 모두에서 정도의 차이는 있지만 가장 뚜렷하게 관찰되는 병변이었으며 그 외에 미약하기는 하지만 폐포강내와 기관지강내의 괴사된 세포의 축적도 7두의 자돈에서 모두 확인할 수 있었다. 반면에 바이러스 감염시에 보일수 있는 type II 폐포세포의 증식은 4두의 자돈에서만 미약하게 관찰되었다.

##### 나. 세균감염에 대한 검사

호흡곤란 증세를 보이는 7두 자돈의 폐장에서 세균분리검사와 마이코플라스마 항체를 이용하여 형광항체검사를 수행하여 마이코플라스마의 감염여부를 검색하여 본 결과 7두의 자돈중 2두의 자돈에서 *H. parasuis*가 분리되었으며 7두 모두 마이코플라스마의 감염에 대해서는 음성이었다.

##### 다. 자연감염된 자돈의 폐장조직에서의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 핵산 분포

호흡곤란을 보이는 7두의 자돈의 폐장에서 돼지 생식기 호흡기 증후군

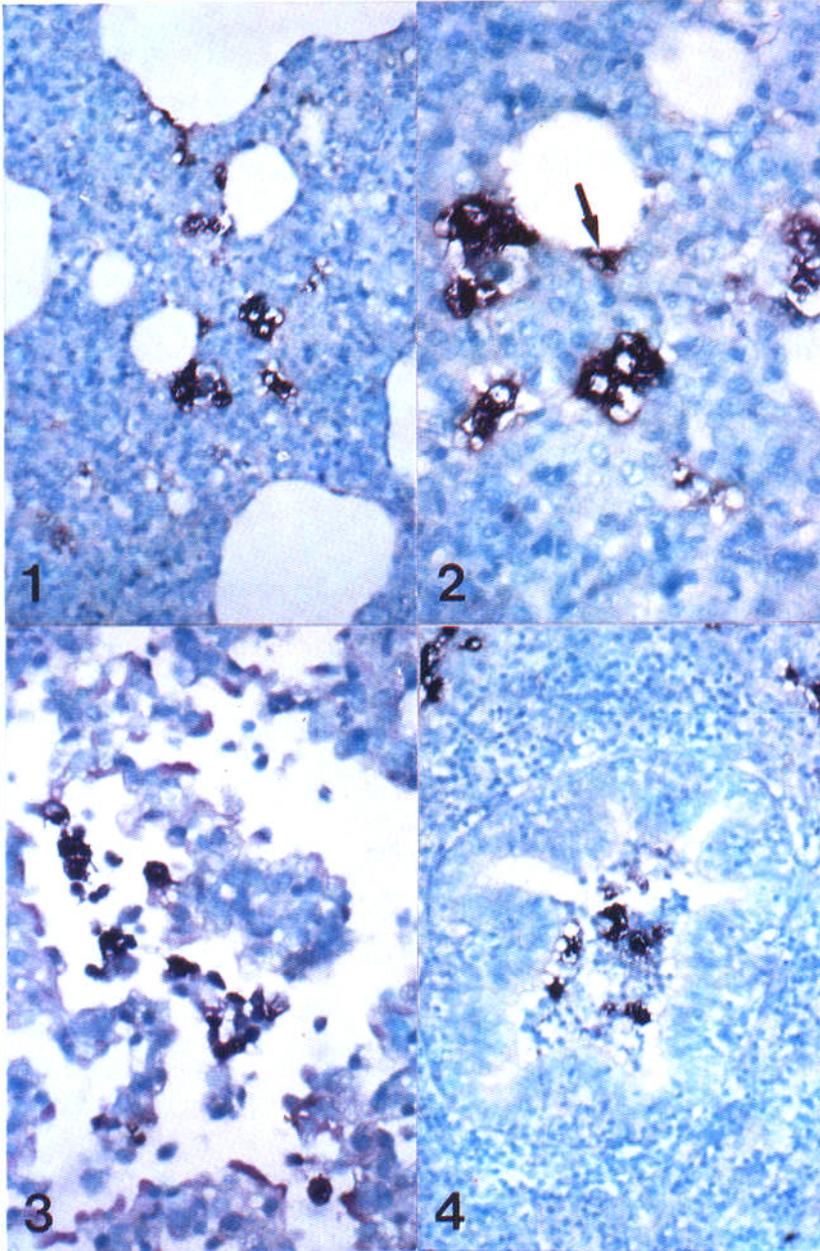
바이러스에 특이적으로 반응하는 cDNA probe을 제작하여 조직내 교잡법을 시행한 결과 병리조직학적 관찰을 통해 병변을 나타내었던 비후된 폐포벽의 간질성 대식구 (Fig. 1)와 폐포강에 인접한 이형 폐포세포 (Fig. 2) 그리고 폐포강 (Fig. 3)이나 기관지내강의 대식구 (Fig. 4)에서 양성반응을 확인할 수 있었다.

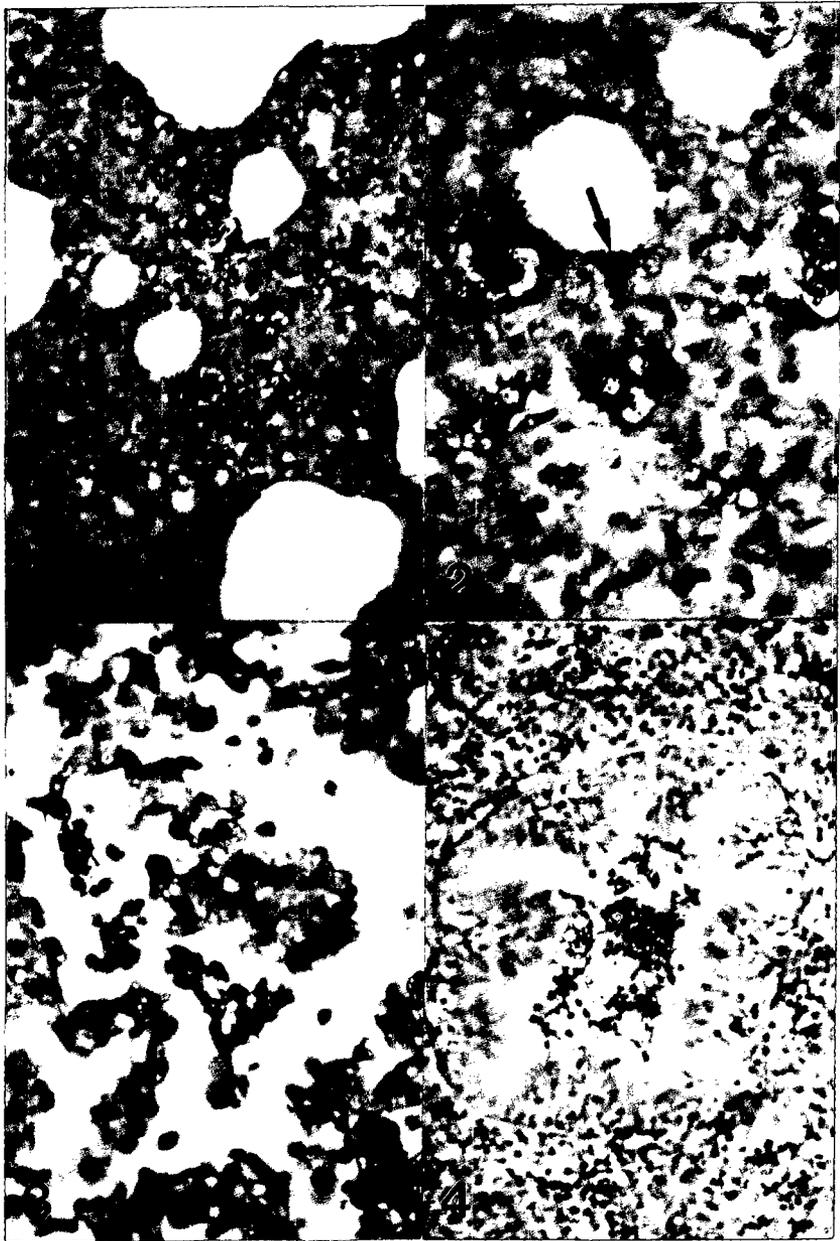
검사를 시행한 7두의 자돈중 비후된 폐포벽의 대식구와 폐포강이나 기관지내강의 괴사된 세포 및 폐포대식구에서는 7두 모두에서 양성반응이 확인되었으며 7두중 2두의 자돈의 폐장에서는 폐포벽에 인접하여 있는 이형 폐포세포로 생각되는 세포에서도 양성반응이 관찰되었다.

Table 3. Clinical histories, microbiology and in situ hybridization results in seven piglets naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

| Piglet No. | Age     | Bacteriology       | Mycoplasma | In situ hybridization   |                     |                    |
|------------|---------|--------------------|------------|-------------------------|---------------------|--------------------|
|            |         |                    |            | Interstitial macrophage | Alveolar macrophage | Type II pneumocyte |
| 1          | 7 days  | Negative           | Negative   | +++*                    | +                   | +                  |
| 2          | 6 days  | Negative           | Negative   | ++                      | +                   | -                  |
| 3          | 13 days | <i>H. parasuis</i> | Negative   | ++                      | +                   | -                  |
| 4          | 10 days | <i>H. parasuis</i> | Negative   | ++                      | ++                  | -                  |
| 5          | 5 days  | Negative           | Negative   | ++                      | +                   | -                  |
| 6          | 7 days  | Negative           | Negative   | ++                      | +                   | +                  |
| 7          | 12 days | Negative           | Negative   | ++                      | +                   | -                  |

\*- = negative staining; + =limited positive staining, less than 1 cell per high power field; ++ = moderate positive staining, approximately 1 cell per high power field; and +++ = extensive positive staining, more than 1 cell per high power field.





## Legends for Figure

Figure 1. Lung; piglet No. 1 naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In situ hybridization using PRRSV probe. Positive hybridization signals for PRRSV nucleic acids demonstrated within the cytoplasm of mononuclear cells in the thickened alveolar septa. Hybridization signals are seen as black grains. Methyl green counterstain. x200.

Figure 2. Lung; piglet No. 1 naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In situ hybridization using PRRSV probe. Type 2 pneumocytes replicating PRRSV (arrow). Hybridization signals are seen as black grains. Methyl green counterstain. x400.

Figure 3. Lung; piglet No. 4 naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In situ hybridization using PRRSV probe. Alveolar macrophages are replicating PRRSV. Hybridization signals are seen as black grains. Methyl green counterstain. x200.

Figure 4. Lung; piglet No. 5 naturally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). In situ hybridization using PRRSV probe. Positive signals demonstrate with cellular debris in terminal airway lumina. Hybridization signals are seen as black grains. Methyl green counterstain. x200.

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 감수성 있는 자돈에 감염되었을 경우 국소 임파절에서 일차 증식한 후 viremia를 일으키며 혈액중의 바이러스가 표적기관인 폐장에 감염되어 폐포대식구에서 증식하여 대식구와 임파구의 침윤과 type II 폐포세포의 증식을 특징으로 하는 간질성 폐렴을 유발하고(Halbur 등, 1995a; Halbur 등, 1995b; Rossow 등, 1995; Halbur 등, 1996) 그 외에 폐포내강과 기관지 내강에 탈락, 괴사된 폐포세포와 폐포대식구의 축적을 관찰할 수 있으며 그 밖에 흉막폐렴, 파스투렐라성 폐렴, 글래서씨병, 연쇄상 구균증등의 2차적 세균감염에 의한 화농성 기관지성 폐렴 및 기관지 주위나 혈관주위의 임파구 세포(lymphoid follicle)의 증식을 관찰할 수 있다. 이러한 병변은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 자연감염되었거나 실험감염시에도 모두 관찰할 수 있는 병변으로 이번 실험의 7두 자돈 폐장에서는 그 정도의 차이는 있으나 위의 병변들을 관찰할 수 있었다.

폐장 병변외에도 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 실험감염시에 임파절에는 germinal center의 증식과 임파구의 괴사, 그리고 임파절 내부에 polykaryocyte를 포함하는 액체가 차 있는 낭의 형성을 관찰할 수 있으며 (Collins 등, 1993; Rossow 등, 1994b), 심장에서는 주로 감염말기 관찰되는 소견으로 심근이나 심내막에서 심근세포의 괴사나 혈관주위와 Purkinje 섬유주위에 임파구와 대식구의 침윤을 관찰할 수 있다. 뇌에서도 혈관주위에 임파구와 대식구의 침윤이 있는 뇌염소견이 관찰된다. 그 밖의 장기에서도 바이러스의 종에 따라 임파구와 대식구의 침윤된 염증을 관찰할 수 있다 (Rossow등, 1994b; Rossow등, 1995; Halbur등, 1995a). 이처럼 여러 장기에 다발적으로 병변을 일으키는 것은 병변을 일으키는 감염초기의 viremia에 기인하는 것으로 보인다 (Rossow, 1995). 또한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 태반을 통해 태축에 감염되어 유산된 태축에서는 특별한 병변을 관찰할 수 없으나 (Collins 등, 1992), 임신 45-49일령사이에 실험적으로 감염시킨 경우 폐장에의 광범위한 출혈과 bronchial bud의 변성과 괴사 등의 병변을 관찰할 수 있다고 보고되어 있다 (Lager 등; 1994). 간질성 폐렴이 관찰되는 자돈의 폐장조직에서 조직내 교잡법에 의해 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 RNA를 검출해 본 결과 7두의 자돈에서 모두 양성 반응을 관찰할 수

있었으며 양성반응이 관찰되는 세포는 폐포 대식구, 비후된 폐포벽에 침윤된 대식구와 이형 폐포세포로 이들 세포에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 증식하는 것을 확인하였으며 이는 면역조직화학기법이나 조직내 교잡법을 통한 실험에서 확인된 바이러스의 증식부위와 일치한다 (Halbur 등, 1994; Halbur 등, 1995b; Halbur 등, 1996; Rossow 등, 1996; Sur 등, 1996; Chelle 등, 1996). 다만 양성반응이 관찰된 세포의 종류에 대해서는 그 세포에 대한 marker를 이용한 면역염색이나 전자현미경 관찰을 통해 더 조사해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다.

조직내 교잡법은 조직중에 검출하고자 하는 유전자에 상보적으로 결합하는 probe를 사용하여 원인체를 검출하는 방법으로 원인체의 유전자에 의해 발현되는 구조 단백을 검출하는 면역조직화학적 기법과 비교하여 볼 때 급성감염시에는 그 민감도가 비슷하나 질병이 만성으로 지속감염되는 돼지 생식기 호흡기 증후군과 같은 질병의 경우에는 바이러스가 활동적으로 증식하지 않는 경우 바이러스가 구조단백을 발현하지 않거나 가령 발현한다고 하더라도 소량이어서 면역조직화학적 기법으로는 검출이 불가능한 경우에도 조직내 교잡법을 이용하면 검출이 가능하고, 면역조직화학적 기법에 비해 양성반응외에 관찰되는 비특이 반응이 적어 결과를 판독하는 데도 더 용이한 장점이 있다 (Sur 등, 1996).

따라서 실험감염과는 달리 자연감염된 경우에 있어서는 그 감염시기가 다양하고 일반 부검시 사용하는 고정액인 중성 포르말린은 cross linking하여 세포를 고정하는 고정액으로 면역염색시 단크론 항체가 결합하는 epitope을 block하여 단크론 항체와의 결합을 방해할 수 있으며 반면 중성 포르말린이 유전자의 고정에는 다른 고정액보다 우수한 것으로 알려져 있어 자연감염시 일반적인 조직처리과정을 거친 조직에는 면역조직화학적 기법보다는 조직내 교잡법을 이용하는 것이 더 정확한 것으로 생각된다 (Chelle 등, 1996). 그러나 조직내 교잡법은 면역조직화학적 기법에 비해 그 과정이 복잡하고 DNase나 RNase의 오염을 피하기 위해 더욱 세심한 주의가 필요하다는 단점이 있다.

## 5. 국내분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 면역조직화학법 및 조직내 교잡법을 이용한 경시적인 바이러스의 분포양상에 관한 연구

### 가. 임상증상

국내 분리주인 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 24두의 자돈은 접종후 1일째에 약간의 식욕 부진 증세를 보였고 개체에 따라 약간의 차이는 있으나 접종후 1일에서 5일사이에 가벼운 호흡곤란증세를 보였으나 그 밖에 특별한 증상을 나타내지는 않았으며 접종후 실험이 종료되는 28일째까지 폐사된 자돈은 없었다.

### 나. 자돈에서의 바이러스분리 및 역전사 중합효소연쇄반응결과

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 국내분리주를 접종하여 경시적으로 접종후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일, 27일에 부검을 실시하여 각각 자돈 폐장에서 바이러스의 분리와 핵산을 추출하여 역전사 중합효소연쇄반응을 수행한 결과 바이러스를 접종한 접종군 24두의 자돈의 폐장에서 바이러스가 분리되었으며 바이러스의 핵산도 접종후 28일령의 접종자돈에서 모두 확인되었다. 바이러스대신 세포배양액을 접종한 음성대조군의 자돈에서는 바이러스분리 및 역전사 중합효소연쇄반응 결과 모두 음성이었다.

### 다. 자돈에서의 육안병변 및 병리조직학적 병변 관찰

바이러스를 감염시킨 자돈을 접종후 경시적으로 부검하여 전신장기에 대해 육안 병변 및 조직병리학적 병변을 관찰한 결과 폐장에서의 병변외에는 다른 장기인 간장, 신장, 소장, 임파장기등의 전신장기에서는 특별한 병변을 보이지 않았다. 폐장의 경우 육안적으로 접종후 3일령의 돼지부터 개흉후 폐장의 퇴축이 불완전하고 경도가 증가하였으며 폐장의 색조는 정상의 분홍색조보다 좀더 둔탁한 분홍색조를 보였다. 육안적 병변의 정도는 접종후 10일령 및 14일령의 폐장에서 가장 심하였으며 접종후 28일령에서는 병변이 많이 완화되는 경향을 나타내었다.

폐장에서 조직병리학적병변은 입과구와 대식구계통의 세포의 침윤으로 인한 폐포벽의 비후가 주된 병변이었으며 그 외에 약간의 이형 폐포세포의 증식과 기관지강이나 폐포강내에서의 괴사성 삼출물도 약간 관찰되었다. 이러한 바이러스의 감염으로 인한 폐장에서 병변은 접종후 1일령에는 거의 미약하여 관찰할 수 없었으나 감염후 3일령에서부터 현저히 비후된 폐포벽을 관찰할 수 있었으며 접종후 14일까지 병변의 정도는 심해졌고 그 후 14일령 이후로는 병리학적 병변은 감소되었으나 접종후 28일령까지 병변은 소멸되지 않고 관찰되었다.

#### 라. 자돈에서 면역조직화학기법을 이용한 바이러스의 항원분포관찰

국내분리주의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 실험접종한 접종군의 자돈에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 nucleocapsid 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론 항체인 SDOW17을 이용하여 면역조직화학염색을 시행하여 바이러스를 감염시킨 자돈의 전장기에 대해 바이러스의 항원의 분포를 조사한 결과 폐장에서는 접종후 1일째부터 바이러스의 항원이 검출되기 시작하여 실험이 종료되는 접종후 28일까지 바이러스의 항원이 지속적으로 검출되었다. 한편 폐 (Fig. 5)이외의 장기에서는 편도, 흉선, 입과절, 비장, 소장의 Peyer's patch등에서 바이러스의 항원이 검출되었으며 그외의 간장 (Fig. 6)과 신장, 부신등의 대식구계통의 세포에서도 바이러스의 항원을 검출할 수 있었다. 이들 장기에서 바이러스의 항원이 관찰되는 세포는 각 장기의 대식구계통의 세포가 주를 이루었으며 그외에 폐장에서는 폐포강에 인접하는 폐포세포로 추정되는 세포의 세포질에서 바이러스의 항원을 관찰할 수 있었다. 바이러스가 주로 증식이 이루어 지는 폐장의 경우 바이러스의 항원이 접종후 1일째부터 실험종료시인 접종후 28일째까지 검출되는 것에 반해 편도, 입과절등에서는 바이러스의 항원이 접종후 3일째부터 검출되기 시작하여 대개 접종후 21일째 까지 검출되었으며 흉선과 비장, 소장의 Peyer's patch등에서는 접종후 3일부터 5일 또는 7일까지 짧은 기간동안만 바이러스의 항원을 검출할 수 있었다. 그 밖의 신장 및 간장, 부신등의 대식구계통의 세포에서는 감염후 3일이나 5일째에 한시적으로 바이러스의 항원을 검출할 수 있었다. 조직내에서의 바이러스항원 분포정도는 폐장의 경우 감염후 3일에서부터

증가하기 시작하여 감염후 7일에서 10일사이에 항원분포가 가장 많이 관찰되며 14일령 이후로 갈수록 바이러스 항원의 분포는 감소하는 추세를 보였다 (Table 4).

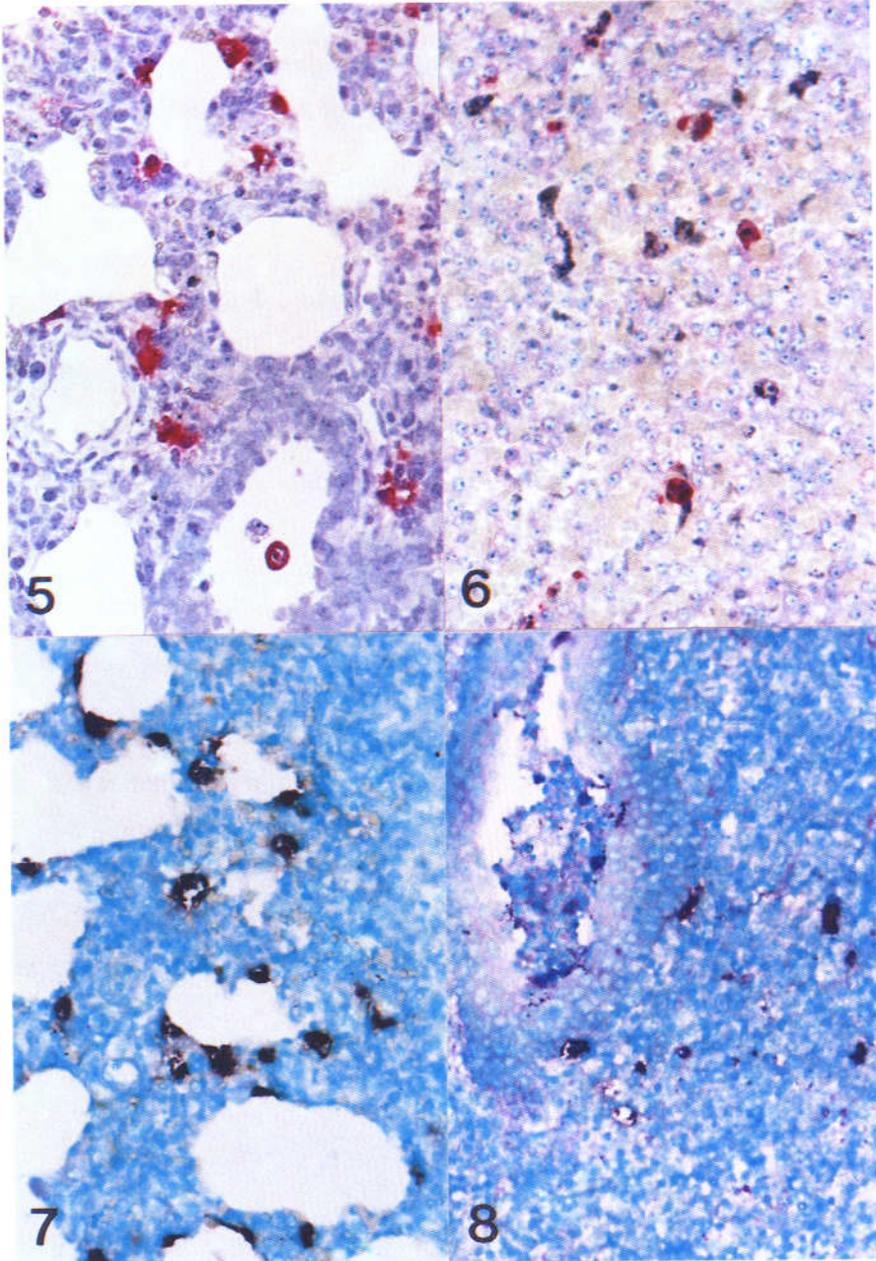
마. 자돈에서 조직내 교잡법을 이용한 바이러스의 핵산분포관찰

국내분리주의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 실험접종한 접종군의 자돈에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 nucleocapsid gene에 특이적인 염기서열을 이용하여 제작된 primer에 반응하는 역전사 중합효소연쇄반응을 이용하여 얻은 핵산의 증폭물을 비방사선물질인 digoxigenin으로 표지하여 만든 cDNA probe를 이용하여 바이러스를 감염시킨 자돈의 전장기에서 조직내 교잡법을 실시한 결과 폐장에서는 접종후 1일째부터 바이러스의 특이적인 핵산이 검출되기 시작하여 실험이 종료되는 접종후 28일까지 바이러스의 핵산이 지속적으로 검출되었다. 한편 폐 (Fig. 7)이외의 장기에서는 편도 (Fig. 8), 흉선, 임파절, 비장, 소장의 Peyer's patch등에서 바이러스의 핵산을 검출할 수 있었다. 그 외의 간장과 신장, 부신등의 대식구 계통의 세포에서도 바이러스의 핵산이 검출되었다. 특히 바이러스의 주된 표적장기인 폐장의 경우 바이러스의 핵산이 접종후 1일째부터 접종후 28일째까지 검출되었으며 핵산의 검출정도는 감염후 1일째에는 바이러스의 핵산이 폐장의 4개 엽에서 전반적으로 미약하게 관찰되었고 감염후부터 바이러스의 핵산이 검출정도가 증가하기 시작하여 감염후 7일째나 또는 감염후 10일째에 핵산의 검출이 가장 증가하였으며 그 이후로 바이러스의 핵산이 검출되는 것이 감소하기 시작되었고 면역염색과 마찬가지로 감염후 42일째에는 바이러스의 핵산을 검출할 수 없었다. 그 밖의 장기에서는 임파장에서 바이러스의 핵산이 감염후 3일에서 21일사이에 검출되며 핵산의 검출정도는 감염후 5일째에 가장 최고조로 관찰되었다. 바이러스의 핵산이 검출되는 세포는 폐장의 비후된 폐벽에서 관찰되는 간질성대식구와 폐포강내에서 존재하는 폐포대식구, 그리고 폐포강에 인접한 일형이나 이형폐포세포등의 실질세포의 세포질에서도 바이러스의 핵산이 검출되었다. 폐장이외의 임파장기 및 간장, 신장, 부신등의 실질장기에서는 실질세포에서는 바이러스의 핵산이 검출되지 않았으며 주로 실질세포외의 대식구 계통인 단핵구세포의 세포질에서 바이러스 핵산이 검출되었다 (Table 4).

Table 4. Immunohistochemical and in-situ hybridization results in pigs experimentally infected with PRRSV

| Tissues         | Positive pigs(in groups of 3) demonstrated by the stated method(IHC or ISH) on post-inoculation day |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Total positive  |     |
|-----------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----|
|                 | 1   |     | 3   |     | 5   |     | 7   |     | 10  |     | 14  |     | 21  |     | 28  |     | pigs(out of 24) |     |
|                 | IHC   | ISH | IHC | ISH | IHC | ISH | IHC | ISH | IHC | ISH | IHC | ISH | IHC | ISH | IHC | ISH | IHC             | ISH |
| Lungs           |   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |                 |     |
| cranial lobe    | 3   | 3   | 2   | 3   | 1   | 0   | 3   | 2   | 3   | 3   | 3   | 2   | 3   | 3   | 3   | 3   | 21              | 19  |
| middle lobe     | 3   | 3   | 2   | 2   | 3   | 3   | 3   | 2   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 2   | 3   | 3   | 23              | 21  |
| caudal lobe     | 3   | 3   | 2   | 3   | 3   | 3   | 3   | 2   | 3   | 3   | 2   | 2   | 2   | 2   | 3   | 2   | 20              | 20  |
| accessory lobe  | 3   | 3   | 2   | 3   | 3   | 3   | 3   | 1   | 3   | 3   | 3   | 2   | 2   | 2   | 3   | 3   | 22              | 20  |
| Heart           | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0               | 0   |
| Mediastinal LN  | 0   | 0   | 1   | 1   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 2   | 2   | 2   | 0   | 0   | 15              | 14  |
| Tonsil          | 0   | 0   | 2   | 2   | 3   | 3   | 2   | 2   | 1   | 3   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 10              | 12  |
| Thymus          | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 1   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 3               | 2   |
| Spleen          | 0   | 0   | 1   | 2   | 3   | 3   | 0   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 4               | 6   |
| Small Intestine | 0   | 0   | 1   | 1   | 2   | 2   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 3               | 3   |
| Liver           | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1               | 1   |
| Kidney          | 0   | 0   | 0   | 1   | 3   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 3               | 2   |
| Adrenal         | 0   | 0   | 0   | 0   | 1   | 1   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1               | 1   |

IHC, immunohistochemical examination; ISH, in-situ hybridization.





## Legends for Figure

Figure 5. Lung from piglet inoculated with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain SNUVR970501; 7 days postinoculation (dpi). PRRSV antigen was detected immunohistochemically within the cytoplasm of interstitial macrophages in the thickened alveolar septa. Positive signals are seen as red grains. Haematoxylin counterstain. x200.

Figure 6. Lung from piglets inoculated with PRRSV; 14 dpi. Positive hybridization signals for PRRSV nucleic acids occur within the cytoplasm of interstitial macrophages in the thickened alveolar septa. Hybridization signals are seen as black grains. Methylgreen counterstain. x200.

Figure 7. Tonsil from piglet inoculated with PRRSV; 3 dpi. Positive hybridization signals for PRRSV nucleic acids occur within the cytoplasm of cells resembling to dendritic cells, and large macrophages within the lymphoid follicle. Hybridization signals are seen as black grains. Methylgreen counterstain. x200.

Figure 8. Liver from piglet inoculated with PRRSV; 5 dpi. PRRSV antigen was detected immunohistochemically within mononuclear cells. Positive signals are seen as red grains. Haematoxylin counterstain. x200.

바. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 자돈에서 전신림파절에서의 바이러스의 경시적인 분포에 대한 관찰

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 16두의 자돈에 대해 전신의 림파절중 8개의 주요한 림파절에 대해 면역조직화학기법 및 조직내 교잡법을 이용하여 바이러스의 분포양상을 살펴본 결과 바이러스의 항원 및 핵산은 접종후 3일째부터 일부의 림파절에서 관찰되기 시작하였으며 접종후 5일째에는 검사를 시행한 8개의 림파절에서 조직내 교잡법을 통하여 바이러스의 핵산을 확인할 수 있었다. 접종후 5일째에는 감염된 자돈의 8개의 모든 림파절에서 바이러스의 증식이 확인되었을 뿐만아니라 바이러스의 증식의 정도도 가장 활발한 것으로 확인되었다. 접종후 10일째의 자돈에서는 일부의 림파절에서부터 바이러스의 항원 및 핵산이 소실되기 시작하였으며 21일째까지 일부 한 두 개의 림파절에서 바이러스의 증식이 확인되었고 28일째부터는 전신의 림파절에서 바이러스의 항원 및 핵산을 확인할 수 없었다.

Table 5. Distribution of PRRSV in several lymph nodes of piglets experimentally infected with Korean isolate SNU 970501 PRRSV

| Lymph node/Group       | 1 dpi |     | 3dpi |     | 5dpi |     | 7dpi |     | 10dpi |     | 14dpi |     | 21 dpi |     | 28dpi |     |
|------------------------|-------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|-----|
|                        | IHC   | ISH | IHC  | ISH | IHC  | ISH | IHC  | ISH | IHC   | ISH | IHC   | ISH | IHC    | ISH | IHC   | ISH |
| Madibular LN*          | 0/2   | 0/2 | 1/2  | 2/2 | 2/2  | 2/2 | ND   | ND  | 1/2   | 1/2 | ND    | ND  | 1/2    | 0/2 | 0/2   | 0/2 |
| Axillary ln            | 0/2   | 0/2 | 1/2  | 1/2 | 0/2  | 1/2 | ND   | ND  | 0/2   | 0/2 | ND    | ND  | 1/2    | 0/2 | 0/2   | 0/2 |
| Trachiobroncheal ln    | 0/2   | 0/2 | 0/2  | 0/2 | 1/2  | 2/2 | ND   | ND  | 1/2   | 2/2 | ND    | ND  | 1/2    | 0/2 | 0/2   | 0/2 |
| Mediastinal ln         | 0/2   | 0/2 | 2/2  | 2/2 | 2/2  | 1/2 | ND   | ND  | 2/2   | 2/2 | ND    | ND  | 0/2    | 0/2 | 0/2   | 0/2 |
| Mesenteric ln          | 0/2   | 0/2 | 1/2  | 1/2 | 2/2  | 2/2 | ND   | ND  | 0/2   | 1/2 | ND    | ND  | 0/2    | 0/2 | 0/2   | 0/2 |
| Medial iliac ln        | 0/2   | 0/2 | 2/2  | 2/2 | 1/2  | 1/2 | ND   | ND  | 2/2   | 2/2 | ND    | ND  | 1/2    | 1/2 | 0/2   | 0/2 |
| Supeficial inguinal ln | 0/2   | 0/2 | 1/2  | 2/2 | 2/2  | 2/2 | ND   | ND  | 0/2   | 0/2 | ND    | ND  | 1/2    | 1/2 | 0/2   | 0/2 |
| Reteropharyngeal ln    | 0/2   | 0/2 | 0/2  | 0/2 | 0/2  | 1/2 | ND   | ND  | 1/2   | 2/2 | ND    | ND  | 0/2    | 0/2 | 0/2   | 0/2 |

\* LN=lymph node

돼지 생식기 호흡기 증후군은 주된 감염연령인 포유자돈 및 이유자돈에 감염시에 감염후 즉시 폐장의 간질성 대식구 및 폐포대식구와 그 밖의 기관지

주위에서 관찰되는 임파조직등의 대식구 계통의 세포에서 일차적으로 증식이 이루어지며 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 감염의 특징인 바이러스 혈증이 유발되어 폐장이외의 편도, 전신의 임파절, 간장, 비장, 신장, 부신, 심장, 소장등의 전신장기의 대식구 계통의 세포에 감염된다. 그리고 이러한 대식구 계통의 세포외에도 폐장에서 폐포세포나 기관지 상피세포, 심장의 내피세포등의 세포에서도 바이러스의 감염이 면역조직화학염색이나 조직내 교잡법을 통해서 확인되었다. 그러나 이번 접종실험에서는 폐장 및 신장, 비장, 간장, 부신등의 대식구 계통의 세포와 폐장에서 폐포벽에 인접한 이형 폐포세포로 생각되는 세포에서만 바이러스의 감염 및 증식을 확인할 수 있었으며 폐장의 기관지 상피세포 및 다른 장기의 혈관내피세포등에서는 바이러스의 감염을 확인할 수 없었다. 이러한 실험결과로 이 실험에 사용한 국내 분리주인 SNU970501는 감염후 주로 폐장에서만 주로 증식이 이루어 지는 것으로 확인되었다. 또한 바이러스 감염후 면역조직화학법과 조직내 교잡법을 이용하여 경시적으로 바이러스의 분포양상을 알아본 결과 바이러스는 감염후 1일째의 자돈에서부터 실험종료시인 28일령까지 모든 장기중 가장 마지막 까지 바이러스의 증식이 확인되어 폐장이 바이러스의 지속감염과 가장 관련이 있음을 알 수 있었다.

임파조직중 일부의 임파절에서는 다른 장기에서 보다는 늦은 시기인 접종 후 21일째까지 바이러스의 증식이 확인되어 임파절도 지속적인 바이러스의 혈증과 관계가 있어 임파절에서의 바이러스의 증식 및 분비도 바이러스의 지속감염에 어느정도 역할을 할 것으로 사료된다. 폐장 및 임파절, 편도등의 임파장기를 제외한 간장,신장, 부신등의 실질장기에서는 바이러스감염후 가장 활발하게 바이러스 혈증이 유발되는 시기인 감염후 3일에서 5일사이정도에만 바이러스의 감염이 확인되어 이들 장기에서는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 국내분리주가 증식하여 병변을 일으킨다기 보다는 바이러스혈증에 의해 전신을 순환하던 바이러스가 각 장기의 대식구 계통의 세포에 탐식되어 그 세포에서 일부 증식하고 있던 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에 사용한 국내 분리주는 주로 감염후 폐장에서 일차 증식한 후 다른장기로 바이러스혈증을 통해서 이동하여 그 장기의 대식구 계통의 세포에서 감염이 이루어 지지만 그 지속기간이 길지 않으며 주로 폐장에 국한되어 병변을

일으키는 것으로 확인되었다. 또한 감염 후 28일 이후까지 병리조직학적 병변의 관찰 및 면역조직화학법 및 조직내 교잡법을 통하여 심장에서의 병변 및 바이러스의 분포를 살펴본 결과 심장에서는 바이러스의 감염에 의한 특이적인 병변이나 바이러스감염 및 증식이 확인되지 않아 실험에 사용한 국내분리주는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 만성감염시의 특징인 심장에서의 감염 및 병변의 형성은 이루어지지 않는 것으로 생각되었다. 실험결과 바이러스 혈증은 감염후 14일을 경계로 하여 감소되는 추세를 보여 감염후 7일이후에는 일부 편도 및 임파절을 제외한 전신의 장기에서 바이러스의 감염을 확인할 수 없었다.

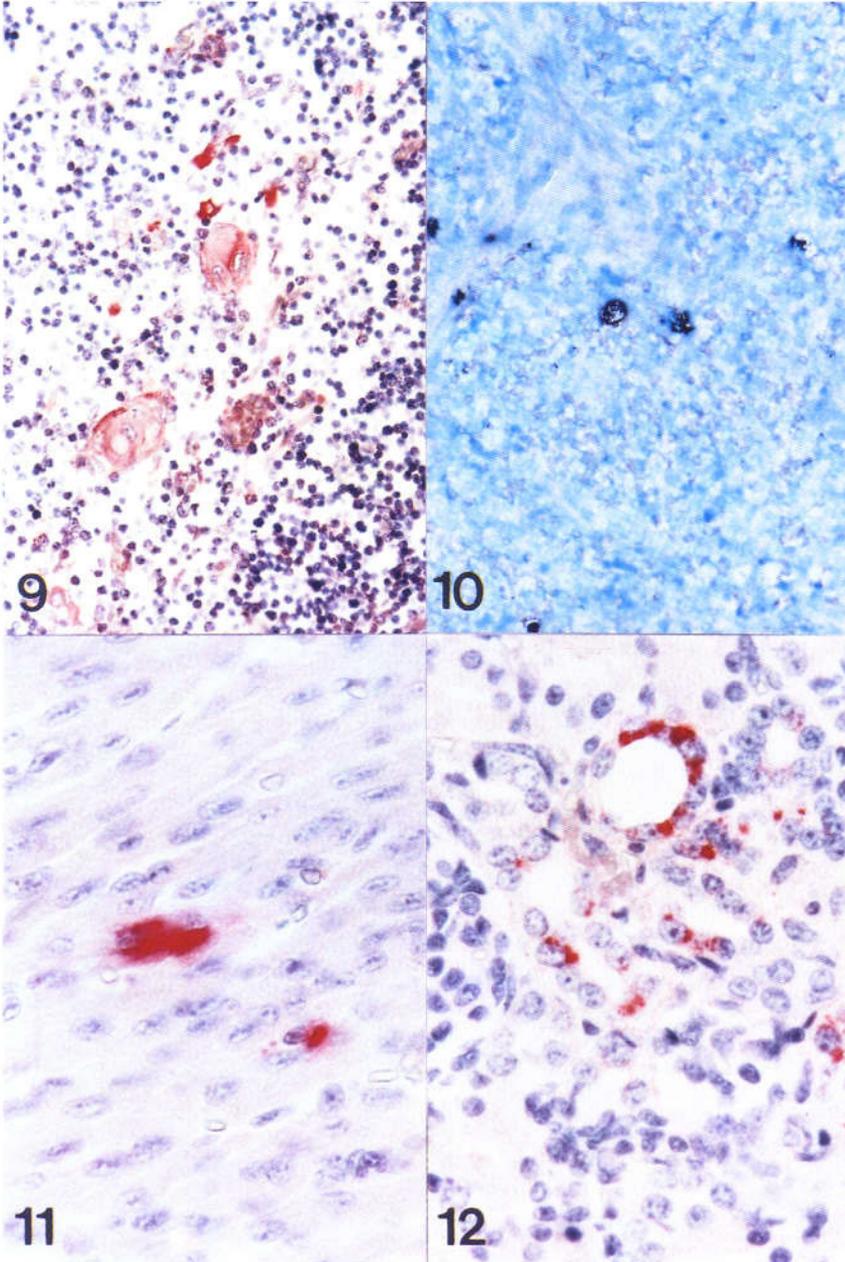
본 실험은 국내 분리주를 대상으로 한 자돈에서의 경시적인 병변의 변화 및 바이러스의 조직내 분포양상의 변화를 살펴보는 실험으로 국내에서의 분리주에 대한 병원성 및 병인론에 대한 최초의 연구이다. 이상의 실험으로 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 자돈감염시 병인론을 요약하면 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 일반적인 감염경로인 호흡기를 통하여 감염되며 일차적으로 폐장의 간질성 대식구와 폐포 탐식 대식구등과 편도의 임파조직중에 있는 대식구 계통의 세포에서 일차증식한 후 감염후 3일정도 후에 바이러스혈증이 유발되어 전신의 장기로 이동한다. 그리고 이러한 바이러스 혈증은 바이러스의 친화성있는 세포계열인 혈액중의 단핵구에 의해 이루어 지는 것으로 짐작된다. 그러나 바이러스가 가장 친화성이 높아 증식이 활발하게 일어나는 세포는 폐장의 대식구 계통의 세포이며 이러한 원인이 바이러스가 감염후 오랜동안 폐장에서 증식할 수 있는 여건을 제공하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 감염의 특징인 지속감염을 유도하며 폐장에서의 바이러스의 지속감염으로 인한 폐장에서의 면역체계의 변화와 cytokine등의 분비양상의 변화등으로 이유자돈연령에서 감수성이 있는 *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*등의 감염의 기회를 증가시켜 이유자돈의 성장률의 저하와 폐사율의 증가에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 생각된다.

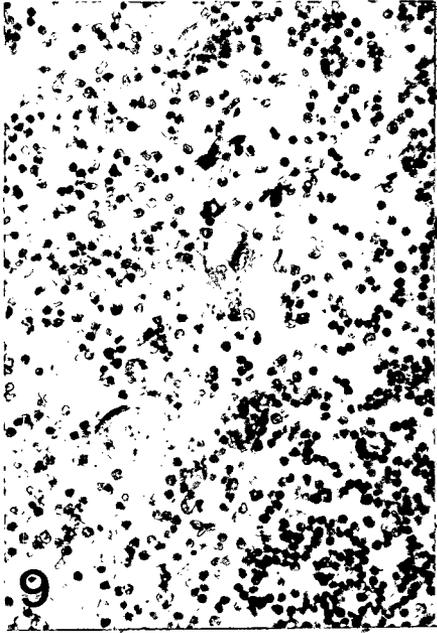
## 6. 자연감염된 유산된 태자에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 분포

돈군내에서 모든의 집단적 혹은 산발적인 유산으로 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스감염의 진단을 위해서 의뢰된 유산태자에 대해 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하여 양성으로 판정된 9건의 유산태자 샘플에서 바이러스분리를 시도하여 9건중 7두의 유산태자에서 바이러스를 분리하였다.

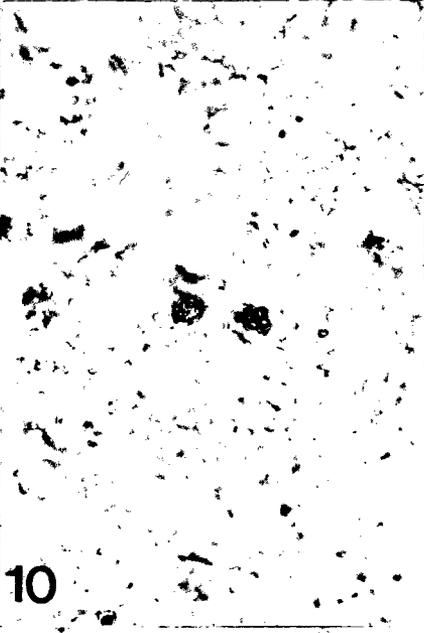
유산된 9건의 유산태자에 대해 일반적인 조직병리학적 검사를 시행한 결과 일부의 유산태아에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염증에서 비특이적으로 관찰되는 태아의 탯줄에서 관찰되는 일부부위의 출혈병변외에 전신의 장기에서 육안적 및 조직병리학적으로 특별한 병변은 관찰되지 않았다.

돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염으로 유산된 유산태아의 조직에서 바이러스의 검출여부나 조직내에서의 바이러스 분포양상을 살펴보기 위해 면역조직화학법 및 조직내 교잡법을 수행한 결과 사산되어 태어난 태자에서는 포유자돈 및 이유자돈에서의 표적장기인 폐장에서는 바이러스의 항원이나 핵산을 검출할 수 없었으며 일부의 임파절과 흉선(Fig. 9), 편도, 비장 (Fig. 10)등의 임파장에서 주로 바이러스를 검출할 수 있었으며 일부 사산태아의 간장의 문맥부위에서 바이러스를 검출할 수 있었다. 유산되어 태어난 유산태자나 정상적으로 분만되었지만 곧바로 폐사하여 폐장으로 호흡을 한 태자의 경우 흉선, 임파절, 비장등의 임파장기외에도 심장 (Fig. 11), 신장 (Fig. 12), 폐장등의 실질장기에서도 바이러스의 항원 및 핵산을 검출할 수 있었다 (Table 6).





9



10



11



12

## Legends for Figure

Figure 9. Thymus from stillborn piglet naturally infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. PRRSV antigen was detected immunohistochemically within the cytoplasm of macrophages in the thymus. Positive signals are seen as red grains. Haematoxylin counterstain. x200.

Figure 10. Spleen from stillborn piglet naturally infected with PRRSV. Positive hybridization signals for PRRSV nucleic acids occur within the cytoplasm of macrophages in the spleen. Hybridization signals are seen as black grains. Methylgreen counterstain. x200.

Figure 11. Heart from stillborn piglet naturally infected with PRRSV. PRRSV antigen was detected immunohistochemically within the cytoplasm of cardiac myocyte. Positive signals are seen as red grains. Haematoxylin counterstain. x200.

Figure 12. Kidney from stillborn piglet naturally infected with PRRSV. PRRSV antigen was detected immunohistochemically within the cytoplasm of renal tubular epithelial cells. Positive signals are seen as red grains. Haematoxylin counterstain. x200.

Table 6. Results of virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction, in-situ hybridization and immunohistochemistry tests for PRRSV in porcine fetal tissues

| Pig no. | Abortion days | Virus isolation | RT PCR | In situ hybridization/Immunohistochemistry results |        |       |        |        |       |        |     |
|---------|---------------|-----------------|--------|--|--------|-------|--------|--------|-------|--------|-----|
|         |               |                 |        | Lung   | Thymus | Liver | Tonsil | Spleen | Heart | Kidney | LN* |
| 1       | 102           | -               | +      | -/-  | -/+    | -/+   | -/-    | -/+    | +/-   | -/-    | -/- |
| 2       | 98            | +               | +      | -/-  | -/-    | -/-   | -/-    | -/-    | +/-   | -/-    | -/- |
| 3       | 115           | +               | +      | +/+  | +/+    | -/+   | -/-    | +/-    | -/+   | -/-    | +/+ |
| 4       | 95            | +               | +      | -/-  | -/-    | -/-   | -/-    | -/-    | -/-   | -/-    | -/- |
| 5       | 114           | +               | +      | -/-  | -/-    | +/+   | -/-    | +/+    | -/+   | -/+    | -/- |
| 6       | 115           | +               | +      | +/+  | -/-    | -/-   | +/-    | +/-    | -/-   | -/+    | -/- |
| 7       | 114           | +               | +      | +/+  | -/-    | -/-   | +/+    | +/+    | +/+   | -/-    | -/- |
| 8       | 102           | -               | +      | -/-  | -/-    | -/-   | -/+    | +/+    | +/-   | -/-    | +/+ |
| 9       | 104           | +               | +      | +/-  | -/-    | -/-   | -/-    | -/-    | -/-   | -/-    | -/- |
| Total   |               | 7               | 9      | 4/3  | 1/2    | 1/3   | 2/2    | 5/4    | 4/2   | 0/2    | 2/2 |

\*LN = lymph node.

돼지 생식기 호흡기 증후군의 감염으로 인한 유산을 진단하기 위해 사용되는 방법은 유산한 모돈의 혈청이나 유산태자의 혈청을 이용한 혈청검사, 유산태자의 조직에서의 바이러스 분리, 유산태자의 폐장조직을 동결절편을 제작하여 형광항체법을 이용한 진단이 사용되고 있다. 본 실험에서 유산태아의 조직에 대해 역전사 중합효소연쇄반응과 면역조직화학염색 및 조직내 교잡법을 이용하여 바이러스의 감염을 확인해 본 결과 역전사 중합효소연쇄반응 양성으로 확인된 9건중에서 7건에서 바이러스를 분리할 수 있었으며 8건의 태자에서는 면역조직화학법이나 조직내 교잡법을 이용하여 바이러스의 감염이 확인되었다. 유산태자에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 감염의 진단이 어려운 이유는 바이러스에 감염된 유산태아가 사산되어 쉽게 자가분해 되므로 유산태아의

조직내에서 바이러스의 항원 및 핵산의 손실이 쉽게 일어나기 때문이다. 실험의 결과에서도 볼 수 있듯이 조직내 교잡법이나 면역조직화학염색을 이용한 진단기법이 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 검사법보다는 민감도가 떨어질 지 모르지만 바이러스의 분리보다는 민감도가 높은 것이 확인되었다. 그러나 바이러스의 분리나 역전사 중합효소연쇄반응을 위한 바이러스의 핵산검출은 고정되지 않은 조직이 필요하므로 이에 대해서는 실험실로 운반되는 하루 정도의 시간동안 검사의 민감도에 영향을 미칠 정도의 감염성의 바이러스 및 바이러스의 핵산에 손실을 감수해야 할 것이다. 반면에 조직내 교잡법이나 면역조직화학법을 위해서는 10% 중성포르말린에 고정된 조직을 이용하므로 농장에서 유산태아의 발생시 곧바로 부검하여 고정한다면 실험실까지 이송하는 데 걸리는 시간동안의 바이러스의 항원 및 핵산의 손실을 최소화할 수 있을 것으로 생각된다.

조직면역화학염색이나 조직내 교잡법을 사용하면 바이러스의 감염 여부뿐 아니라, 바이러스가 분포하는 장기 및 세포의 종류까지 결정할 수 있는 장점이 있어 태장에서의 바이러스에 의한 폐사의 병인론을 밝히는 데 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 물론 돼지 생식기 호흡기 증후군의 감염에 의한 유산에 대해서는 이전의 실험에서 바이러스를 모돈에 접종하여 유산을 유발한 후 유산의 정도나 조직병리학적 기법을 이용한 태아에서의 병변의 양상 및 형광항체법을 이용한 태자조직에서의 바이러스의 확인등의 실험이 행하여 졌으나 여러 접종실험에서 공통적으로 관찰되는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염에 의한 병변은 보고되지 않았으며 각각의 분리주에 대해서 폐장에서의 bronchial bud의 괴사등의 병변 및 임파절에서의 임파구의 괴사, 그리고 제대에서의 출혈을 동반한 혈관염등의 병변이 관찰되었으나 이러한 병변들은 모두 각기 분리주에만 해당되는 병변이며 제대에서 관찰되는 미만성의 출혈병변도 출산시에 기계적인 손상에 의한 것으로 생각되고 있다. 결국 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염으로 인해 자돈에서 관찰되는 병변은 특이적인 병변이 없으며 이 때문에 유산태아에서 어떠한 이유로 태아가 폐사되는 지에 대한 확실한 원인이 밝혀져 있지 않다.

본 실험결과 9건의 유산태아 조직에서 공통적으로 흉선과 비장의

임파구계통의 세포에서 강한 양성반응이 확인되었으며 그 외에 심장의 미성숙한 심근세포와 신장의 세뇨관 상피세포에서도 일부 양성반응이 확인되었다. 그러나 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 원래의 표적장기인 폐장에서는 역전사 중합효소연쇄반응을 통해서 바이러스의 핵산만을 확인할 수 있을 뿐 면역조직화학염색이나 조직내 교잡법을 통해서 폐장에서 바이러스의 항원이나 핵산을 검출할 수 없었다. 이는 태아조직에서는 일반 포유자돈 및 이유자돈에서와는 달리 바이러스의 주된 증식장기가 폐장이 아닌 임파조직계통임을 알 수 있었다. 이것은 일반적으로 자돈이 돼지 생식기 호흡기 증후군의 감염경로인 호흡기를 통한 감염이 아닌 태반감염을 통한 혈행성의 감염이 이루어 지므로 비장과 흉선등에서 바이러스의 증식이 주로 이루어지며 또한 태아에서는 일반자돈과는 달리 폐장의 기능이 확립되지 않은 상태이므로 즉, 호흡을 할 수 없는 상태이므로 폐장이 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염 및 증식에 큰 역할을 하지 않는 것으로 생각된다.

본 실험은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 자연감염되어 유사된 여러 건의 유산태아에서 시행한 검사결과로 이전의 실험에서는 수행하지 않았던 유산태아의 전장기에 대해 바이러스의 분포양상을 조사함으로써 여러 분리주에 대해 공통적으로 바이러스의 감염 및 증식이 이루어지는 장기를 밝힘으로서 바이러스에 의한 태아에서의 변화를 예측할 수 있는 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

## 7. 국내 분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 임신말기 모돈에서의 병원성 실험

국내 분리주 SNU970501 와 SNU980606를 각각 모돈에 접종한 결과 SNU970501를 접종한 4두의 모돈은 접종후 2-3일후에 일시적인 발열과 식욕부진증세를 보였으나 접종후 3주후인 분만일까지 유산을 일으키지 않아 분만예정일에 부검을 실시하여 모돈의 자궁내에서 있는 태아를 관찰해본 결과 일부 태아의 폐사는 관찰되었으나 대부분의 태아는 모두 생존해 있는 것으로 확인되었다.

한편 SNU980606를 접종한 2두의 모돈중 1두의 모돈은 접종후 2일째에 매우 침울해 하고 심각한 식욕부진 증세를 보이다 접종후 9일후에 16마리의 태자를 유산하였으며 16마리의 유산태자는 6마리 유산태자는 생존해 있었으며 나머지 유산태자는 유산당시 폐사해 있었다. SNU980606를 접종한 나머지 한 모돈은 접종후 3일째에 미약한 식욕부진 증세를 보였으며 접종후 17일에 심각한 침울증세를 보이고 접종후 19일째에 2두의 유산하고 5마리의 태아는 조기 분만하고 생존이 가능하였다. 분만후 모돈을 부검하여 본 결과 양쪽의 자궁중 한쪽에만 착상 및 임신이 이루어져 있었으며 나머지 한 쪽 자궁에는 임신이 이루어지지 않았다. 5두의 자돈중 3두의 자돈은 보통의 자돈에 비해 허약하였으며 2두의 자돈은 정상자돈의 상태와 같았다. 이상의 5두의 자돈은 초유를 먹인 후에 모돈과 격리시켜 사육하였으며 출생후 3일, 5일, 7일째에 부검하여 바이러스에 감염된 모돈에서 태반감염을 통해 바이러스에 감염된 태아에서 경시적인 바이러스의 분포를 살펴보기 위해 부검을 실시하였다.

SNU970501를 접종한 모돈에서 부검을 통해 관찰한 태자에서는 바이러스가 분리되지 않았으며 역전사 중합효소 연쇄반응결과 바이러스의 핵산도 검출되지 않았다. SNU980606를 접종한 2두의 모돈에서는 총 23두의 태자를 얻을 수 있었으며 23두의 태자중 사산되어 태어난 12두에서는 4두에서는 바이러스는 분리되지 않았지만 역전사 중합효소 연쇄반응 결과 바이러스의 핵산을 확인할 수 있었으며 나머지 8두에서는 바이러스분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응 실험결과 음성으로 확인되었다. 23두의 태자중 살아있는 태자 6두에서는 6두 모두에서 역전사 중합효소 연쇄반응 결과 바이러스의 핵산이 확인되었으며 이 중 2두에서만 바이러스를 분리할 수 있었다. 한편 조기 분만하여 생존한 5두의 자돈에 대해서는 출생후 곧 바로 채혈하여 혈액중에 바이러스의 존재를 알아본 결과 역전사 중합효소 연쇄반응에서 양성으로 태반을 통하여 바이러스에 감염되어 출생한 것으로 확인되었다. 이 들 5두의 자돈을 사육하여 3일, 5일, 7일에 경시적으로 부검을 실시하여 자돈의 폐장으로부터 바이러스분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 5두에서 모두 바이러스가 분리되었다.

SNU980606를 접종하여 조기분만한 모돈의 경우 한쪽 자궁에만 임신이 이루어져 총 7두의 태자를 임신하였다. 접종한 모돈은 접종후 19일째에 2마리의

태자를 사산하고 나머지 5두의 자돈은 생존하여 초유를 섭취시킨 후 사육하여 경시적으로 부검하여 관찰하였다. 태반을 통하여 바이러스에 감염된 자돈은 호흡기를 통해서 바이러스에 감염된 자돈과 마찬가지로 폐장에서 주된 병변을 나타내었으며 그 외의 장기에서는 특이한 병변이 관찰되지 않았다. 폐장에서 관찰되는 병변은 임파구와 대식구등의 염증세포의 침윤으로 인한 폐포벽의 비후와 기관지강 및 폐포강내의 괴사된 세포들의 침윤등 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스감염시에 관찰되는 일반적인 병변이 관찰되었다.

유산한 모돈과 유산을 일으키지 않은 모돈의 폐장의 간질성 대식구에서 주로 바이러스의 항원이 검출되었으며 폐장이외의 장기에서는 중격임파절과 자궁의 측면에 있는 임파절등 일부의 임파절에서 바이러스의 항원을 확인할 수 있었다. 유산태아에서는 돼지 생식기 호흡기 증후군의 표적장기인 폐장에서는 거의 바이러스의 항원을 확인할 수 없었으며 유산태아의 흉선의 수질부위의 대식구 계통의 세포와 상피세포양의 세포의 세포질에서 바이러스의 항원을 주로 관찰할 수 있었다. 그 외에 일부 태자에서는 흉선의외의 편도에서 바이러스의 항원을 확인할 수 있었다. 조기분만하여 생존한 자돈을 사육하여 경시적으로 부검을 실시하고 부검후 일반적인 전장기에 대해 조직면역화학법을 이용하여 바이러스의 항원분포를 살펴본 결과 바이러스는 태아시기에 바이러스의 항원이 주로 관찰되던 흉선에서 역시 주로 관찰되었으며 그외에 폐장과 비장, 편도등의 대식구 계통의 세포에서 바이러스의 항원이 주로 확인되었으며 그 외에 심장의 심근세포 및 신장의 세뇨관상피 및 사구체의 일부세포의 실질세포에서도 바이러스의 항원을 확인할 수 있었다.

유산한 모돈과 유산을 일으키지 않은 모돈의 폐장의 간질성 대식구 및 폐포대식구와 일부 발적된 임파절에 산재해 있는 대식구 계통의 세포에서 바이러스의 핵산을 확인할 수 있었다. 유산태아에서는 태아의 흉선의 수질부위의 대식구 계통의 세포와 상피세포양의 세포의 세포질에서 바이러스의 핵산이 주로 관찰되었고 항원을 주로 관찰할 수 있었다. 그 외에 일부 태자에서는 흉선의외의 편도와 심장에서 바이러스의 핵산을 확인할 수 있었다. 조기분만한 자돈은 부검후 일반적인 처리과정을 거친 후 전장기의 모든 조직에 대해 조직내 교잡법을 실시하였다. 실험결과 바이러스의 핵산은 흉선과 폐장, 비장의 대식구 계통의

세포에서 주로 관찰되었고 일부의 자돈에서는 편도와 심장에서 바이러스의 핵산을 확인하였다.

호흡곤란을 일으키는 자돈에서 분리한 국내분리주의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스와 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해서 바이러스의 감염에 의해 유산된 것으로 진단된 유산태자에서 분리한 바이러스의 두종류의 바이러스를 분만 3주전의 임신모돈에 각각 접종하여 바이러스에 의한 유산의 유발여부와 바이러스에 감염된 모돈, 유산태아 및 허약자돈에 대해 조직내 교잡법 및 면역조직화학염색을 통하여 조직내에서의 바이러스의 분포양상을 살펴보았다.

실험결과 자돈에서 분리한 국내분리주인 SNU970501를 접종한 4두의 모돈에서는 분만예정일까지 유산이 이루어지지 않았으며 분만예정일에 부검을 실시하여 모돈의 자궁내에 있는 태아를 살펴본 결과 바이러스에 의해 폐사된 것으로 생각되는 태자를 확인할 수 없었다. 반면에 유산태자로부터 분리한 바이러스인 SNU980606를 접종한 2두의 모돈은 접종후 9일과 19일만에 유산을 하였으며 접종후 19일만에 유산한 모돈은 2두를 유산하고 나머지 5두는 조기분만하여 경시적으로 바이러스의 분포를 살펴보았다. 실험결과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 특징중의 하나인 바이러스의 다양한 항원성의 변이에 따른 병원성의 차이를 확인할 수 있었으며 국내분리주인 SNU980606가 실험적으로 임신한 모돈에서 유산을 일으킴으로써 국내에서 문제가 되고 있는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스도 모돈의 유산에서 문제가 되고 있음을 검증할 수 있었다 (Table 7).

Table 7. Comparison of the pathogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in pregnant sows.

| Strains     | No. of Sow | Inoculation Days | Abortion |
|-------------|------------|------------------|----------|
| SNUVR970501 | 4          | 95               | NO       |
| SNUVR980606 | 4          | 95               | Yes      |

유산한 태아에 대해서 바이러스 분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응에 의해 감염된 모돈으로 부터의 태반감염여부를 확인한 결과 역전사 중합효소 연쇄반응의 경우 유산한 태아 18마리중 10마리의 태아에서 바이러스의 핵산을 검출할 있었으나 바이러스의 분리의 경우 2두에서만 바이러스를 분리할 수 있어 상당히 빠른 시간안에 태아의 조직에서 감염성의 바이러스가 불활화된다는 사실을 확인할 수 있었다. 한편 면역조직화학법과 조직내 교잡법을 이용한 바이러스의 감염 및 분포양상의 검사결과 유산한 태아 18마리중 11마리의 유산태아의 흉선으로부터 바이러스의 감염을 확인할 수 있었다. 따라서 면역조직화학염색 및 조직내 교잡법은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염을 진단하는 다른 진단기법에 비해 높은 민감도를 지닌 진단방법이라는 것을 확인할 수 있었으며 또한 두가지 방법을 이용하여 바이러스의 조직내 분포양상을 살펴본 결과 유산태자의 조직에서 바이러스의 감염을 진단하기 위해서는 기존처럼 태자의 폐장조직에 대해서 바이러스분리를 시도하기 보다는 태자의 흉선조직을 이용하는 것이 검사의 민감도를 높일 수 있는 방법이 될 수 있음을 확인하였다.

유산을 일으킨 2두의 모돈 및 유산한 태자, 조기분만한 허약자돈에 대해 바이러스분리 및 바이러스의 조직내 분포양상을 살펴본 결과 모돈에서는 폐장 및 일부 임파절에서 바이러스의 감염이 확인되어 모돈이 접촉한 바이러스에 감염되어 정상적으로 바이러스혈증을 유발한 것을 확인할 수 있었으며 유산한 태자에서 시행한 검사결과는 자연감염되어 유산된 태자에서 시행한 검사결과와 거의 일치하는 양상을 나타내어 태아의 조직에서는 폐장보다는 흉선 및 편도등의 임파장기가

바이러스의 감염에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 확인할 수 있었으며 이들 임파장기에 바이러스가 감염되어 증식하고 지속적으로 이장기에서 감염을 일으키므로 바이러스의 감염으로 인해 폐사되지 않은 태자의 경우 출생시까지 바이러스에 감염된 상태를 유지해주는 지속감염의 감염원으로 판단된다.

또한 태반감염을 통하여 유산되지 않고 바이러스에 감염되어 출생한 자돈에 대해서 경시적으로 바이러스의 분포양상을 살펴본 결과 바이러스는 태아조직에서 관찰되는 바와 마찬가지로 흉선에서도 관찰되었지만 출생후에는 폐장이 기능을 하게되므로 해서 흉선 및 편도등에 일부 지속감염을 일으키고 있던 바이러스가 바이러스혈증에 의해 폐장으로 이동하고 폐장에서 활발하게 증식한 후 다시 비장 및 편도, 심장, 신장등의 전신장기로 다시 바이러스혈증을 통해 전신장기에 감염을 일으키는 것으로 추정된다.

따라서 바이러스에 감염된 모돈에 의해서 유산을 일으키거나 태반감염을 통해 태아가 바이러스에 감염되었을 때 바이러스의 지속적인 감염을 유지하고 태생시까지 바이러스가 불활화되지 않은 상태로 유지할 수 있는데에는 태자의 장기중에 흉선 및 편도등의 임파장기가 주된 역할을 하는 것으로 생각되며 바이러스에 감염되어 출생한 자돈의 경우는 지속적으로 임파장기에 감염되어 있는 바이러스가 폐장에서 다시 한번 활발하게 증식하여 전신장기로 분포되고 바이러스로 인한 병변을 유발하는 것으로 생각되며 이때 태아시절에 감염되어 생성된 바이러스에 대한 태아의 항체도 출생후의 바이러스의 지속감염이 어느정도 일조를 할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과를 실험접종을 통하여 유산을 일으킨 모돈에서 태어난 유산태자의 조직에서 수행한 최초의 바이러스 분포양상에 대한 조사이며 이러한 조사결과는 앞으로 바이러스에 의한 유산태자의 폐사원인을 밝히는 데 중요한 자료로 사용될 수 있을 것이다. 또한 이번 실험에서는 태반감염을 통하여 바이러스에 감염된 유산태자에서 바이러스에 감염되어 출생한 자돈까지의 바이러스의 증식이나 조직분포에 대한 양상으로 돼지 생식기 호흡기 증후군의 태반감염에 이은 자돈의 호흡기증상의 발현 연구에 필요한 자료가 될 것을 사료된다.

# 제 3 장 돼지 코로나바이러스 감염에 대한 방제프로그램

## 제 1 절 서론

돼지 코로나 바이러스성 질병중 porcine epidemic diarrhea (PED)는 다량의 수양성 설사, 수축을 특징으로 하며 transmissible gastroenteritis와는 달리 모든 연령의 돼지에 영향을 미치는 위장관계 질병이다 (Dea et al. 1980; Hofmann et al. 1988; Pensaert et al. 1989; Bernasoni et al. 1995; Carvajal et al. 1995). 이 질병은 성돈에서 폐사율은 낮지만 양돈가에게 중요한 경제적 손실을 야기한다(Carvajal et al. 1995). PED는 1976년에 네덜란드에서 최초로 보고가 된 이후로(Duarte et al. 1994), 많은 양돈국(특히 유럽과 아시아)에서 보고가 되었다(Debouck et al. 1982, Duarte et al. 1994). 원인체는 1978년에 영국과 벨기에에서 보고되었다(Chasey et al. 1978; Pensaert et al. 1978; Carvajal et al. 1995). PED는 fecal-oral route로 전파가 되며 주로 감염동물이나 분변에 오염된 물질의 유입에 의해 발병한다. 그러므로, 동물의 대체가 많은 중대형 농장들에서 감염의 위험이 높다(Carvajal et al. 1995). PED의 원인체는 형태학적 또는 생물학적 성상에서 coronavirus의 특징을 가진다 (Pensaert et al. 1978; Egberink et al. 1988). PEDV는 주로 구형으로 다양한 형태를 가지는 enveloped virus로 지름이 60-200nm정도이다. 표면의 돌기는 12-24nm 정도의 길이로 전 표면에 걸쳐서 퍼져 있다. Egberink et al(1988)은 폴리펩타이드 양상을 기초로 PED의 한 주로서 돼지 CV777분리주의 생화학적인 증거를 제시했다. 반면, PEDV는 두 개의 알려진 돼지 coronavirus (transmissible gastroenteritis virus; TGEV), hemorrhagic enteritis virus (HEV; Kusanagi et al. 1992))와 항원적으로 구별되는 점을 가진다. 특히, 돼지에서 TGE와 PED 바이러스는(Doyle et al. 1946; Hooper et al 1966; Pensaert et al. 1968; Wood et al. 1977; Chasey et al. 1978; Horvath et al. 1981; Turgeon et al. 1981; Dea et al. 1985; Hofmann et al. 1988) 혈청중화반응, 면역형광법, 면역전자현미경법(Duarte et al. 1994)에 의해서 항원적으로

로 연관성을 가지지 않음이 밝혀졌다(Pensaert et al. 1981; Sturman et al. 1983; Hofmann et al. 1988). 그러나, Western blot analysis에서 N, M protein에 연관되어 Coronaviridae에 속하는 세가지 원인체(Feline Infectious Peritonitis Virus(FIPV), TGEV, canine coronavirus(CCV), putative mink coronavirus(MCV))와 약간의 교차 반응이 보고되고 있다 (Pensaert et al. 1981; Zhou et al. 1988; Have et al. 1992; Durate et al. 1994). 임상적으로 신생자돈은 설사, 탈수, 구토 증상을 보이다 수일 내에 사망한다. 성돈은 일시적인 식욕부진을 보이며 모돈에서 때때로 젖의 분비가 감소된다(Sueyoshi et al. 1995) 면역조직화학적으로 PEDV는 TGEV처럼 특히 소장 장세포내에서 증식을 하고 심한 용모위축을 유발한다. PEDV는 TGEV(Hooper et al.)와는 바이러스 증식장소에 명확한 차이가 없다(Sueyoshi et al. 1995). PEDV는 폐에서 검출이 되지 않으므로 porcine respiratory coronavirus와도 구분이 된다(Cox et al. 1990). 실험감염시, 감염량 또는 strain의 병원성에 따라 조직병리학적 증상이 다양하다(Bernasoni et al. 1995; Sueyoshi et al. 1995). 또한, PEDV는 TGEV가 자라는 돼지 고환세포에서는 자라지 않는다. 서로 다른 세포 적응능에도 불구하고 임상증상과 조직병리학적 증상을 근거로 두 질병을 구분하기는 어렵다(Wood et al. 1979; Debouck et al. 1980; Debouck et al. 1981; Turgeon et al. 1981; Dea et al. 1985; Hofmann et al. 1988; Pijpers et al. 1993). 이러한 유사성으로 인해 실험실에서 그 원인체를 구분하는 감별진단이 필요하다(Kusanagi et al. 1992; Pijpers et al. 1993). PEDV의 genome은 single stranded positive(+) RNA로 구성되어 있으며 길이는 약 30,000 nucleotide 정도이다. 그것은 5' end에 cap structure와 3' end에 poly(A) tail을 포함한다. 각 유전자는 subgenomic RNA 합성의 신호로 사용되는 특정 intergenic sequence에 의해 연속된다(Tobler et al. 1996). 알려진대로 coronavirus의 subgenomic RNAs는 genome의 5' end에서 유래하고 각 coronavirus에 특이적인 "the leader"로 알려진 공통적인 5' sequence를 공유한다. 최근에 들어서야 PEDV의 leader sequence가 결정되었다. 추가적으로 genome의 3' end에 근접해 위치하는 약 8,000 nucleotide 길이의 sequence가 보고되었다. 이 부위의 genome(5'→3'순으로)은 표면 glycoprotein 유전자(Tobler et al. 1996)와 아직까지 밝혀지지 않은 산물을 coding하는 open reading frame (ORF3), small membrane

protein (sM), membrane protein (M), nucleocapsid protein (N)를 coding하는 유전자를 포함한다. 이러한 배열 sequence를 기초로 농장에서 임상적 발병기간동안 감염된 자돈에서 획득된 조직 sample에서 genomic과 subgenomic PEDV RNA를 검출하고 특징짓는 reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)법이 개발되었다. Virus의 대부분은 RNA binding nucleoprotein(N, 58kDa)와 두 개의 glycoprotein으로 구성되어진 것으로 추측된다. PEDV 감염세포의 lysates에서 면역학적으로 검출할 수 있는 180-200kDa과 27-22kDa의 현저한 2개의 glycoprotein cluster는 각각 S와 M membrane protein에 대응하는 것으로 생각되어진다. Coronavirus는 matrix 기능을 수행하는 분자량 20-35kDa의 major polydisperse glycoprotein을 가진다. CV777 단백질의 낮은 분자량으로 보아 폴리펩타이드의 glycosylation 정도에 차이가 있는 것을 알 수 있다. 이러한 data들로 CV777은 coronaviridae family의 구성원으로 확신할 수가 있다. 그러나, 면역형광법과 면역전자현미경법으로 major antigenic cluster로부터 다른 coronavirus 들과의 항원적 연관성은 검출되지 않았다. CV777 virus와 FIPV의 nucleocapsid 단백질간의 항원적 연관성 보고되어있다. 일반적으로 PEDV의 초기 발병은 단지 임상증상을 기준으로 진단한다. 그러나 간단한 진단기술의 부재로 돼지에서 설사의 원인체로 유행성설사 바이러스의 감염을 밝히는 것은 매우 중요하다. PEDV감염진단의 한 방법은 세포배양으로 바이러스를 분리하는 것이다. 바이러스는 Vero cell에서만 증식을 하며 일반적으로 trypsin의 존재하에서 여러번의 blind passage가 필요하다. PEDV나 그것의 항체를 검출하는 monoclonal antibody를 이용한 blocking ELISA법과 PEDV의 면역조직화화학적인 연구가 보고되었다. 면역형광법과 면역전자현미경법이 major antigenic cluster의 진단 방법으로 이용되고있다. 최근에는 일부 실험자에 의해 빠르고 특이적인 진단법으로 RT-PCR법이 보고되어지고 있다. 일본에서 1982년에 행한 혈청학적 연구의 결과, 많은 국가에서 PEDV 항체가 존재하는 것이 밝혀졌고, Takahashi. et. al(1992)에 의해 돼지 급성 설사의 발병시 최초로 진단이 되어졌다. 최근에 한국에서 TGEV 백신이 행해진 후, TGE 유사 설사 발병이 유발된 herd에서 한국 PEDV strain인 KPED-9이 Kweon et al. (1991)에 의해 분리되었다. 본 연구는 하리를 보이는 국내돼지의 PEDV항체를 조사하여 그 실태를 조사하고 경쟁적 ELISA법을 개

발하여 돼지의 분변으로부터 항원을 검출하는 기법을 확립하고자 수행 하였다. 또한 새로운 진단법 (분변과 장의 유제를 이용한 specific immune electron microscopy(SPIEM)의 확립과 간접형광항체법 RT-PCR법을 확립하고 한국에서 새로운 PEDV 분리를 위해서 수행되었다. 이러한 기법을 이용하여 초유결핍 자돈에서 새롭게 분리된 PEDV(N-PEDV)의 pathogenecity를 확증하는 PAS 항체와 PEDV의 monoclonal 항체를 이용한 면역조직화학법을 확립하였다.

한편, 돼지 유행성 설사 바이러스 백신을 경구용으로 만들기 위하여 백신을 근육투여한군과 경구투여한 군으로 나누어 비교하고자 하였고 추후에는 제 3절에서 돼지에 감염실험하여 확인한 PEDV를 이용하여 경구용백신을 만들어 안전성 및 효력시험을 하기위하여 본 연구를 수행하였다.이러한 결과를 토대로 경구용 PEDV 백신의 제조를 목표로 본연구를 수행하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 하리자돈의 돼지설사병 바이러스의 항체가 조사 및 항원의 검출

#### 가. 가검물 채취

1996년 1월 부터 6월까지 서울대학교 수의과대학에 반입된 다양한 임상증상을 보이는 돼지로부터 (자돈으로부터 비육돈) 혈청, 소장과 분변재료 100개와 이천 및 제주도 지역의 양돈장으로부터 설사증세를 보이는 돼지로부터 혈청 및 분변을 채취하여 초저온냉동고에 보관하였다 (Table 1).

Table 1. Number of sera collected from pigs necropsied in Seoul National University

| 일련번호  | 개체번호   | 일련번호  | 개체번호   | 일련번호  | 개체번호   |
|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| 66-16 | 5721   | 41-30 | 87-91  | 41-64 | 97-151 |
| 66-31 | 104-51 | 41-31 | 98-69  | 41-65 | 97-160 |
| 66-37 | 5997   | 41-32 | 98-7   | 41-66 | 97-148 |
| 66-46 | 4908   | 41-33 | 97-130 | 41-67 | 98-64  |
| 66-63 | 5755   | 41-34 | 97-79  | 41-68 | 97-64  |
| 41-1  | 97-127 | 41-35 | 98-74  | 41-69 | 97-120 |
| 41-2  | 97-157 | 41-36 | 97-118 | 41-70 | 97-150 |
| 41-3  | 97-62  | 41-37 | 98-67  | 41-71 | 98-88  |
| 41-4  | 97-95  | 41-38 | 97-144 | 41-72 | 97-139 |
| 41-5  | 97-143 | 41-39 | 98-79  | 41-73 | 98-4   |
| 41-6  | 98-81  | 41-40 | 97-183 | 41-74 | 98-89  |
| 41-7  | 97-84  | 41-41 | 97-150 | 41-75 | 98-73  |
| 41-8  | 97-132 | 41-42 | 97-108 | 41-76 | 97-85  |
| 41-9  | 98-66  | 41-43 | 97-167 | 41-77 | 98-1   |
| 41-10 | 97-141 | 41-44 | 97-30  | 41-78 | 97-197 |
| 41-11 | 97-74  | 41-45 | 104-12 | 41-79 | 97-166 |
| 41-12 | 97-152 | 41-46 | 97-102 | 41-80 | 98-60  |
| 41-13 | 97-163 | 41-47 | 98-78  | 41-81 | 97-149 |
| 41-14 | 97-126 | 41-48 | 97-110 | 41-82 | 97-90  |
| 41-15 | 97-11  | 41-49 | 98-43  | 41-83 | 98-56  |
| 41-16 | 97-135 | 41-50 | 97-129 | 41-84 | 97-92  |
| 41-17 | 97-123 | 41-51 | 97-147 | 41-86 | 97-99  |
| 41-18 | 104-17 | 41-52 | 97-68  | 41-87 | 97-134 |
| 41-19 | 97-165 | 41-53 | 98-57  | 41-88 | 97-176 |
| 41-20 | 97-194 | 41-54 | 97-30  | 41-89 | 97-198 |
| 41-21 | 97-98  | 41-55 | 97-15  | 41-90 | 97-82  |
| 41-22 | 97-155 | 41-56 | 97-113 | 41-91 | 97-106 |
| 41-23 | 97-111 | 41-57 | 97-133 | 41-92 | 97-83  |
| 41-24 | 97-31  | 41-58 | 97-158 | 41-93 | 97-86  |
| 41-25 | 97-162 | 41-59 | 97-103 | 41-94 | 97-128 |
| 41-26 | 97-170 | 41-60 | 97-183 | 41-95 | 97-93  |
| 41-27 | 97-78  | 41-61 | 98-27  | 41-96 | 97-109 |
| 41-28 | 97-174 | 41-62 | 97-157 |       |        |
| 41-29 | 97-121 | 41-63 | 97-81  |       |        |

#### 나. 가검물의 처리

분변은 PBS (pH 7.2)에 20%가 되도록 희석하여 5000rpm으로 30분간 원심하여 상청액을 에펜들프튜브에 넣어 냉동보관하였다.

소장은 PBS에 20%되도록 잘게 세절하여 무게를 달아 넣은후 유리 homogenizer로 분쇄하였다. 5000rpm으로 원심분리를 한다음 상청액을 냉동보관하였다.

#### 다. 표준 바이러스 (CV 777)의 분리

##### 1) 재료

배지에 사용된 재료는 다음과 같다.

EMEM(eagle's minimum essential medium; Gibco, Life Technology Inc.)

TPB(triptose phosphate broth Gibco)

Sodium bicarbonate (Sigma)

Yeast extract (Gibco)

FBS(heat inactivated fetal bovine serum Gibco)

PBS(phosphate buffered saline; Sigma)

DMSO(dimethyl sulfoxideSigma)

Plask(25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>)

Antibiotics (Sigma)

##### 2)Cell line

바이러스배양을 위한 cell line으로는 Vero cell (african green monkey kidney cell)을 사용하였으며 Vero cell의 growth medium (GM)으로는 TPB (2.95g/L), sodium bicarbonate (2.2g/L), FBS (100ml/L)와 antibiotics (3ml)를 함유한 EMEM을 사용하였고 maintenance medium (MM)으로는 TPB (2.95g/L), sodium bicarbonate (2.2g/L), yeast extract (0.2g/L), trypsin-EDTA (10mg/L)과 antibiotics를 함유한 EMEM을 사용하였다. Vero cell은 25cm<sup>2</sup> plask에서 계대하였으며 2×10<sup>5</sup>/plask의 세포를 분주하였으며 바이러스 접종을 위해서 75 cm<sup>2</sup> plask에는 5

$\times 10^5$ /plask를 계대하였다. 일부 세포의 장기간 보존을 위하여 monolayer를 형성한 cell에 trypsin을 처리하고 plask바닥에서 세포가 분리되었을 때 trypsin과 동량의 GM을 첨가하여 1500rpm에서 5분동안 원심분리하여 상청액을 버리고 DMSO를 첨가 (92 : 8)한 GM으로  $1 \times 10^6$ /ml이 되도록 재부유시킨 후 0.04°C에서 1시간, deep freezer에서 3시간동안 서서히 냉동시킨후 액체질소에 보관하였다.

### 3) 바이러스 접종 및 증식

표준 바이러스주는 (CV777) 서울대학교 수의과대학의 채찬희 교수로부터 입수하였다. 바이러스를 접종하기 위하여 75cm<sup>3</sup> 팔콘플라스크에 단층으로 형성된 Vero cell을 PBS로 3회 세척하고 바이러스액을 접종하였다. 접종후 1시간동안 37°C에서 바이러스를 흡수시킨다음 바이러스액을 버리고 PBS로 3회 세정하였다. Trypsin이 포함된 MM을 첨가하여 cytopathic effect (CPE)가 나타날때까지 매일 3-4회 관찰하였다.

### 라. Virus 정제

배양액을 monolayer cell과 함께 회수하고 (약 400ml) 균질화 (Glass homogenizer)한 후 5°C에서 10,000 g로 20분간 원심하여 청정화 (J2-21M/E centrifuge, JA-10 roter, 8,000rpm, Beckman) 시킨 상층액을 얻어내었다.

Sucrose density gradient ultra centrifugation은 다음과 같은 조건으로 실시하였다. 즉, 0.01M PBS에 용해한 60%의 자당 5ml, 20%의 자당 7ml을 을 중첩시킨 원심관(Quick Seal, Beckman)에 약 25ml의 배양상층액을 가하고 밀봉한 후, 140,000xg, 4.5°C, 2시간 동안 원심분리하였다(L8-50 centrifuge, Ty50.2Ti roter, 40,000rpm, Beckman).

원심분리한 배양액은 각각의 분리관 하부를 천공하고 각 2ml씩 분획을 받아내어 합한(Pooling) 후, PBS로 투석하였다.

### 마. 정제분획의 virus 역가 검사

정제분획의 virus 함유량을 알아보기 위하여 효소면역측정법을 사용하였다. 즉, 분획 1, 2, 3 및 4를 50mM carbonate bicarbonate, pH 9.6으로 2배수씩 단계별로

회석하고 ELISA plate (Nunc-Immuno Module, Polysorb U16, Denmark)의 각 well 에 흡착용완충액 (50 mM Carbonate buffer, pH 9.6, containing 0.02% sodium azide) 으로 준비된 회석액을 100  $\mu$ l 씩 분주하고 36 $^{\circ}$ C에서 2시간 및 냉장온도에서 약 16 시간 동안 정치한 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고, 0.1% bovine serum albumin (BSA)이 용해된 PBS 200 $\mu$ l로 냉장온도에서 1시간 봉쇄한 후 증류수로 세척하였다. 흡착된 virus를 확인하기 위하여 수의과학연구소 권창희박사가 작제한 monoclonal anti-PED를 PBS-T로 x100배 회석하여 100 $\mu$ l씩 가하여 실온에 1 시간 반응시켰다. 반응된 항체를 확인하기 위하여 protein A-HRP 및 protein G-HRP (제주대 임윤규교수 작제) 접합체를 PBS-T로 각각 x500배 회석하여 100 $\mu$ l 씩 각 well에 가하여 실온에 30분간 반응시켰다. 발색은 ABTS를 사용하여 405nm에서 흡광도를 확인하였다.

#### 바. 바이러스 항원의 적정 농도 결정

우선 바이러스 항원의 적정 농도를 알아보기 위하여 초원심한후 pooling한 10, 20, 40, 80배로 회석한 바이러스 액을 코팅하고 (냉장 상태에서 overnight), blocking 후 PBS로 3회 세척하여 냉장 보관하며 사용하였다.

공시혈청은 제주 유래로부터의 혈청 (번호 18, 5-20, 5-24)과 이천 종돈장 혈청 (41-30, 36, 77, 56, 49, 44)을 사용하였다. 혈청의 회석은 혈청 회석완충액으로 50배회석하였고 양은 100 $\mu$ l로 정하였다. 반응시간은 실온 30분으로 하였다. 각단계에서 세척은 5회씩하였고 효소접합체는 protein G-HRP와 protein A-HRP를 이용하였다. 효소접합체의 반응시간은 30분으로 하였다. 발색은TNB로 20분간하였다. 흡광도는 405nm (대조파장은 620nm)로 하였다.

#### 사. 돼지 혈청중의 ELISA

음성대조혈청이 없었으므로 혈청번호 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90번의 경우 흡착에 사용된 바이러스액을 5 $\mu$ l 첨가하여 반응시킨값과 비교하였다

#### 아. 공장중의 바이러스검출

증등도의 흡광을 나타내는 혈청으로 ELISA를 실시하되 혈청에 각각의 공장균질화액을 50배 희석되게 가하여 공장액에 바이러스가 있다면 흡착된 바이러스와 경쟁적으로 반응하여 항체를 결합하고 세척시에 제거한다. 이때 OD값은 내려갈 것이다. 바이러스가 없다면 공장액을 넣은 것과 반응의 차이를 나타내지 않을 것이다. 한편 공장액을 가하고 역시 1/50되도록 바이러스액을 추가시킨 시료와 비교하였다.

#### 자. 면역전자현미경 Solid phase immunoelectron microscopy

##### 1) 재료

Protein A (냉장보관)

PBS

PBS-BSA : 0.1% BSA in PBS

PBS-FBS : PBS containing 10% FBS(Gibco)

Anti-PED serum(monoclonal antibody)

1% Glutaraldehyde

2% Phosphotungstic acid(pH 6.8)

##### 2) 방법

Grid는 collodion막이 있는 400mesh grid를 사용하였고 면역전자현미경을 이용하여 virus의 존재유·무를 확인할 수 있는 최상의 조건을 설정하기 위하여 protein A와 anti-serum모두를 PBS로 25배, 50배, 100배가 희석하여 사용하였다. 먼저 각각의 희석된 protein A를 grid에 5분동안 흡착시키고 PBS로 1회 세척하여 세 가지 농도의 anti-serum에 실온에서 10분, 1시간배양한 그룹과 냉장상태에서 4시간 배양한 그룹으로 나누어 실험하였다. antiserum에서 배양이 끝난 grid는 PBS-BSA로 3회 세척하고 virus sample에서 하룻밤 배양시키고난후 다시 PBS로 6회 세척하였다. 1% glutaraldehyde를 이용하여 1분동안 고정과정을 거친후 PBS로 1회 세척하고 D.W로 2회 세척한후 2% phosphotungstic acid로 10초간 염색하여 관찰하였다. 혈청에서 4시간동안 배양할 때를 제외한 모든 과정은 실온에서 진행하였다.

차. 면역전자현미경 관찰- agar method

96well plate에 바이러스를 25ul씩 분주해 놓고 수의과학연구소 권창희 박사로부터 분양받은 항혈청 25ul를 단계희석하여 실온에서 30분간 방치하였다. 반응이 끝난 뒤 각Well에 gold conjugated-protein G를 50배희석하여 25ul씩 첨가하여 냉장에서 4시간 반응시켰다.

반응이 끝난 뒤 각well로부터 1% agar 를 넣어 굳힌 96well plates에 옮겨 1시간동안 diffusion시킨다음 콜로디온막이 코팅된 그리드를 올려놓고 흡착시켰다. 그리드를 꺼내어 negative염색을 하여 전자현미경으로 관찰하였다.

## 2. 간접형광현미경에 의한 돼지유행성 돼지설사병의 진단법

### 가. 바이러스의 계대

본 실험에는 세가지 바이러스주 (야외분리 강독주, 세포배양 약독주, 표준주)를 사용하였다. 1년차에서 배양한 CV777주를 표준주로하여 경합 ELISA에서 양성반응을 보인 공장조직에 대하여 바이러스 분리를 시도하였다. 바이러스배양을 위한 cell line으로는 Vero cell (african green monkey kidney cell)을 사용하였으며 Vero cell의 배지는 첫째 growth medium (GM)으로는 TPB (2.95g/L), sodium bicarbonate (2.2g/L), FBS (100ml/L)와 antibiotics (3ml)를 함유한 EMEM을 사용하였고 maintainance medium (MM)으로는 TPB (2.95g/L), sodium bicarbonate (2.2g/L), yeast extract (0.2g/L), trypsin-EDTA (10mg/L)과 antibiotics를 함유한 EMEM을 사용하였다. Vero cell은 25cm<sup>2</sup> plask에서 계대하였으며 2×10<sup>5</sup>/plask의 세포를 분주하였으며 바이러스 접종을 위해서 75 cm<sup>2</sup> plask에는 5×10<sup>5</sup>/plask를 계대하였다. 일부 세포의 장기간 보존을 위하여 monolayer를 형성한 cell에 trypsin을 처치하고 plask바닥에서 세포가 분리되었을 때 trypsin과 동량의 GM을 첨가하여 1500rpm에서 5분동안 원심분리하여 상청액을 버리고 DMSO를 첨가 (92 : 8)한 GM으로 1×10<sup>6</sup>/ml이 되도록 재부유시킨 후 0.04℃에서 1시간, deep freezer에서 3시간동안 서서히 냉동시킨후 액체질소에 보관하였다.

바이러스 접종을 위해 먼저 monolayer가 형성된 75cm<sup>2</sup> plask에서 배지를

제거한후 PBS로 2회 세척하후 virus표준균주 1ml을 plask에 첨가하고 monolayer전체에 고르게 분산시키고 37°C CO2 incubator에서 1시간동안 흡착시킨후 PBS로 3회 세척하여 찌꺼기를 제거하였다. 그후 MM을 첨가하고 cytopathic effect (CPE)생성을 2시간마다 관찰하였다. 전체 monolayer의 2/3에서 CPE가 형성되었 때 상청액을 취하여 면역전자현미경의 시료로 이용하였고, 나머지 virus는 장기간 보존을 위해서 냉동후 -175°C에 보관하였다. 바이러스 접종을 위해 monolayer를 이룬 100mm flask 20개를 준비하고 배지를 제거한후 PBS로 2회 세척하였다. 각각의 virus strain (야의 분리강독주; G1, 백신주; G2, 표준주; G3)마다 5개의 flask에 1ml/flask씩을 접종하고, 나머지 5개의 flask는 virus를 접종하지 않은채 음성대조군 (N-1)으로 사용하였다.

Virus를 접종한 flask는 37°C, CO2 incubator에서 1시간동안 흡착시킨후 PBS로 3회세척하여 흡착되지 않은 이물을 제거하고 10ml의 maintenance medium을 첨가하여 37°C, CO2 incubator에 1, 2, 3, 4, 5일에 각 군당 1개의 flask를 회수하여 간접형 광염색을 수행하였다.

#### 나. 간접형광항체법

회수한 flask를 PBS로 2회씩 세척하고 trypsin (1ml/flask)을 처치하여 flask에서 cell이 분리되면, 2ml의 growth medium을 첨가하고 cell을 회수하여 2000rpm에서 5분간 원심하였다. 원심후 상청액은 버리고 침전된 cell에 2.5ml의 maintenance medium을 첨가하여 고르게 부유시키고 24well slide glass에 10 $\mu$ l/ml씩 분주한 후 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 12시간 배양하였다.

이때 세포가 흡착된 슬라이드를 회수하여 PBS에 2회 세척하고 100%, cold acetone에 10분간 고정하였다. 고정후 바로 사용하지 않는 슬라이드는 킴와이프에 싸서 -70°C에서 보관하고 사용할 때에 acetone성분을 증발시킨 뒤 간접형광염색에 사용하였다. 냉동된 각 군의 슬라이드의 16개 well에는 30-30 $\times$ 2<sup>15</sup>까지 희석한 마우스 단클론항체를, 나머지 8개의 well에는 정상 마우스혈청(음성대조군2; N-2)을 30-30 $\times$ 10<sup>7</sup>까지 희석하여 37°C oven에서 1시간 반응시켰다. 1차항체와 반응후 400배 희석한 2차항체 (FITC conjugated goat anti-mouse IgG)를 각각의 well에 첨가하고 37°C, incubator에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 슬라이드는 PBS에 희석한 50%

glycerol로 mounting하고 형광현미경으로 관찰하였다.

### 3. 자돈에 대한 새로운 PEDV 분리주의 감염실험

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) PEDV particles from Faeces

모든과정은 4℃에서 수행하였다. 자돈중 수양성하리를 보이는 개체로부터 분변을 수거하여 PBS에 30% emulsion을 만들었다. 분변을 원심 (10,000rpm) 한 다음 상청액을 10 percent PSN (Penicillin, Streptomycin, Neomycin complexes) antibiotics과 섞어 SPIEM으로 관찰하고, 동물접종 및 Vero cell에 접종하였으며 나머지는 -70℃ freezer에 보존하였다.

##### 2) Solid Phase Immune electron microscopy (SPIEM)

동물실험시 접종 virus를 확인하기 위하여 Vero cell에서 증식시킨 바이러스 상청액을 다음과 같은 방법을 이용하여 확인하였다. 방법은 제 1장에서 확립한 방법을 약간씩 수정하며 수행하였다. 즉 grid는 collodion막이 있는 400mesh grid를 사용하였고 면역전자현미경을 이용하여 virus의 존재유·무를 확인할 수 있는 최상의 조건을 설정하기 위하여 protein A와 monoclonal antibody to PEDV 모두를 PBS로 25배, 50배, 100배가 희석하여 사용하였다. 먼저 각각의 희석된 protein A를 grid에 5분 동안 흡착시키고 PBS로 1회 세척하여 세가지 농도의 monoclonal antibody to PEDV에 실온에서 10분, 1시간배양한 그룹과 냉장상태에서 4시간배양한 그룹으로 나누어 실험하였다. monoclonal antibody to PEDV에서 배양이 끝난 grid는 PBS-BSA로 3회 세척하고 virus sample에서 하룻밤 배양시키고난후 다시 PBS로 6회 세척하였다. 1% glutaraldehyde를 이용하여 1분동안 고정과정을 거친후 PBS로 1회 세척하고 D.W로 2회 세척한후 2% phosphotungstic acid로 10초간 염색하여 관찰하였다. 혈청에서 4시간동안 배양할 때를 제외한 모든 과정은 실온에서 진행하였다. 한편 PAS antibody를 이용한 SPIEM을 수행하기 위하여 400mesh copper grids에 collodion membrane 과 carbon으로 막을 입힌뒤, 그리드를 5분동안 gold

conjugated protein G 에 부유시켰다. 그리드를 PBS로 3회 세척하고 filter paper로 여액을 제거하였다. 그 뒤 그리드를 anti-E-tag 및 anti-mouse Ig G, PAS antibody and virus suspension를 50ul 씩 각각 1시간씩 반응 시킨후 overnight반응시켰다. 그런다음 그리드를 PBS 및 증류수에 세정한다음 고정 및 염색후 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 다. Antibody (monoclonal Antibody, PAS antibody)

항체는 수의과학연구소의 권창희 박사로부터 입수하였다.

- 1) PAS antibody: recombinant phage antibody system을 이용하여 작제한 항체로서 180kDa subunit of PEDV를 western blot analysis에서 검출하였다 (Fig. 1).
- 2) mouse anti-PEDV monoclonal antibody: 35kDa subunit of PEDV를 western blot analysis에서 검출하였다.

#### 라. 동물실험

초유를 먹이지 않은 출생직후의 자돈을 Korea Farm (장호원)으로부터 10마리 입수하였다. 동물의 사육은 외부의 병원체에 노출시키지 않고 사육하기 위하여 특수하게 제작한 격리시설을 주문 제작하여 헤파필터가 부착된 positive plastic isolator (Three Shine Co.)에서 26℃로 사육하였다. 사육실내의 풍속을 최소한도로 유지하기 위하여 압력조절장치를 부착하였다. 또한 사육중 일정한 온도를 유지해 주기 위하여 항온장치를 부착하였다. 우유 (CIT Corporation)는 멸균하여 급이하였다. 우유를 용해하기 위한 물 등은 모두 고압멸균하여 전실을 통하여 반입하였고 모든 작업은 외부와 연결된 고무장갑을 통하여 이루어졌다. 7 마리의 자돈에 bacteria-free 30% faecal suspension (바이러스입자가 SPIEM으로 확인됨) (Group I; P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8)를, 1 마리 자돈에 한국에서 분리한 KPEDV (수의과학연구소 권창희 박사로부터 입수) (Group II; P9 as a positive controls)를 그리고 나머지 2마리에는 PBS를 접종하였다 (Group III; P1, P10 as negative control).

#### 마. 병리조직학적 관찰

바이러스를 접종한 후 사망하거나 사망직전 혼수상태의 자돈을 부검하였다. 조직학적 관찰을 위한 조직처리는 stomach, duodenum, jejunum (five pieces taken at some intervals), ileum, the middle of the colon, and the rectum으로 하였다. 조직은 10% phosphate-buffered formalin에 고정 한 후, 포매하여 4 $\mu$ m로 박절한다음, H&E염색을 하였고, jejunum에 대하여는 immunohistochemistry를 실시하였다.

#### 바. Immunohistochemistry

Endogenous peroxidase는 methanol containing 3% hydrogen peroxide for 15mins으로 처리하였다. 10% normal rabbit serum, 5% skim milk and 1% bovine serum albumin mixture로 1hrs 37 $^{\circ}$ C에서 블로킹을 하였다. 1:1000으로 희석한 anti-PAS antibody 또는 단클론항체로 반응시킨후 anti-PAS antibody의 경우에는 E-tag antibody의 반응후 biotinylated horse anti-mouse IgG로 단클론항체의 경우에는 바로 biotinylated horse anti-mouse IgG로 30mins, avidin-biotin complex(ABC) solution으로 30mins반응후 0.01% hydrogen peroxide and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Vector Laboratories)으로 반응시켰다.

### 4. PEDV의 RT-PCR 진단법의 확립

#### 가. RNA isolation from cell line

시료는 control c-1 (장유제;sample 1), normal Vero cell(sample 2), Vero ④ negative (sample 3), Vero ⑤ negative (sample 4),과 추가로 intestine, feces, cell line로 구분하여 Total RNA를 분리하였다. 우선 sample을 30 $\mu$ l DEPC-treated milliQ에 suspended하여 -70 $^{\circ}$ C에 두었다. RNA extraction은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

1) diluted to 1 : 10 in DW

2) RNAsol 사용 → RNA extraction

3) sample (supernatant)을 가지고 RT-PCR

→ 정량 (1/100회석)sample 1, 2, 3, 4와 infected cell RNA를 정량하여 RT-PCR  
을 실시하였다.

나. primer

1) P1

TGA CAG GCA TAA GCA ACA GC

Length ; 20

MW : 6145

OD(260)/ $\mu$ M : 202.8

10D : 4.9nM

Tm : 60°C(Tm : wallace rule)

2) PLength ; 20

ATC TGA GCA TAG CCT GAC GC

MW : 6103

OD(260)/ $\mu$ M : 190.9

10D : 5.2nM

Tm : 62°C(Tm : wallace rule)

3) P3

TTG TGT GCA AGA CCA AGA CC

MW : 6127

OD(260)/ $\mu$ M : 195

10D : 5.1nM

Tm : 60°C(Tm : wallace rule)

다. Reaction

- 1) RNA denaturation (65°C. 5min → ice. 5min)
- 2) add reaction mixture
- 3) microcentrifugation
- 4) incubate at 25°C. 10min ( anneal the primer to the RNA template)
- 5) 42°C. 60min reverse transcribe the RNA into cDNA)
- 6) 95°C. 5min (denature the AMV reverse transcriptase)
- 7) 보관 : 4°C (1-2hr)  
-20°C (for longer)

\* PCR amplification of cDNA

| Reagent            | vol/100 $\mu$ l | final conc             |
|--------------------|-----------------|------------------------|
| 10*reaction buffer | 8 $\mu$ l       | 0.8                    |
| dNTP               | 8 $\mu$ l       | 0.2mM                  |
| primer 1           | 0.81 $\mu$ l    | 0.2 $\mu$ M            |
| primer 2           | 0.76 $\mu$ l    | 0.2 $\mu$ M            |
| Taq polymerase     | 0.5 $\mu$ l     | 2.5u/100 $\mu$ l       |
| milliQ             | 61.93 $\mu$ l   |                        |
| template cDNA      | 20 $\mu$ l      | 1 $\mu$ g/100 $\mu$ ls |

final volume 100  $\mu$ l

\* 조건

| Reaction         | Temp | Time          |
|------------------|------|---------------|
| Denaturation     | 95°C | 2min          |
| Denaturation     | 95°C | 30sec         |
| Annealing        | 57°C | 1min *25cycle |
| Elongation       | 72°C | 1min          |
| Final Elongation | 72°C | 7min          |

## 5. 경구투여용 백신의 안전성 및 유효성 검증

가. 백신의 근육내 접종후 항체가의 추적

### 1) 실험동물

돼지 유행성 설사 항체가 없는 수컷 4주령 돼지 11마리를 대관령의 대신 목장에서 구입하여 서울대학교 수의과 대학 실험동물사육장에서 사육하였다. 사료는 젓먹이용 돼지 사료를 삼양사로부터 구입하여 자유로 섭취시켰으며 음수는 수도수를 자유로 섭취시켰다. 돼지를 일주일간 순화 사육한다음 백신을 투여직전에 돼지의 경정맥으로부터 10 ml의 혈액을 채취하여 ELISA법으로 PEDV의 항체가를 측정하였다.

### 2) 백신주

본 연구에서 사용한 백신주는 모두 수의과학검역원의 권창희 박사가 분리 또는 시판하는 것을 이용하였다.

### 3) 투여 Group의 설정

백신의 투여군은 Table 와 같이 하였다.

| Group   | 돼지 번호       | 백신               | 투여 경로 | 투여 방법  |
|---------|-------------|------------------|-------|--|
| Control | 6, 8, 9, 11 | Control          | 비투여   | • PEDV- 1 vial을 생리식염수 5ml에 녹여 1ml씩 투여<br>• TGEV, Rota- 1 vial을 생리식염수 4ml에 녹여 1ml씩 투여 |
| I       | 2, 3, 5     | PEDV             | 근육 투여 |  |
| II      | 1, 7        | PEDV, TGEV, Rota | "     |  |
| III     | 4, 10       | TGEV, Rota       | "     |  |

### 4) 시험방법 및 관찰 항목

가) 시험방법

#### (1) 백신의 투여

접종전 채혈 후, 생리 식염수에 용해한 백신으로 1차 vaccination을 실시하였다. 1차 백신 2주 후에 boosting을 실시하였으며, 2주 후에 바이러스로 공격시험을

실시하였다. 백신주는 2년차때 분리한 PEDV와 수의과학연구소의 권창희 박사가 분리한 KPED를 비교한후 KPED를 선정하여 투여하였다.

## (2) 공격 시험

수의과학연구소 해외 전염병과에서 얻은 PEDV 분변 3ml(106 TCID50/ml)에 항생제 2ml, PBS 25ml을 섞어 10배 희석 후, 3000 rpm에서 20분간 원심을 돌려 E.coli등의 세균을 제거하였다. 원심 후, 상층액을 취해서 마리당 2.2ml씩 경구투여하였다. 공격시험에서 증상이 없을 경우에는 제 3절에서 분리한 바이러스를 접종하였다.

## (3) 관찰항목

### (가) 임상증상 관찰

시험 기간 중 1일 2회 실시하였다. 시험 백신의 안전성을 시험하기 위해서 일반 임상증상의 발현정도 및 사망율을 기록하였다.

### (나) 체중 측정

백신 및 바이러스의 영향을 조사하기 위해서 투여전, 1차 백신후, 2차 백신 후, 공격시험 후 각각 체중의 변화를 측정하였다.

### (다) 항체가의 관찰

백신의 효과를 측정하기 위해 투여전, 1차 백신 후, 2차 백신 후, 공격시험 후 각각 항체가의 변화를 관찰하였다.

## 나. 백신의 경구 투여후 항체가의 추적실험

### 1) 실험동물

초유를 급여한 생후 1일령 돼지 20마리를 대관령 대신목장으로부터 구입하였다. 동물의 사육은 외부의 병원체에 노출시키지 않고 사육하기 위하여 특수하게 제작한 격리시설을 주문 제작하여 헤파필터가 부착된 positive plastic isolator

(Three shine co.)에서 26℃로 사육하였다. 사육실내의 풍속을 최소한도로 유지하기 위하여 압력조절장치를 부착하였다. 또한 사육중 일정한 온도를 유지해주기위하여 항온장치를 부착하였다. 우유 (CIT Corporation)는 멸균하여 급이하였다. 우유를 용해하기위한 물 등은 모두 고압멸균하여 전실을 통하여 반입하였고 모든 작업은 외부와 여널된 고무장갑을 통하여 이루어졌다.

## 2) 시험방법 및 관찰 항목

### 가) 시험방법

#### (1) 백신의 투여

생후 2일 째에 수의과학검역원의 권창희 박사가 분리한 PEDV 백신주 1ml을 경구투여한 후, 10일 째에 바이러스 공격시험을 실시하였다.

#### (2) 공격 시험

수의과학연구소 해외 전염병과에서 얻은 PEDV 분변 2ml( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml)에 항생제 100 $\mu$ l를 섞고 3,000 rpm에서 10분간 원심을 실시하였다. 원심 후, 0.45  $\mu$ m disk filter로 여과한 다음 PBS로 10배 희석해 2ml씩 경구투여하였다.

### 나) 관찰항목

#### (1) 임상증상 관찰

시험 기간 중 1일 2회 실시하였다. 시험 백신의 안전성을 시험하기 위해서 일반 임상증상의 발현정도 및 사망율을 기록하였다.

#### (2) 체중 측정

백신 및 바이러스의 영향을 조사하기 위해서 투여전, 1차 백신후, 2차 백신 후, 공격시험 후 각각 체중의 변화를 측정하였다.

#### (3) 항체가의 관찰

백신의 효과를 측정하기 위해 투여전, 1차 백신 후, 2차 백신 후, 공격시험 후 각각 항체가의 변화를 관찰하였다.

### 제 3 절 결과와 고찰

#### 1. 하리자돈의 돼지설사병 바이러스의 항체가 조사 및 항원의 검출

##### 가. 바이러스 접종 및 증식

CPE는 CV777 바이러스접종후 2-3일 만에 나타났다. 감염된 세포는 합포체를 형성하였고 세포질에는 다수의 크기가 다양한 공포가 형성되었다. 전 세포의 2/3가 CPE를 보이는 시점에서 감염세포를 배양기로부터 꺼내어 상청액을 수거하여 바이러스 분리용으로 사용하였고 세포는 냉동하여 두었다가 scraper로 긁어 유리 homogenizer로 처리하여 상청액을 바이러스 재료로 사용하였다.

##### 나. 정제분획의 virus 역가 검사

Table 2에서와 같이 분획 3 및 4에 바이러스가 존재함을 알 수 있었다. 한편 마우스 monoclonal anti-PED는 protein G-HRP와의 결합반응이 protein A-HRP의 그것보다 낮은 것으로 나타났다 (Figure 1).

Table.2 ELISA titer of each fractions collected from purified PEDV

| 분획Conjugator<br>혈청희석 | 2pG   | 2pA   | 3pG   | 3pA   | 4pG   | 4pA   |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10x                  | 0.064 | 0.088 | 0.092 | 0.234 | 0.11  | 0.208 |
| 20x                  | 0.058 | 0.09  | 0.085 | 0.182 | 0.085 | 0.156 |
| 40x                  | 0.06  | 0.076 | 0.069 | 0.142 | 0.068 | 0.114 |
| 80x                  | 0.056 | 0.076 | 0.06  | 0.11  | 0.069 | 0.109 |
| X160                 | 0.052 | 0.059 | 0.055 | 0.082 | 0.057 | 0.077 |

다. 바이러스 항원의 적정 농도 결정

흡착희석배수 10배에서 80배까지 직선상으로 나타났기 때문에 10배 혹은 20배의 희석 배수를 선택하여 ELISA를 하기로 결정하였다 (Table 3, Figure 2)

Table. 3 Determination of antigen dilution in ELISA

| 번호<br>희석 | 18    | 5-20  | 5-24  | 30    | 36    | 77    | 56    | 89    | 49    | 44    | PBS-t |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| x10      | 1.215 | 1.694 | 1.267 | 1.279 | 0.732 | 0.967 | 0.682 | 1.086 | 1.106 | 0.84  | 0.042 |
| x20      | 0.772 | 1.336 | 1.947 | 1.006 | 0.591 | 0.81  | 0.564 | 0.885 | 0.843 | 0.692 | 0.046 |
| x40      | 0.603 | 0.945 | 0.767 | 0.798 | 0.505 | 0.6   | 0.436 | 0.638 | 0.712 | 0.488 | 0.035 |
| x80      | 0.305 | 0.591 | 0.49  | 0.507 | 0.3   | 0.368 | 0.258 | 0.341 | 0.366 | 0.307 | 0.051 |

라. 돼지 혈청중의 ELISA Titer

바이러스액으로 경쟁시킨 시료중 50, 60, 70, 80번의 경우 최저 OD값이 약 0.5내외의 값을 보이므로, 적어도 0.5정도수준의 흡광도를 보이는 값 이상은 양성으로 판단되었다. 본 실험은 43번의 경우에만 0.553의 값을 나타내어 미약한 수준의 항체를 보인 것을 제외하면 공히 모두 양성 결과의 결과를 보이고 있다 (Table 4).

Table 4. ELISA titer of pig sera against PEDV

| 혈청<br>번호 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 10+5ul<br>virus* |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| 0        | 1.867 | 1.192 | 1.250 | 1.615 | 1.573 | 1.780 | 0.781 | 0.864 | 1.082 | 1.281 | 0.758            |
| 10       | 0.873 | 1.045 | 1.542 | 1.269 | 1.037 | 1.211 | 1.457 | 1.314 | 1.323 | 1.109 | 0.745            |
| 20       | 1.173 | 0.925 | 1.077 | 1.065 | 1.256 | 1.167 | 0.667 | 0.996 | 0.929 | 1.423 | 1.007            |
| 30       | 0.766 | 1.063 | 1.085 | 1.064 | 1.264 | 0.759 | 0.940 | 0.821 | 0.883 | 1.006 | 0.732            |
| 40       | 1.158 | 1.133 | 0.553 | 0.670 | 0.925 | 1.346 | 1.119 | 0.766 | 1.375 | 0.792 | 0.556            |
| 50       | 1.237 | 1.069 | 0.682 | 1.023 | 1.673 | 1.217 | 0.923 | 1.005 | 0.631 | 0.734 | 0.545            |
| 60       | 0.665 | 0.771 | 0.897 | 0.957 | 1.460 | 0.737 | 0.903 | 1.097 | 0.670 | 0.816 | 0.545            |
| 70       | 0.677 | 0.720 | 1.340 | 0.490 | 1.241 | 0.756 | 0.997 | 0.739 | 0.623 | 0.643 | 0.503            |
| 80       | 1.673 | 1.107 | 0.788 | 1.262 | 0.782 | 0.933 | 1.056 | 0.893 | 1.282 | 0.997 | 0.743            |
| 90       | 1.087 | 1.239 | 1.665 | 1.264 | 0.994 | 1.161 | 1.027 | 0.960 | 1.741 | 0.024 | 0.020            |

\*: 10. 20. 30. 40. 50. 60. 70. 80. 90번 돼지의 혈청과 5ul의 순화 바이러스액을 혼합한 다음 ELISA 항체가

마. 공장증의 바이러스검출

양성혈청의 평균OD 값에서 3배 표준편차 값을 뺀 것보다 낮으면 양성으로 판정하였다. 한편 사용된 혈청은 동일한 혈청이다. 처음에 조사한 결과는 특이성이 없어서 두 번째의 시험을 시도하였다. 그 결과 17, 24, 25, 33, 42번 혈청이 양성으로 판정되어 돼지 유행성 설사병의 바이러스 항원을 가지고 있는 것으로 생각되었다. 36, 39번은 이러한 시스템에서 양성으로 판정하기가 곤란하다. 나머지 시료는 모두 혈청만의 반응값에 대하여 경쟁적인 반응을 보였으므로 바이러스가 함유되어 있을 것으로 생각된다. 두실험의 OD가 틀린 것은 실험조건 (온도등)이 차이가 있기 때문이다 (Table 5).

Table 5. Competitive ELISA for detection PEDV antigen

| 공장번호 | 1회    |       |                | 2회    |       |                |
|------|-------|-------|----------------|-------|-------|----------------|
|      | 혈청    | 혈청+공장 | 혈청+공장<br>+바이러스 | 혈청    | 혈청+공장 | 혈청+공장<br>+바이러스 |
| 1    | 1.378 | 1.222 | 1.202          | 2.223 |       |                |
| 6    | 1.328 | 1.201 | 1.004          | 2.401 |       |                |
| 9    | 1.415 | 1.156 | 1.115          | 2.359 |       |                |
| 12   | 1.385 | 1.195 | 1.103          | 2.476 |       |                |
| 17   | 1.434 | 1.377 | 1.355          | 2.36  | 1.828 | 1.879          |
| 20   | 1.382 | 1.188 | 1.117          | 2.38  |       |                |
| 24   | 1.46  | 1.365 | 1.233          | 2.289 | 1.826 | 1.731          |
| 25   | 1.46  | 1.244 | 1.326          | 2.386 | 1.893 | 1.682          |
| 27   | 1.391 | 1.179 | 1.006          |       |       |                |
| 30   | 1.321 | 1.169 | 0.93           |       |       |                |
| 33   | 1.392 | 1.466 | 1.032          |       | 2.006 | 1.931          |
| 36   | 1.405 | 1.484 | 1.394          |       | 2.119 | 2.219          |
| 39   | 1.454 | 1.523 | 1.322          |       | 2.211 | 2.214          |
| 42   | 1.359 | 1.326 | 1.212          |       | 1.923 | 1.897          |

Mean: 1.393

2.359

STD:0.046

0.071

M-3STD: 1.254

2.147

사. 면역전자현미경 Solid phase immunoelectron microscopy

전자현미경으로 관찰시 20,000배에서 바이러스의 확인이 가능하였으며 그 형태는 원형에 가까웠고, 40,000배의 배율에서는 spike의 관찰이 가능하였다. grid상의 바이러스 분포는 모든 square에서 유사하였다. 일부의 virus는 항체와 결합하지 않은 상태로 관찰되었다 (Fig 1, 2, 3). 25배, 50, 100배 희석된 protein를 사용한 모든 grid에서 virus의 detection에 관여하지 않은 protein A particle도 다수 관찰되었다. 25배, 50, 100배 희석된 antiserum을 사용한 모든 grid에서의 virus 출현양상은 거의 유사하였으나 100배 희석한 antiserum을 사용한 grid에서 가장 깨끗한 상을 관

찰할 수 있었다. Antiserum에서의 배양시간에 의한 영향은 10분배양과 1시간배양에서는 차이가 없었으나 냉장상태에서 4시간을 배양시켰을 때에는 collodion film이 grid에서 분리되어 깨끗한 상을 관찰할 수 없었다. Protein A의 희석은 200배까지도 가능한 것으로 나타났다. Antiserum과의 반응시간은 10분반응과 1시간배양의 차이가 인정되지 않는 것으로 보아 상온에서 10분으로도 충분하였다. 혈청의 희석은 100배가 가장 적당하였다.

#### 아. 면역전자현미경 관찰- agar method

관찰결과 바이러스의 응집은 확실하게 보이지 않았다. 배경에 금입자가 다수 관찰된점으로 보아 염색방법의 문제라기 보다는 항원 항체반응의 경로중 하나가 미비된 것으로 보인다.

## 2. 간접형광현미경에 의한 돼지유행성 돼지설사병의 진단법

### 가. Virus inoculation

야외분리강독주 (G1)와 백신주 (G2)에서는 접종후 1일에는 특이할 만한 변화는 관찰되지 않았으며 시간이 지날수록 부유하는 세포가 증가되는 것을 관찰할 수 있었지만 표준주 (G3)는 접종후 1일에 전형적인 CPE의 생성이 관찰되기 시작하여 접종 5일에는 대부분의 세포가 사망하여 부유함을 관찰할 수 있었다.

### 나. 간접형광항체법

FITC conjugated goat anti-mouse IgG를 이용하여 염색한 슬라이드에 대하여 두가지 종류의 음성대조군 (N-1, N-2)과의 비교분석결과 야외분리강독주 (G1), 백신주 (G2), 표준주 (G3) 모두에서 30×211까지 양성반응을 보였다.

이는 간접형광항체법이 야외에서 분리 정제된 바이러스에 대한 형광항체법이 PED의 진단에 있어 유용한 방법임을 암시하는 것이다.

#### 다. 비특이성의 검정

간접형광현미경하에서 흔히 나타나는 비특이를 확인하기 위하여 1차항체를 PBS로 대치한 것과 생략한 것, 정상혈청으로 대치한 것으로 실험을 하였다. 그 결과 모두 형광이 세포질내에서 확인 되는 것을 알 수 있었다. 이러한 사실은 PED진단에 서 Vero세포를 이용한 간접 형광현미경법이 비특이를 줄이지 않는 한 유용성이 없다는 것을 말해주고 있다.

### 3. 자돈에 대한 새로운 PEDV 분리주의 감염실험

#### 가. Solid phase immune electron microscopy (SPIEM)

##### 1) SPIEM on CV 777

Monoclonal antibody to PEDV 또는 PAS antibody to PEDV를 항체로 사용하였을 때 공히 PEDV에 특이적으로 금입자가 부착되어 관찰되었다. Virus particles은 pleomorphic 하였으며 50-140nm의 surface projections이 관찰되었다. 형태는 coronavirus와 일치하였다 (Fig. 1, 2, 3).

##### 2) SPIEM on Faeces emulsion

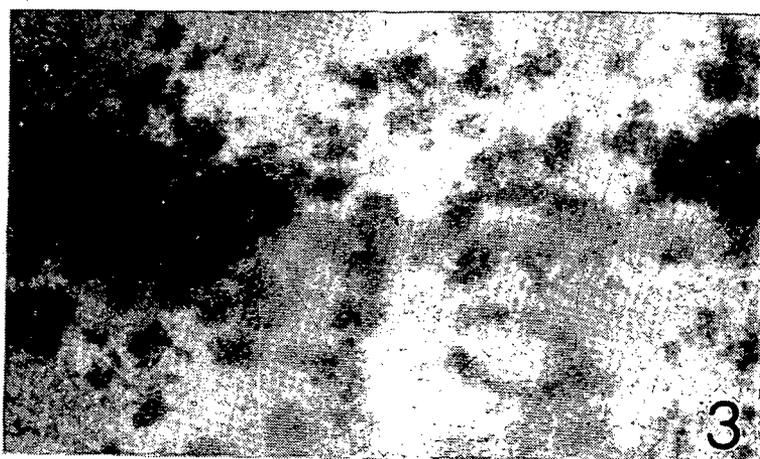
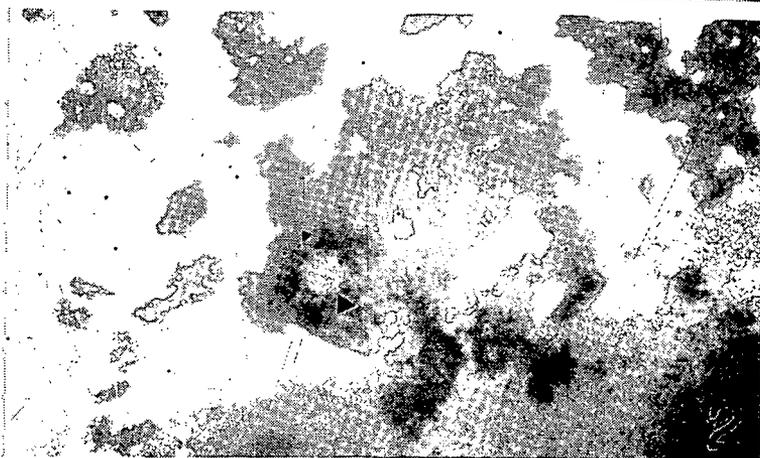
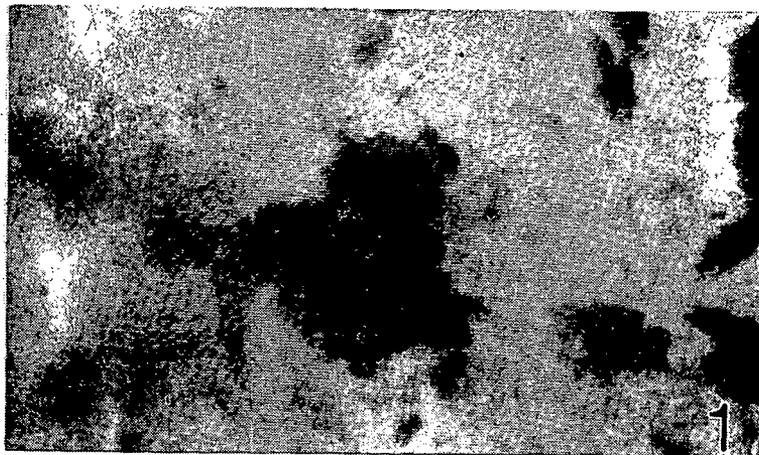
많은 바이러스 입자는 projections을 갖지 않고 있었으며, Virus particles은 gold particles과 결합하고 있었다.

##### 3) SPIEM on intestinal homogenates after experimental infection

Virus particles decorated with gold particles이 관찰되었다.

#### 나. 임상증상

대조군을 제외하고 모든 동물에서 설사가 일어났다. 감염 18 to 110 시간에서 임상증상이 나타났으며 부검 및 폐사하였다. 회음부와 뒷다리가 황색물질로 오염되어 있었다. 감염 초기에는 the stools은 profuse and watery하였다. 감염 71 시간 후에 설사는 점액성으로 변하였다. Foamy vomiting이 감염돈에서 관찰되었다(PIH 62, PIH 71). 감염 100 와 110 시간에는 포유자돈이 사망하였다. 설사를 보인 직후 또는 사망 직후에 부검을 한 시간 간격은 감염 후 18 to 110 시간이었다(Table 6).



## Legands for Figures

Figure 1. SPIEM on virus culture supernanats. Virus particles are typical coronavirus morphology, and conjugated with several gold-particles (arrow). x400,000.

Figure 2. SPIEM on feces emulsion. Showing gold-particle conjugatedvirisons (aorws). x530,000.

Figure 3. SPIEM on the intestinal homogenates at 62 post-inoculation hour. Virion is decorated with gold particles 9arrows). x200,000.

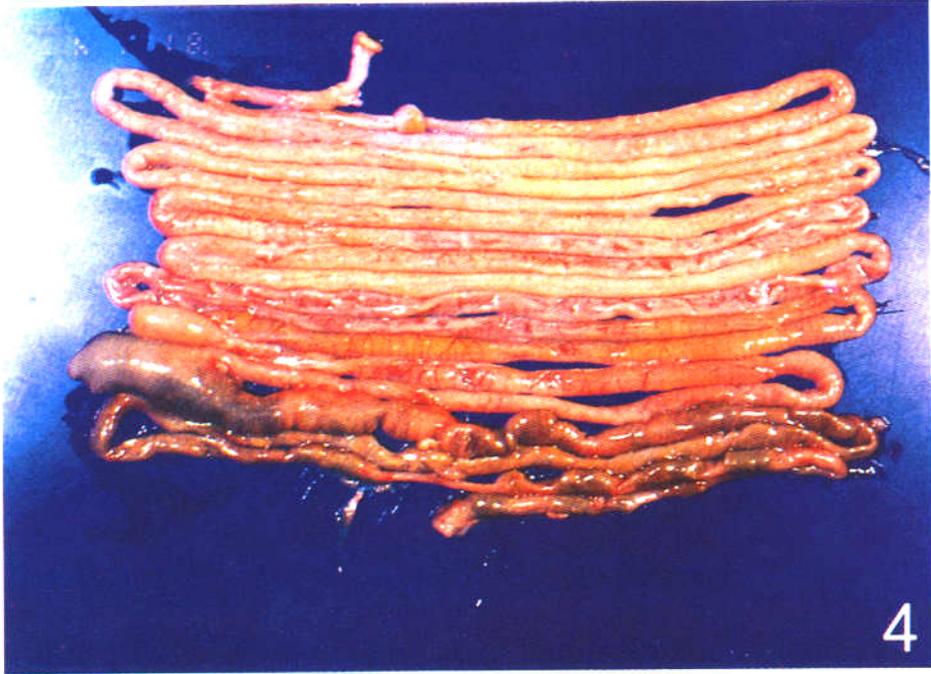
Table 6. Numbers of pigs showing diarrhea and numbers that died or were euthanatized at various times after inoculation with faeces, intestinal homogenates and PBS.

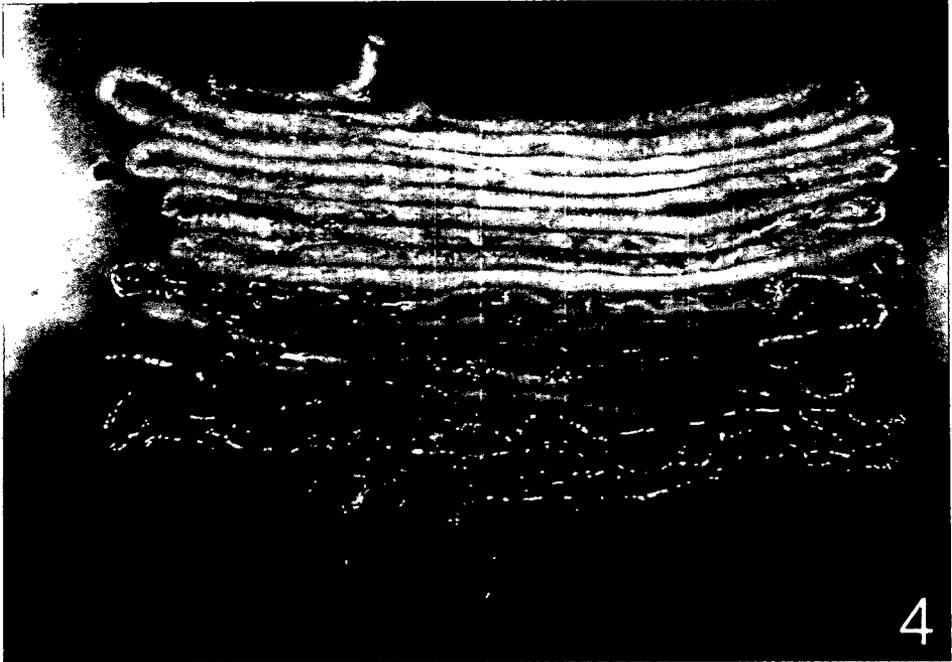
| Group     | No. of animal |                     | Post Inoculation Hours |    |                 |                |                |                |                |
|-----------|---------------|---------------------|------------------------|----|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|           |               |                     | 18                     | 37 | 50 <sup>3</sup> | 62             | 71             | 100            | 110            |
| Group I   | 7             | Diarrhea            | 2 <sup>1</sup>         | 1  | 5               | 4 <sup>4</sup> | 3 <sup>5</sup> | 2              | 1              |
|           |               | Dead                | -                      | -  | -               | -              | -              | 1 <sup>6</sup> | 1 <sup>7</sup> |
|           |               | Euthan <sup>2</sup> | 1                      | 1  | 1               | 1              | 1              |                |                |
| Group II  | 1             | Diarrhea            | -                      | 1  | -               | -              | -              | -              | -              |
|           |               | Dead                | -                      | -  | -               | -              | -              | -              | -              |
|           |               | Euthan              | -                      | 1  | -               | -              | -              | -              | -              |
| Group III | 2             | Diarrhea            | -                      | -  | -               | -              | -              | -              | -              |
|           |               | Dead                | -                      | -  | -               | -              | -              | -              | -              |
|           |               | Euthan              | -                      | -  | -               | -              | -              | -              | -              |

1, No. of animals; 2, Euthanized; 3, All but mock-infected animals started showing diarrhea; 4, Showed vomiting with foamy materials and was on the brink of death; 5, Could not stand up; 6, Naturally died; 7, Naturally died

#### 다. Gross lesions

부검시, 육안소견은 소장엔 한정되었으며 특히 공장위원부에서 관찰되었다 (Figs. 4, 5). 소장엔 gas가 충만하였고 대장엔 watery faeces and mucoid가 차 있었다. 장벽은 비박화 되어 있었다. 대조군의 intestines과 organ은 fresh and normal 하였다. 기타 변화는 spleen, liver, lung, kidney, heart에서 관찰되지 않았다.





## Legends for Figures

Figure 4. Aspects of intestines from mock-infected piglets at 110 post-inoculation hour. Showing no remarkable changes.

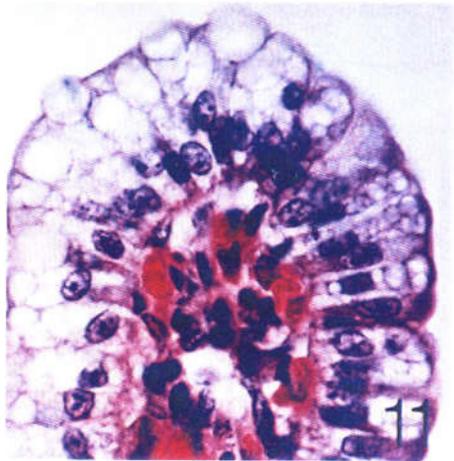
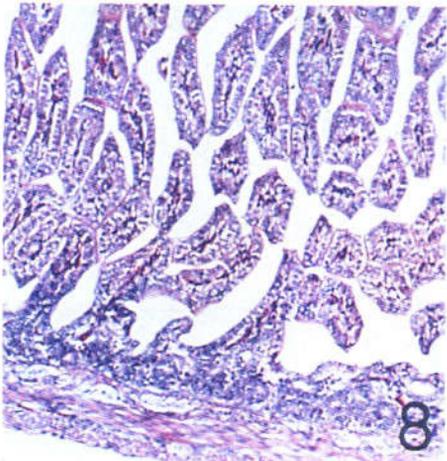
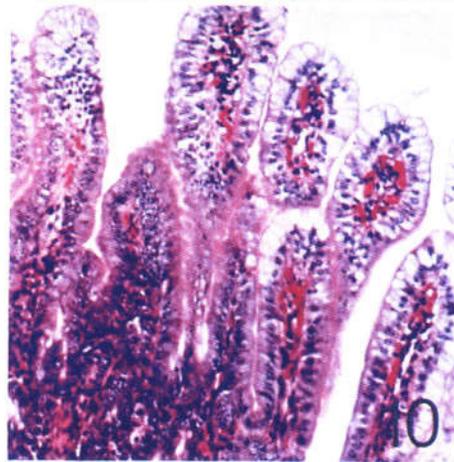
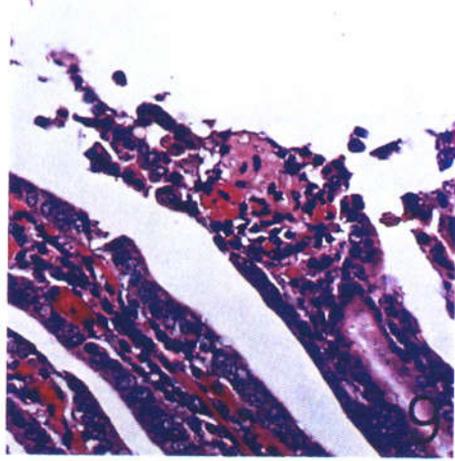
Figure 5. Aspects of intestines from piglets, experimentally infected with N-PEDV. Intestine is distended with wateryfluid contents, and the wall is very thin and transparent.

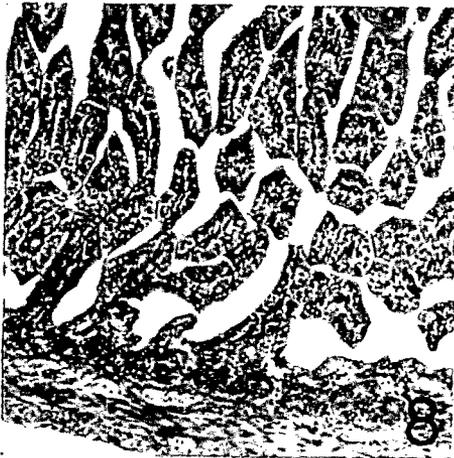
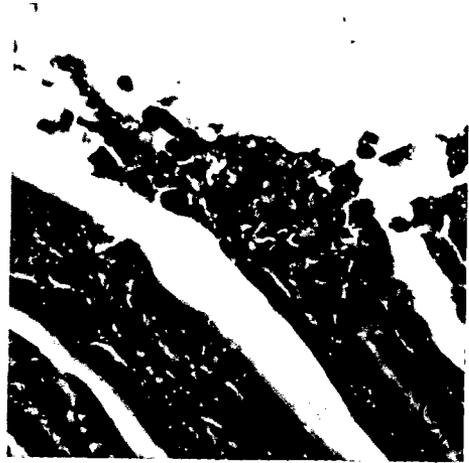
라. 병리조직학적 병변

병변은 Table 7에 요약하였다. PED를 실험감염시킨 돼지의 공장은 용모의 위축이 일반적인 상이었다. 용모상피세포는 공포화하였고 형태는 일반상피라 하였다. 용모와 음와의 비율이 현저하에 감소하였다. 2마리의 대조군은 어떠한 변화도 보이지 않았다. 공장의 용모위축은 접종후 18시간에서 110시간 사이에 경시적으로 심화되었다. 접종후 37시간에 KPEDV-9 (수의과학연구소 권창희박사로부터 입수)를 감염시킨 돼지도 용모의 고도위축이 관찰되었다 (Figs. 6,7,8,9,10,11).

Table 7. Histopathological lesions of jejunum experimentally PEDV infected piglets

| Group    | PIH <sup>1</sup> | Histopathological lesions   | Figure    |
|----------|------------------|---|-----------|
| Group I  | 18               | mild vacuolation of basal enterocytes   | Figure 11 |
|          | 37               | mild vacuolation of villus tip  | -         |
|          | 50               | congestion, exfoliation, vacuolation and necrosis of enterocytes, lymphocyte infiltration.                | -         |
|          | 62               | mild villus atrophy and necrosis  | -         |
|          | 71               | moderate vacuolation of villus tips   | Figure 13 |
|          | 100              | severe necrosis, exfoliation, hemorrhage  | Figure 14 |
|          | 110              | villus atrophy and vacuolation of enterocytes   | -         |
|          | 110              | severe villus atrophy, vacuolation of enterocytes, infiltration of lymphocytes and eosinophilic materials | Figure 12 |
| Group II | 71               | no change   | -         |
|          | 110              | no change   | Figure 10 |





## Legends for Figures

Figure 6. Transverse section of the jejunum for mock-infected piglet at 110 post-inoculation hour. Showing no remarkable changes. H&E, x40.

Figure 7. Higher magnification of figure 6. H&E, x400.

Figure 8. Transverse section of the jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 18 post-inoculation hour. Showing no remarkable changes. H&E, x400.

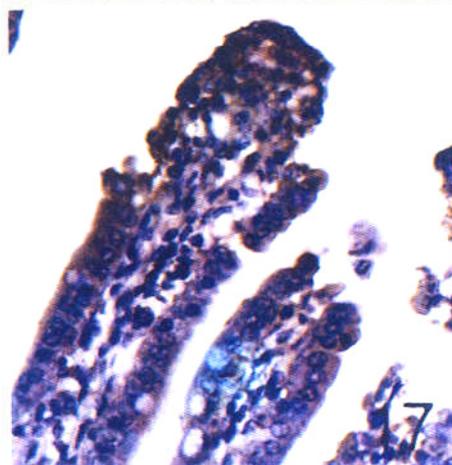
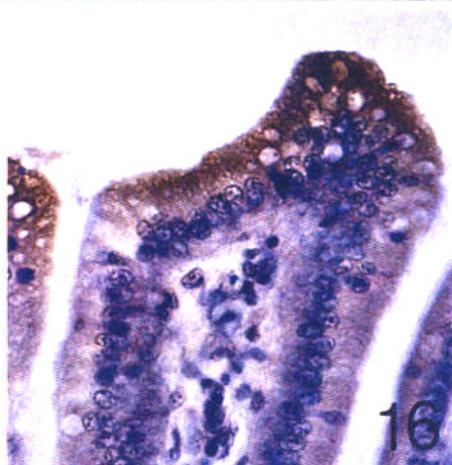
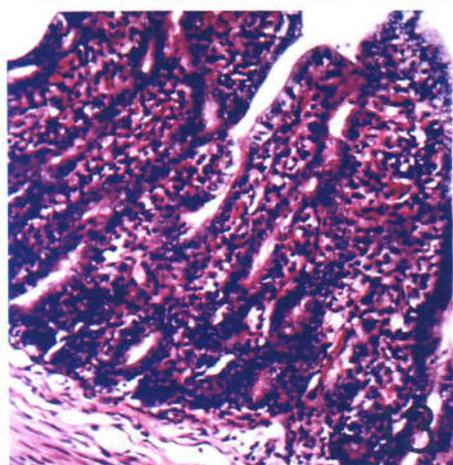
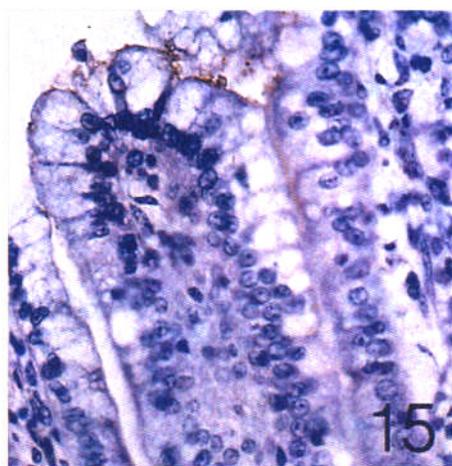
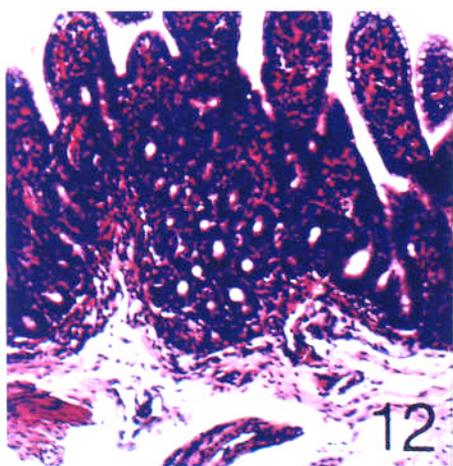
Figure 9. Transverse section of the jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 62 post-inoculation hour. Showing exfoliation of enterocytes and lymphocyte infiltration in lamina propria. H&E, x100.

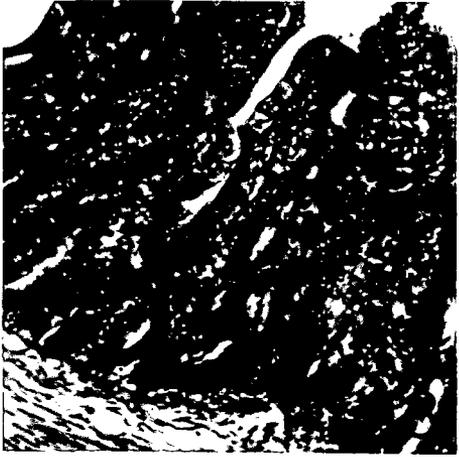
Figure 10. Transverse section of the jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 71 post-inoculation hour. Note vacuolation of enterocytes. lamina propria filled with lymphocyte and eosinophilic materials. H&E, x100.

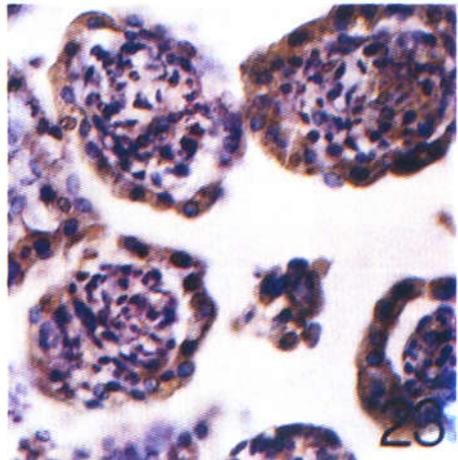
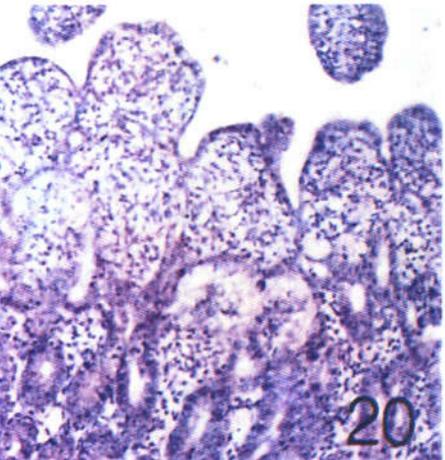
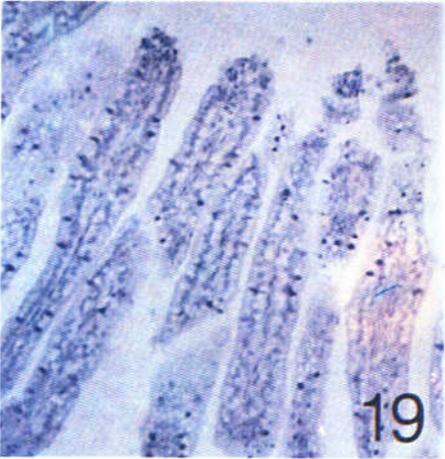
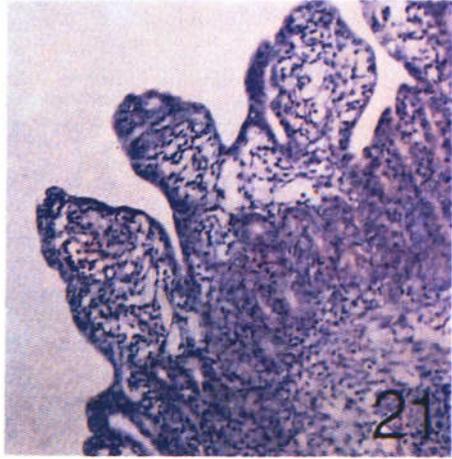
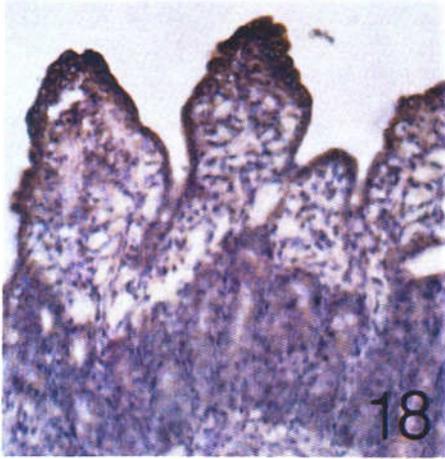
Figure 11. Higher magnification of Figure 10. H&E, x400.

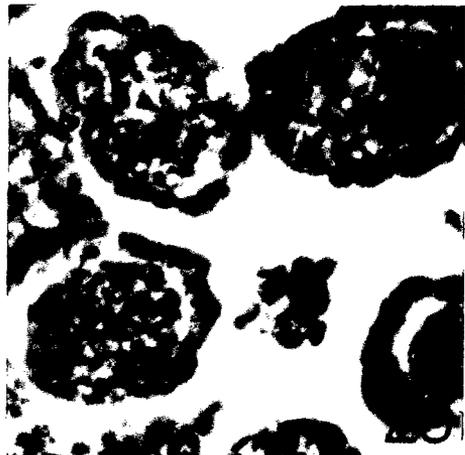
#### 마. Immunohistochemistry

항원은 소장 점막 상피세포의 tip쪽에 산재하여 the small intestinal mucosa 관찰되었다(Figure 12-24). 항원은 장상피의 세포질에서 관찰되었으며 학내에서는 찾아 볼 수 없었다. PEDV antigen은 비감염균에서는 검출되지 않았다. 항원의 양은 경시적으로 감염 18시간째 부터 110시간까지 변화없이 관찰되었다. 1차 항체로 PAS 항체와 단크론 항체를 사용하였을 때 결과의 차는 없었다. 대조 실험으로 정상혈청을 이용하여 감염된 돼지의 조직에 적용하였을 때 음성을 나타냈다. 또, 항체와 바이러스를 미리 혼합한 다음 그 혼합액을 1차 항체로 사용하였을 때 항원은 검출되지 않았다.









## Legends for Figures

Figure 12. Jejunum of piglet, experimentally infected with N-PEDV at 110 post-inoculation hour. Note drastically shortened villi, vacuolation of enterocytes and lymphocyte infiltration in lamina propria. H&E. x100.

Figure 13. Jejunum of piglet, experimentally infected with K-PEDV at 37 post-inoculation hour. Note drastically shortened villi, vacuolation of enterocytes and lymphocyte infiltration in lamina propria. H&E. x100.

Figure 14. Immunohistopathological staining with monoclonal antibody on the jejunum tissue from mock-infected piglet at 110 post-inoculation hour. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x100.

Figure 15. Immunohistopathological staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 71 post-inoculation hour. Normal mouse serum were used as primary antibody. Showing no positive reaction. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x400.

Figure 16. Immunohistopathological staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 71 post-inoculation hour. Monoclonal antibody was used as primary antibody. Infected cells, diffusely scattered in most piglets, were sometimes distributed as seen in this photograph. Antigen are also seen in the crypt epithelia. Villi are densely covered with infected cells. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x200.

Figure 17. Immunohistopathological staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 62 post-inoculation hour. Monoclonal antibody was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x200.

Figure 18. Immunohistopathological staining of jejunum from piglet, experimentally infected with KPEDV-9 at 37 post-inoculation hour. Monoclonal antibody was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x40.

Figure 19. Immunohistochemical staining with PAS antibody on the jejunum from mock-infected piglet at 71 post-inoculation hour. PAS antibody was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x40.

Figure 20. Immunohistochemical staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 37 post-inoculation hour. PAS antibody was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x100.

Figure 21. Immunohistochemical staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 37 post-inoculation hour. PAS antibody, adsorbed in virus culture supernatants was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x100.

Figure 22. Immunohistochemical staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 37 post-inoculation hour. PAS antibody was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x200.

Figure 23. Immunohistochemical staining of jejunum from piglet, experimentally infected with N-PEDV at 50 post-inoculation hour. PAS antibody was used as primary antibody. ABC technique. Hematoxylin counterstain. x200.

#### 4. PEDV의 RT-PCR 진단법의 확립

cDNA에 대한 electrophoresis는 25V, 1% agarose gel에서 수행하였다. 그 결과 sample 1, 2와 infected cell에서 total RNA가 분리된 것으로 나타났다.

한편 RT-PCR을 수행한 결과에서는 250 bp 의 band가 infected cells 또는 분변으로부터 확인 되었다.

#### 5. 경구투여용 백신의 안전성 및 유효성 검정

가. 백신의 근육내 접종후 항체가의 추적실험

##### 1) 투여동물의 임상증상

시험백신을 건강한 돼지에 각각 1ml씩 투여후, 14일간 관찰한 결과 특이적인 임상 증상의 발현은 없었으며, 모든 돼지가 이상임상 소견 없이 생존하였다.

##### 2) 체중의 변화 (단위 Kg)

|         | Control |     |     |     | Group I |     |     | Group II |     | Group III |     |
|---------|---------|-----|-----|-----|---------|-----|-----|----------|-----|-----------|-----|
|         | 6       | 8   | 9   | 11  | 2       | 3   | 5   | 1        | 7   | 4         | 10  |
| 투여전     | 5       | 6.5 | 5.5 | 7   | 6       | 6   | 5.5 | 6.5      | 5   | 6.5       | 6   |
| 1차 백신 후 | 6       | 7.7 | 7   | 7.5 | 6.5     | 7   | 6   | 7        | 6   | 7         | 7.5 |
| 2차 백신 후 | 7.5     | 9.5 | 7.5 | 7.0 | 8.0     | 8.2 | 7.5 | 7.5      | 7.5 | 8         | 8   |
| 공격시험 후  | 9       | 13  | 10  | 10  | 10      | 10  | 9.5 | 9.5      | 11  | 11        | 11  |

##### 3) 항체가의 변화

시험구의 혈청을 수의과학연구소 해외전염병과에 의뢰하여 ELISA법으로 PEDV에 대한 혈청검사를 실시하였다. 1차백신 접종 후에는 Group I, Group II, Group III에서 각각 control에 비해서 높은 항체가의 증가를 나타내었다. 2차 백신 접종 후에는 7번과 10번 돼지에서만 특이적인 항체가의 증가가 나타났다:

|            | Control |       |       |       | Group I |       |       | Group II |       | Group III |       |
|------------|---------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|----------|-------|-----------|-------|
|            | 6       | 8     | 9     | 11    | 2       | 3     | 5     | 1        | 7     | 4         | 10    |
| 투여전        | 0.144   | 0.112 | 0.177 | 0.106 | 0.116   | 0.106 | 0.099 | 0.114    | 0.114 | 0.084     | 0.139 |
|            | 0.140   | 0.107 | 0.164 | 0.104 | 0.103   | 0.102 | 0.095 | 0.108    | 0.106 | 0.085     | 0.136 |
| 1차<br>백신 후 | 0.223   | 0.104 | 0.126 | 0.112 | 0.224   | 0.154 | 0.127 | 0.124    | 0.181 | 0.140     | 0.230 |
|            | 0.220   | 0.096 | 0.122 | 0.109 | 0.211   | 0.153 | 0.127 | 0.124    | 0.183 | 0.134     | 0.237 |
| 2차<br>백신 후 | 0.180   | 0.159 | 0.107 | 0.128 | 0.101   | 0.196 | 0.137 | 0.210    | 0.449 | 0.101     | 0.672 |
|            | 0.170   | 0.166 | 0.102 | 0.130 | 0.102   | 0.184 | 0.138 | 0.205    | 0.449 | 0.104     | 0.704 |
| 공격<br>시험 후 | 0.200   | 0.153 | 0.113 | 0.189 | 0.098   | 0.153 | 0.143 | 0.141    | 0.316 | 0.117     | 0.541 |
|            | 0.197   | 0.154 | 0.103 | 0.190 | 0.102   | 0.142 | 0.146 | 0.140    | 0.298 | 0.120     | 0.656 |

나. 백신의 경구 투여후 항체가의 추적실험

1) 임상 증상의 관찰

시험기간중 isolator의 고무장갑속으로 들어가서 질식하거나 설사증상과는 관계 없이 폐사한 7마리를 제외하고 백신 투여 후 특이적인 임상 증상은 관찰이 되지 않았다. 공격시험 후 전반적인 depression 및 식욕 저하가 나타났으며, 1, 4, 9, 10 번 돼지에서 수양성 설사가 관찰되었다.

2) 체중의 변화

|      | 생후 2일령 투여 |     |     |     |     | 생후 4일령 투여 |     |     | Control |     |     |     |     |
|------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|
|      | 1         | 2   | 3   | 4   | 5   | 6         | 7   | 8   | 9       | 10  | 11  | 12  | 13  |
| 9.18 | 1.2       | 1.4 | 1.4 | 1.5 | 1.7 | 1.5       | 1.2 | 1.2 | 1.1     | 1.1 | 1.4 | 0.9 | 1.2 |
| 9.20 | 1.2       | 1.4 | 1.4 | 1.5 | 1.6 |           | 1   | 1.2 | 1.2     | 1.4 | 1.4 | 1.1 |     |
| 9.26 | 1.6       | 1.9 | 1.6 | 1.9 | 2.1 |           |     |     | 1.6     | 2.2 | 1.2 |     |     |
| 9.27 | 1.6       | 2   | 1.6 | 2   | 2.1 |           |     |     | 1.6     | 2.2 | 1.3 |     |     |
| 9.28 | 1.7       | 2   |     | 2   | 2.4 |           |     |     | 1.6     | 2.5 | 1.5 |     |     |
| 9.29 | 1.8       | 1.9 |     | 2   | 2.5 |           |     |     | 1.5     | 2.5 | 1.5 |     |     |
| 9.30 | 1.6       | 1.5 |     | 1.9 | 2.5 |           |     |     | 1.7     | 2.3 | 1.2 |     |     |
| 10.1 | 1.1       | 1.3 |     | 2.1 | 2.4 |           |     |     | 1.6     | 2.2 | 1.4 |     |     |
| 10.2 |           | 1   |     | 2   | 2.3 |           |     |     | 1.5     | 1.8 | 1.5 |     |     |

실험 돼지의 잦은 사망으로 처음의 계획대로 group을 설정해 체중을 측정할 수 없었다. 바이러스 공격 시험(98. 9. 29) 후, 생후 2일령 투여군 및 Control에서 약간의 체중 소실이 관찰되었다.

# 제 4 장 돼지의 생산성 향상을 위한 내외부 기생충성 질병의 방제프로그램

## 제 1 절 서 론

### 1. 돼지의 기생충성 질병

돼지의 기생충성 질병은 원충(protozoa), 선충(nematoda) 및 외부기생충인 절지동물(arthropoda)에 의한 질병이 대부분이며, 흡충과 조충에 의한 질병은 조충에 있어서 인수공통 기생충을 제외하면 그다지 중요하지 않다. 돼지뿐만 아니라 모든 가축과 동물에 있어서 기생충의 감염은 만성적이며 임상증상이나 폐사가 크게 나타나지 않아 축주들로 하여금 이들 기생충성 질병에 대한 중요성을 간과하게 만든다. 그러나 기생충성 질병은 대부분 심한 임상증상과 폐사를 가져오지 않기 때문에 우리가 모르는 사이에 숙주동물의 체내에서 발육 증식하면서 사료효율과 증체 저하를 가져와 경제적인 피해를 가져오게 된다. 뿐만 아니라 톡소플라즈마와 같은 주육포자충이나 외부기생충은 피부에 발적을 가져와 육질을 저하시킨다.

#### 가. 원충류

돼지의 기생충성 질병은 장내원충에 의한 질병과 주육포자충에 의한 질병을 들 수가 있다. 장내 원충으로는 콕시듐(Coccidia), 발란티디움(*Balantidium coli*) 그리고 아메바(*Entamoeba* spp) 등을 들 수가 있다. 콕시듐 중 *Isospora suis* 원충에 의한 자돈설사는 매우 커다란 경제적 손실을 가져다 주는 질병이다. 신생자돈에 있어서 *I. suis*는 국내 양돈농가에서 자주 발생하는 원충성 질병으로 5~11일령의 포유자돈에서 설사를 동반하며 증체저하에 커다란 영향을 주는 질병의 병원체이다. 이환율은 다양하지만 폐사율은 비교적 낮은 편이다. 오오시스트는 외계 환경에 저항성이 크므로 상당히 지속적으로 발생할 수 있는 원충성 질병이다. Mundt 등은 toltrazuril

의 현탁액을 투여함으로써 새로운 치료 및 예방대책을 마련하여 설사와 폐사를 줄일 수 있었다고 보고하였다. 5%의 toltrazuril 현탁액인 Baycox을 이용한 포유자돈의 콕시듐증을 치료하기 위하여 캐나다, 체코슬로바키아 및 미국 등 극히 제한된 나라에서 시도되고 있다. 그러므로 김(1995)은 국내에서 포유자돈의 콕시듐증을 치료 및 예방하기 위하여 Baycox(5% toltrazuril)에 대한 포유자돈의 항콕시듐 효과를 시험한 결과 *I. suis* 콕시듐에 의한 포유자돈의 설사로 인한 증체저하 등을 개선시킴으로써 양축농가에 경제적으로 커다란 도움이 될 뿐만 아니라 국제경쟁력도 향상될 것으로 기대되는 결과를 얻었다. 즉, 콕시듐 원충 검사결과, 발생빈도는 3일령에 48.9%에서 14일령과 21일령에는 33.3% 및 25.5%로 각각 감소되었으며, 각 시험군의 체중은 투약시기인 3일령에는 비슷한 수준이었으나, 투약후 11일과 18일 후에는 투약구가 대조구보다 높게 나타났다. 전 시험기간의 증체량은 95% 수준에서 유의차가 인정되었다. 특히, 투약시인 3일령부터 14일령까지의 증체량은 투약구가 대조구보다 95% 수준에서 유의차 있게 높았으며, 14일령부터 21일령 사이에는 유의차가 인정되지 않았다. 모든 시험구에서 돼지 콕시듐증으로 인한 폐사는 없었으며, 소수의 자연도태 자돈이 있었다. 각각의 시험군에서 설사정도나 기간이 대조군에 비하여 투약군에서 매우 낮게 나타났다. 이러한 모든 일련의 결과는 국내의 많은 양돈장에서 콕시듐증에 의한 경제적 피해가 매우 클 것으로 추정되며 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다. 콕시듐증은 포유 자돈에서만 발생하는 것이 아니라 비육돈이나 성돈에서도 발생할 수 있다. 물론 그 원충의 종류는 달라서 포유자돈에서는 *Isospora* 속 콕시듐 원충이 그리고 비육돈이나 성돈에서는 *Eimeria* 속 콕시듐 원충이 주로 감염되며 그 병원성의 차이도 커서 비육돈이나 성돈에서의 *Eimeria* 속 콕시듐 원충은 그리 심한 임상 증상을 나타내지 않기 때문에 돼지에서의 콕시듐증은 최근까지는 무시되어 왔다. 그러나 1990년대 초반에 들어 포유자돈의 콕시듐증에 대한 중요성이 부각되고 몇몇 연구자들이 이들에 대한 진단과 치료 및 예방에 대한 연구를 시작하게 되었다. 장 등 (1991)은 수원근교 톱밥발효돈사에서 83.3 %의 원충 (발란티디움, 콕시디아, 아메바) 감염율을 보고하였으며, 장 (1975)은 기업양돈이 시작되기 이전 충북지방의 일반농가의 돼지에서 66.6 %의 발란티디움, 55.4 %의 아메바, 22.5 %의 콕시디아 감염율을 보고하였고, 강 등 (1989)은 기업양돈장에서 57.7 %의 발란티디움 및 19.7 %의 콕시

디아 감염율을 보고하였다. 발란티디움 원충과 아메바 원충도 돼지에게 발생하는 원충성 질병의 원인체이다. 발란티디움은 돼지의 분변 검사에서 흔하게 발견되는 원충이며 가벼운 설사를 동반한 장염을 유발할 수 있으나 심각한 편은 아니며 마땅한 구충제가 없다. 아메바는 위생관리가 나쁜 후진국에서 사람에게 주로 발생하는 원충으로 아메바성 이질을 유발시키는 원충이지만 최근 국내에서는 사람이나 돼지 등 가축에서 흔하게 발견되지는 않는다.

돼지에 있어서 주육포자충에 속하는 원충은 톡소플라즈마 (*Toxoplasma gondii*)와 주육포자충 (*Sarcocystis* spp)을 들 수가 있다. 톡소플라즈마는 돼지의 발열, 진전, 기침, 쇠약, 운동실조 및 피부발적 등 여러가지 증상을 나타내는 원충성 질병으로 이는 고양이를 종숙주로 하는 인수공통 전염성질병의 원인체라는 점에서 매우 중요하다. 특히 산모에게 감염되면 유사산은 물론 수두증, 수막뇌염, 맥락막 망막염, 소두증, 운동신경 장애 등을 유발시킬 수 있는 무서운 병원체이다. 톡소플라즈마는 중간숙주의 범위가 매우 넓어 사람은 포함한 포유류는 물론 조류를 포함한 약 300여종의 척추동물이 중간숙주로써 알려져 있다. 주육포자충 역시 고양이를 종숙주로 하는 인수공통 기생충으로 종류마다 다양한 중간숙주를 갖는다. 국내에서 돼지에 대한 톡소플라즈마 원충의 조사보고는 김과 김 (1989)이 제주지역의 돼지에서 ELISA로 항체를 조사하여 농가의 돼지 60.7 %와 기업양돈장의 돼지 21.3 %의 양성율을 보고한바 있으며, 서 등 (1989)은 역시 같은 방법으로 경상도 지역의 도살장 도살돼지에서 42.1 %, 종돈장의 성돈에서 58.6 %의 양성율을 보고하였다. 또한, 문 (1989)은 경남, 경북, 강원도 지역의 돼지에 7.7 %의 *Sarcocystis*의 감염율을 보고하였다.

#### 나. 선충류

돼지 선충류로는 장내 선충류와 돼지폐충 (Lung worm : *Metastrongylus elongatus*), 돼지신충 (Kidney worm) 등이 있다. 이들은 과거 우리나라의 양돈업이 농가의 부업 형태로 있을 때에는 매우 발생빈도가 높았다. 그러나 양돈업이 전업화, 기업화 되면서 돈사가 콘크리트 바닥으로 바뀐과 동시에 장내 선충류인 돼지회충 (*Ascaris suum*), 돼지편충 (*Trichuris suis*) 및 돼지장결절충 (*Oesophagostomum*

spp), 폐충, 신충 등은 상당히 줄어들었으나 10여년 전에 축산폐기물의 환경공해 문제를 해결하기 위하여 나타난 톱밥발효 돈사에서 돼지회충, 돼지편충은 콕시듐증과 함께 매우 심각한 문제가 되었다. 장 등 (1991)은 수원근교 톱밥발효돈사에서 70.0%의 선충류 (돈회충: *Ascaris suum*), 돼지편충, 돈장결절충, 홍색모양선충 (*Hyostrogylus*), 란숨간충 (*Strongyloides ransomi*)의 감염율을 보고하였으며, 장 (1975)은 기업양돈이 시작되기 이전 충북지방의 일반농가의 돼지에서 29.1%의 돈장결절충, 25.6%의 돈회충, 14.6%의 홍색모양선충, 7.1%의 분간충 (*Strongylus* spp), 4.2%의 돈편충 및 17.6%의 돈폐충 감염율을 보고하였고, 강 등 (1989)은 기업양돈장에서 14.8%의 돈장결절충, 4.2%의 돈회충, 0.2%의 홍색모양선충, 0.3%의 분간충, 4.1%의 돈편충 감염율을 보고하였다. 이렇게 높은 감염율을 보이던 돼지의 선충류가 톱밥 돈사가 기생충성 질병과 호흡기 질병이 많이 발생하는 문제로 콘크리트 돈사로 다시 바뀌면서 이들 질병들은 많이 감소하였다. 그러나 아직도 돼지회충, 돼지편충과 콕시듐증 및 외부기생충병 등은 자주 발생하는 편이다.

#### 다. 외부기생충

돼지의 기생충성질병에 있어서 양돈가에게 커다란 경제적 피해를 입히는 것이 천공개선충에 속하는 응애류 (*Sarcoptes scabi* mites)이다. 이들은 피하에 기생하며 피부 발적, 가려움증 및 심한 경우에는 화농을 가져오는 것으로써 국내에서도 상당히 분포할 것으로 추정된다. 특히 미국의 동물약품 시장의 30% 정도를 차지하는 것이 이 응애류를 포함한 절지동물을 구제하기 위한 살충제이다. 국내에서는 아직까지 이러한 기생충성 질병들에 대한 인식이 부족하고 충분히 조사 보고된 바가 적어서 양돈업의 문제점으로 부상되고 있지 못한 것으로 파악된다.

#### 라. 흡충류 및 조충류

요코가와 흡충 (*Metagonimus yokogawai*) 등 흡충과 유구조충 (*Taenia solium*)과 아시아조충 (*Asian Taenia saginata* : *T asiatica*) 등 조충은 최근 돼지에 게서 거의 발생이 없어 양돈업에서는 중요시되지 않고 있다. 그러나 유구조충과 아시아조충은 인수공통 전염성 질병이라는 데에 중요성이 부과된다. 그러나 이들의 발

생빈도는 매우 낮으며 이들 조충의 낭충이 감염된 돈육을 날로 먹었을 때 사람에게 감염이 이루어진다. 엄과 임 (1992)은 국내 25,358의 돼지의 간에서 1.01%인 256마리의 돼지가 아시아조충의 낭충을 가지고 있는 것을 보고하였으며, 이들의 대부분은 석회화 (87.1%) 또는 변성 (12.9%)되었고 0.01% 정도만이 살아있는 것으로 보고한 바 있다. 그러므로 아직도 농촌에서는 이 조충에 감염되는 사람들이 있는 것으로 알려져 있다.

## 2. 돼지의 기생충성 질병의 방제를 위한 연구 목적

이와 같이 국내에 돼지에 있어서 기생충성 질병이 만연되고 있지만, 지금까지 기생충에 대한 체계적인 진단, 치료 및 예방에 대한 많은 연구가 이루어져 왔지만 효과적인 구충 및 예방 프로그램이 작성 보급되지 않아 계속하여 발생함은 물론 눈에 보이지 않는 많은 경제적 피해를 가져다주고 있는 것이다. 그러므로 이번 기회에 국내 돼지의 기생충성 질병에 대하여 분포상황, 진단, 치료 및 예방대책에 대하여 종합적으로 연구하고 이에 대한 방역 프로그램을 작성하여 모든 양돈가에 보급함으로써 양돈가의 생산성 향상은 물론 국제경쟁력을 높이고자 한다.

즉 기생충성 질병 방제 및 예방하기 위한 구충프로그램 작성을 위하여 1년차 사업으로써 국내 양돈장의 돼지에 기생하는 내외부 기생충의 분포를 조사하고자 하였다. 즉 내부 기생충으로 장관내 기생하는 원충으로 돼지콕시뚱, 대장발란티디움, 그리고 윤충류로써 흔히 발생하는 돼지회충, 돼지편충, 장결절충 등의 발생분포를 조사하고, 근육내 기생하는 원충으로 톡소플라즈마, 주육포자충, 그리고 선충류로 선모충 등의 발생분포를 조사하고자 하였으며, 외부기생충으로 개선충 및 진드기류 등의 발생분포를 조사하고자 하였다. 2년차 및 3년차에는 내부 기생충으로 장관내 기생하는 원충으로 돼지콕시뚱, 대장발란티디움, 그리고 윤충류로써 흔히 발생하는 돼지회충, 돼지편충, 장결절충 등의 발생분포를 조사하고자 하였고, 근육내 기생하는 원충으로 톡소플라즈마, 주육포자충, 그리고 선충류로 선모충 등의 발생분포를 조사하고자 하였으며, 외부기생충으로 개선충 및 진드기류 등의 발생분포를 조사하여 치료

및 예방 프로그램 작성을 위한 구충효능 시험 등을 실시하였다. 특히 기생충성 질병은 심한 임상증상이나 폐사를 동반하는 것이 아니기 때문에 양축가들이 알지 못하는 사이에 사료효율의 저하, 증체저하 등을 가져와서 경제적 손실을 가져다주는 질병이다. 그러므로 이러한 기생충성 질병에 대한 치료 및 예방은 양축 농가의 소득을 향상시키는데 크게 기여하게 되는 것이다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 돼지 기생충의 분포조사

#### 가. 제 1 차년도(1996)

제 1차년도의 제 3 세부과제 수행내용은 돼지 내외부 기생충의 분포 조사로써 침전법과 포화식염수 부유법을 이용하여 분변검사를 통한 장내 기생충 분포 조사로 주요 대상 기생충은 장내 선충류인 돼지회충, 돼지편충, 돼지장결절충, 분선충 등과 장내 원충류인 콕시디아, 발란티디움 및 아메바 등, 그리고 피부 글리세린 도말법을 이용하여 피부에 기생하는 절지동물인 천공개선충을 대상으로 하였으며 피부 조직검사를 이용하여 톡소플라즈마와 주육포자충 원충을 조사하고자 하였다. 해당 연구기간 수행된 내용은 병리학실에 병성감정 의뢰된 돼지 166 두와 경기도 지역 131개 돈방 약 2863두, 전북 및 충남지역 36돈방 968두, 경기도 용인 지역 86돈방 1586두, 그리고 평택지역 42돈방 1095두를 대상으로 각종 기생충의 분포를 조사하였다.

#### 나. 제 2 차년도(1997)

제 2차년도의 제 3 세부과제 수행내용은 돼지 내외부 기생충의 분포 조사로써 침전법과 포화식염수 부유법을 이용하여 분변검사를 통한 장내 기생충 분포 조사로 주요 대상 기생충은 장내 선충류인 돼지회충, 돼지편충, 돼지장결절충, 분선충 등과 장내 원충류인 콕시디아, 발란티디움 및 아메바 등, 그리고 피부 글리세린 도말법을 이용하여 피부에 기생하는 절지동물인 천공개선충을 대상으로 하였으며 피부 조직검사를 이용하여 톡소플라즈마와 주육포자충 원충을 조사하고자 하였다. 해당 연구기간 수행된 내용은 경기도 등 지역에서 양돈장에서 4716두를 대상으로 각종 기생충의 분포를 조사하였다. 아울러 구충제 효능시험을 더욱 중점적으로 실시하였다.

#### 다. 제 3 차년도(1998)

제 3차년도의 제 3 세부과제 수행 내용은 돼지 내외부 기생충의 분포 조사

로써 침전법과 포화식염수 부유법을 이용하여 분변검사를 통한 장내 기생충 분포 조사로 주요 대상 기생충은 장내 선충류인 돼지회충, 돼지편충, 돼지장결절충, 분선충 등과 장내 원충류인 콕시디아, 발란티디움 및 아메바등, 그리고 피부 글리세린 도말법을 이용하여 피부에 기생하는 절지동물인 천공개선충을 대상으로 하였으며 피부 조직검사를 이용하여 특소플라즈마와 주육포자충 원충을 조사하였다. 해당 연구기간 수행된 내용은 경기도 등 지역에서 양돈장에서 1838두를 대상으로 각종 기생충의 분포를 조사하였다. 아울러 구충제 효능시험을 더욱 중점적으로 실시하였다.

## 2. 돼지 기생충의 구충효능시험

### 가. 선충류의 구충 효능시험

용인지역의 모돈 26두, 자돈 600두 및 육성돈 960두 등 총 1586두와 평택지역의 자돈 190두 및 육성돈 900두 등 총 1090두의 돈군에 대하여는 국내 시판용 구충제인 L 및 O 약제를 선별하여 구충효능을 시험하였다. 경기도 안성 지역 종돈장의 모돈 68두 및 웅돈 14두 총 82두를 대상으로 내외부 기생충의 분포조사를 실시하고 구충제 I와 D 약제에 대한 구충효능 시험을 실시하였다. 경기도 김포지역의 양돈장에서 모돈 30두, 자돈 360두 및 육성돈 450두 등 총 840두를 대상으로 내외부 기생충의 분포조사를 실시하고 구충제 B 약제에 대한 구충효능 시험을 실시하였다. 또한 용인과 이천지역의 돈군에서 비육돈 165두와 모돈 100두 총 265두를 대상으로 국내 시판용 구충제중 선충류와 외부기생충에 효능이 우수한 것으로 알려진 I 약제를 선별하여 치료시험을 하였다. 그리고 돼지회충과 돼지편충을 인공 감염시킨 비육돈 40두에 대한 구충효능시험을 실시하였다.

### 나. 원충류의 구충 효능시험

역시 경기도 이천 지역의 종돈장을 대상으로 40여복 약 400여 두의 보유자돈에서 *Isospora suis* 콕시딴에 대한 분포조사를 실시하여 국내 양계용으로 시판중인 B 항콕시딴제제의 구충효능을 실시하였다. 본 실험에서는 오오시스트의 배설수

준, 증체량, 설사정도와 빈도 등을 조사 대상으로 실시하였다.

#### 다. 외부기생충의 구충 효능시험

강원도 횡성지역의 이유자돈 105두에 대하여는 국내 시판용 구충제중 선충류와 외부기생충에 가장 효능이 우수한 것으로 알려진 I 약제를 선별하여 치료시험을 실시하였다. 본 실험에서는 피부 병변도와 증체량을 조사 대상으로 실시하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 국내 사육 돼지의 기생충 분포조사

국내에서 발생하고 있는 돼지의 기생충으로는 가장 흔하게 볼 수 있는 것이 선충류로써 돼지회충이다. 수년 전에는 돼지편충, 돼지 장결절충 및 분선충도 흔하게 관찰되었으나 최근에 이들의 분포가 상당히 줄어 극히 일부의 발생지역을 제외하면 관찰하기가 쉽지 않다. 원충으로는 콕시듐과 대장 발란티디움의 흔하게 관찰되는 기생충이다. 그리고 외부 기생충으로는 개선충이 흔하게 발생한다. 그러나 이들은 시료 채취가 어렵고 의심스러운 부분의 피부를 글리세린 도말에 의한 스크래핑으로 채취하여도 잘 관찰되지 않는다. 연도별 국내 돼지 기생충의 분포조사 결과는 표 1-7과 같다.

##### 가. 제 1 차년도(1996)

1차년도에 조사된 총 두수는 8429두로써 총 1328두가 기생충에 감염되어 15.8%를 나타냈으며, 콕시듐 (7.2%), 돼지회충 (6.5%), 돼지편충 (1.2%) 및 대장발란티디움(1.1%) 등의 순으로 높은 감염율을 보였다. 돼지의 발육단계별로는 모돈이 기생충 감염율이 28.5% (57두)로 매우 높았으며, 육성돈이 16.2% (581두), 자돈이 15.0% (681두) 순으로 나타났다 (표 1).

Table 1. The prevalence of swine parasites in Korea(1996)

| 구분  | 검사<br>두수 | 돼지회충     | 돼지편충  | 돼지<br>장결절충 | 분선충   | 대장<br>발란티디움 | 톡시듬      | 외부<br>기생충 | 계(%)      |
|-----|----------|----------|-------|------------|-------|-------------|----------|-----------|-----------|
| 모돈  | 200      | 13(5)    | (1)   |            | (3)   | 29(7)       | 6        | 9(2)      | 57(28.5)  |
| 웅돈  | 14       | 1        |       |            |       | 4           |          |           | 5(35.7)   |
| 자돈  | 4540     | 170      |       |            |       |             | 511      |           | 681(15.0) |
| 육성돈 | 3589     | 361(100) | (101) | 20         | 50    | 60(31)      | 90(130)  | 581(16.2) | 미상86      |
|     |          |          | (1)   | 2(1)       | 2     |             | 4(4.7)   |           |           |
| 총계  | 8429     | 545(105) | (102) | 20         | 50(4) | 95(39)      | 609(130) | 9(2)      | 1328      |
| (%) |          | 6.5      | 1.2   | 0.2        | 0.6   | 1.1         | 7.2      | 0.1       | 15.8      |

병리학실에 병상감정 의뢰된 166두의 돼지를 대상으로 각종 기생충의 감염을 조사한 결과 비교적 낮은 감염율을 보였다. 이는 대부분의 의뢰 돼지가 아주 어린 포유자돈으로 기생충에 감염될 기회를 얻기도 전에 의뢰되었기 때문으로 추정된다. 강원도 지역의 4두중 2두가 기생충에 감염되어 50%의 감염율을 보였고, 전체적으로 약 5.4%의 감염율을 보였다 (표 2).

Table. 2. The regional distribution of swine parasites tested by pathology lab.in korea

| 지역    | 검사<br>두수 | 돼지회충 | 돼지편충 | 분선충 | 대장<br>발란티디움 | 톡시듬 | 계(%)    |
|-------|----------|------|------|-----|-------------|-----|---------|
| 강 원 도 | 4        | 2(1) | (1)  |     |             |     | 2(50)   |
| 경 기 도 | 30       |      |      |     |             | 1   | 1(3.3)  |
| 충청남도  | 11       |      | (1)  |     | (1)         |     | 1(9.1)  |
| 충청북도  | 8        |      |      |     |             | 1   | 1(12.5) |
| 전라남도  | 13       |      |      |     |             |     |         |
| 전라북도  | 11       |      |      |     |             |     |         |
| 경상남도  | 0        |      |      |     |             |     |         |
| 경상북도  | 3        |      |      |     |             |     |         |
| 제 주 도 | 0        |      |      |     |             |     |         |
| 미 상   | 86       |      |      | (1) | 2(1)        | 2   | 4(4.7)  |
| 총 계   | 166      | 2(1) | (2)  | (1) | 3(2)        | 4   | 9(5.4)  |

병리학실 병성감정 의뢰 돼지의 일령별 기생충 감염 분포 성적은 육성돈이 10.5%로 가장 높고 자돈은 비교적 낮은 편으로 이는 어린 일령에서는 기생충에 감염될 기회가 적음을 나타내는 것으로 추정된다 (표 3).

Table. 3. The parasitic distribution of swine classified by developmental stage committed by pathology Lab.in Korea

| 구분  | 검사<br>두수 | 돼지회충 | 돼지편충 | 분선충 | 대장<br>발란티디움 | 콕시듐 | 계(%)    |
|-----|----------|------|------|-----|-------------|-----|---------|
| 모 돈 | 1        |      |      |     |             |     |         |
| 자 돈 | 50       |      |      |     |             | 1   | 1(2.0)  |
| 육성돈 | 19       | 1    | (1)  |     | 1(1)        |     | 2(10.5) |
| 미 상 | 96       | 1(1) | (1)  | (1) | 2(1)        | 3   | 6(6.3)  |
| 총 계 | 166      | 2(1) | (2)  | (1) | 3(2)        | 4   | 9(5.4)  |

경기도 지역 각종 양돈장을 대상으로 63두의 모돈, 38돈방의 자돈 및 30돈방의 육성돈에서 기생충 감염실태를 조사한 결과 모돈에서 31.7%로 가장 높은 감염율을 보였고, 육성돈에서 10%, 그리고 자돈에서 7.9%의 감염율을 보였다. 모돈에서는 돼지회충과 대장발란티디움의 감염이 높고, 자돈에서는 주로 *Isospora suis* 콕시듐의 감염이 높았다 (표 4).

Table 4. The endoparasitic distribution of swine classified by developmental stage and chamber in Kyunggido

| 구분  | 돈방수 | 검사<br>두수 | 돼지회충  | 돼지편충 | 분선충 | 대장<br>발란티디움 | 콕시듐 | 계(%)     |
|-----|-----|----------|-------|------|-----|-------------|-----|----------|
| 모 돈 | 63  | 63       | 9(3)  | (1)  | (3) | 13(5)       |     | 20(31.7) |
| 자 돈 | 38  | x 50     | 1     |      |     |             | 2   | 3(7.9)   |
| 육성돈 | 30  | x 30     | 1     |      |     | 2           |     | 3(10.0)  |
| 총 계 | 131 | 2863     | 11(3) | (1)  | (3) | 15(5)       | 2   | 26(19.8) |

충남 및 전남 지역의 양돈장에서 8두의 모돈, 12돈방의 자돈과 육성돈 등을 대상으로 분변검사를 실시한 결과 16.7%의 감염율을 보였으며, 육성돈에서 33.3%로 가장 높은 감염율을 나타내었고 자돈에서는 전혀 검출되지 않았다. 이 지역에서 선충류의 감염율이 낮은 것은 매년 봄과 가을에 년 2회의 구충을 실시하기 때문으로 밝혀졌다. 그러나 위 성적에서 보다시피 년 2회의 구충이 모든 기생충의 감염을 예방하지는 못하는 것으로 알려졌다 (표 5).

Table 5. The endoparasitic distribution of swine classified by developmental stage and chamber in Chungcheongnamdo and Jeonlabukdo

| 구 분 | 돈방수 | 검사두수 | 돼지회충 | 분선충  | 대장<br>발란티디움 | 계(%)    |
|-----|-----|------|------|------|-------------|---------|
| 모 돈 | 8   | 8    |      | 1    |             | 1(12.5) |
| 자 돈 | 12  | x 50 |      |      |             |         |
| 육성돈 | 12  | x 30 | 1    | 1(1) | 3(1)        | 4(33.3) |
| 미 상 | 4   |      |      |      | 1           | 1(25.0) |
| 총 계 | 36  | 968  | 1    | 2(1) | 4(1)        | 6(16.7) |

나. 제 2 차년도(1997)

2차년도에 조사된 총 두수는 4,716두로써 총 410두가 각종의 내외부기생충에 감염되어 8.7%를 나타내어 전년도보다 낮은 감염율을 보였으며, 돼지회충 (229두, 4.8%), 콕시딕 (69두, 1.4%), 대장발란티디움 (65두, 1.4%) 및 외부기생충 (47두, 1.0%) 등의 순으로 높은 감염율을 보였다. 돼지의 발육단계별로는 모돈이 기생충 감염율이 높아 20.1% (58두)로 매우 높았으며, 자돈이 9.0% (59두), 육성돈이 7.4%(279두)의 감염율을 보였으나 검사두수가 매우 적었다. 이는 모든 돈군에서 구충효능시험을 실시하기 위하여 기생충이 감염되었을 만한 양돈장을 대상으로 하여 모돈에서 매우 높았고 육성돈에서는 전년도보다 낮은 성적을 나타낸 것이 육성돈 사료에 구충

제의 첨가가 광범위하게 실시되어 가고 있어서 이러한 결과를 가져온 것으로 추정된다 (표 6).

돼지의 발육단계별로는 모돈이 기생충 감염율이 28.5% (57두)로 매우 높았으며, 육성돈이 16.2% (581두), 자돈이 15.0% (681두) 순으로 나타났다 (표 6).

Table 6. The endo/ectoparasitic distribution of swine classified by developmental stage in Korea(1997)

| 구 분   | 검 사<br>두 수 | 돼지회충     | 대 장<br>발란티디움 | 콕시듐     | 외 부<br>기생충 | 계(%)     |
|-------|------------|----------|--------------|---------|------------|----------|
| 모 돈   | 289        | 44(15.2) | 1(0.3)       | 10(3.5) | 3(1)       | 58(20.1) |
| 자 돈   | 655        | -        | -            | 59(9.0) | -          | 59(9.0)  |
| 육성돈   | 3765       | 185(4.9) | 64(1.7)      | 0(0.0)  | 30(0.8)    | 279(7.4) |
| 총계(%) | 4716       | 229(4.8) | 65(1.4)      | 69(1.4) | 47(1.0)    | 410(8.7) |

다. 제 3 차년도(1998)

3차년도에 조사된 총 두수는 1,838두로써 총 178두가 각종의 내외부기생충에 감염되어 9.7%를 나타내어 전년도보다 높은 감염율을 보였으며, 돼지회충 (69두, 3.8%), 콕시듐 (50두, 2.7%), 대장발란티디움 (30두, 1.6%) 및 외부기생충 (29두, 1.6%) 등의 순으로 높은 감염율을 보였다. 돼지의 발육단계별로는 모돈이 기생충 감염율이 11.6% (38두)로 매우 높았으며, 육성돈이 9.4% (121두)의 감염율을 보였고, 자돈이 7.7% (16두)의 감염율을 보였다. 옹돈이 42.9% (3두)의 가장 높은 감염율을 보였으나 검사두수가 매우 적었다. 이는 이제까지의 구충이 선충을 대상으로 해왔기 때문에 돼지회충의 감염율은 감소 하였으나 원충 및 외부기생충의 감염율이 높아져, 전체적인 감염율의 상승을 가져왔다고 추정된다. 따라서 앞으로는 자돈에서의 원충성 기생충과 육성돈에서의 외부기생충의 구제에 관심을 기울여야 할 것으로 사려된다 (표 7).

Table 7. The endo/ectoparasitic distribution of swine classified by developmental stage in Korea(1998)

| 구 분   | 검 사<br>두 수 | 돼지회충    | 대 장<br>발란티디움 | 콕시듐     | 외 부<br>기생충 | 계(%)     |
|-------|------------|---------|--------------|---------|------------|----------|
| 모 돈   | 328        | 15(4.6) | 1(0)         | 12(3.7) | 10(3)      | 38(11.6) |
| 용 돈   | 7          |         |              |         | 3(42.9)    | 3(42.9)  |
| 자 돈   | 209        |         | 16(7.7)      |         |            | 16(7.7)  |
| 육성돈   | 1294       | 54(4.2) | 13(1)        | 38(2.9) | 16(1.2)    | 121(9.4) |
| 총계(%) | 1838       | 69(3.8) | 30(1.6)      | 50(2.7) | 29(1.6)    | 178(9.7) |

이상의 3년간의 국내 양돈장에서 돼지의 기생충 검사결과는 장 등 (1991)은 수원근교 톱밥발효돈사에서 83.3 %의 원충 (발란티디움, 콕시디아, 아메바) 감염율을 보고하였으며, 장(1975)은 기업양돈이 시작되기 이전 충북지방의 일반농가의 돼지에서 66.6 %의 발란티디움, 55.4 %의 아메바, 22.5 %의 콕시디아 감염율을 보고하였고, 강 등 (1989)은 기업양돈장에서 57.7 %의 발란티디움 및 19.7 %의 콕시디아 감염율을 보고, 장 등 (1991)은 수원근교 톱밥 발효돈사에서 70.0 %의 선충류 (돈회충, 돈편충, 돈장결절충, 홍색모양선충, 란숨간충)의 감염율을 보고하였으며, 장 (1975)은 기업양돈이 시작되기 이전 충북지방의 일반농가의 돼지에서 29.1 %의 돈장결절충, 25.6%의 돈회충, 14.6 %의 홍색모양선충, 7.1 %의 분간충, 4.2 %의 돈편충 및 17.6 %의 돈폐충 감염율을 보고하였고, 강 등 (1989)은 기업양돈장에서 14.8 %의 돈장결절충, 4.2%의 돈회충, 0.2 %의 홍색모양선충, 0.3 %의 분간충, 4.1 %의 돈편충 감염율을 등의 보고에서 나타난 감염율보다 매우 낮게 나타났다. 이는 첫째, 양돈장이 대규모화, 기업화되면서 정기적으로 구충을 하기 때문으로 사려된다. 둘째, 돈사의 형태가 재래식 돈사에서 현대식으로 바뀌고 일시적으로 유행하던 톱밥 돈사가 거의 대부분 콘크리트 돈사로 바뀌었기 때문이다. 그리고 사양가들의 사고가 점점 더 위생적이고 기생충에 대한 인식이 넓어짐으로써 앞으로 더욱 줄어들 것으로 추정된다.

## 2. 돼지 기생충 구충제 치료 실험

### 가. 선충류에 대한 구충효능

돼지 장내 선충류에 대한 구충효능을 실시한 결과 표 8-에 나타난 바와 같다.

#### 1) 야외시험

위 양돈장은 기생충 검사 의뢰 1주일 전에 내부기생충에 대한 구충제와 1일 전에 외부기생충 구충제를 투여한 후에 조사된 성적으로 구충 전에 기생충에 의한 질병상태가 매우 심각하게 인식되어 약제를 투여한 결과이다. 물론 구충제 투약전의 검사 성적이 제시되면 그 농장의 오염도나 구충효능에 대한 평가가 잘 이루어질 수 있을 것으로 사려되나 앞으로 정기적인 검사와 구충 프로그램에 의한 방역대책에 의하여 좋은 자료가 될 것으로 추정된다. 구충으로 인한 선충류의 감소는 뚜렷한 것으로 판단되나 외부 기생충에 대한 구충은 1일밖에 지나지 않아 모돈에서 23.1%의 높은 검출율을 보인 것으로 추정된다. 이 양돈장에 대하여 투약 후 9주일까지 계속하여 기생충의 감염여부를 조사하였다 (표 8).

Table 8. The effects of drug O and S against parasite after 1 weeks in Kyunggido Yong-in area

| 구 분 | 돈방수 | 검사두수 | 돼지회충 | 돼 지<br>장결절충 | 콕시듐 | Mite | 계(%)     |
|-----|-----|------|------|-------------|-----|------|----------|
| 모 돈 | 26  | 26   | 1(1) |             |     | 6(1) | 6(23.1)  |
| 자 돈 | 12  | x 50 | 2    | 1           |     |      | 3(25.0)  |
| 육성돈 | 48  | x 20 |      |             | 1   |      | 1(2.1)   |
| 총 계 | 86  | 1586 | 3(1) | 1           | 1   | 6(1) | 12(14.0) |

치료 후 모돈과 자돈에서는 3주일부터 9주일까지 돼지회충이나 돼지편충 등, 또는 Mite의 감염이 관찰되지 않았으며 육성돈에서는 3주일부터 5주일까지 관찰되지 않았다(표 9).

Table 9. The effects of drug O and S against parasite after 3 weeks in Kyunggido Yong-in area

| 구 분 | 돈방수 | 검사두수 | 돼지회충 | 돼지편충 | 돼 지<br>장결절충 | 분선충 | Mite | 계(%)   |
|-----|-----|------|------|------|-------------|-----|------|--------|
| 모 돈 | 26  | 26   | -    | -    | -           | -   | -    | 0(0.0) |
| 자 돈 | 12  | x 50 | -    | -    | -           | -   | -    | 0(0.0) |
| 육성돈 | 48  | x 20 | -    | -    | -           | -   | -    | 0(0.0) |
| 총 계 | 86  | 1586 | -    | -    | -           | -   | -    | 0(0.0) |

구충 간격에 의한 예방 프로그램을 작성하고자 기생충이 심오염된 양돈장으로 경기도 평택 지역의 양돈장을 선정하여 구충하기 전에 기생충의 감염을 조사한 결과 육성돈에서는 44.4%의 높은 감염율을 보였고 자돈에서는 21.1%의 감염율을 보였다. 특히 돼지 회충의 감염이 높은 편이었다. 2차에 걸쳐 기생충의 감염여부를 조사한 후 투약하여 구충효능에 대한 평가를 실시하였다(표 10).

Table 10. The effects of drug L and O against parasite before administration in Kyunggido Pyung-taek area

| 구 분 | 돈방수 | 검사두수 | 돼지회충 |      | 돼지편충 |      | 돼 지 분선충 | 콕시듐      | 계(%) |
|-----|-----|------|------|------|------|------|---------|----------|------|
|     |     |      | 장결절충 | 장결절충 | 장결절충 | 장결절충 |         |          |      |
| 모 돈 | 5   | 5    |      |      |      |      |         |          |      |
| 자 돈 | 19  | x 10 | 2    |      |      |      | 2       | 4(21.1)  |      |
| 육성돈 | 18  | x 50 | 6(2) | (2)  |      |      | 1 (2)   | 8(44.4)  |      |
| 총계  | 42  | 1095 | 8(2) | (2)  |      |      | 1 4(2)  | 12(28.6) |      |

선충류 구충제인 L 및 O 약제를 처치하고 주별로 기생충 증란의 유무를 관찰한 결과 투약 1주일 후에는 증란이 관찰되었으나 3주일 후부터는 관찰되지 않았다 (표 11).

Table 11. The effects of drug L and O against parasite after administration in Kyunggido Pyung-taek area

| 구 분 | 돈방수 | 검사두수 | 기생충  | 투약후 주별 증란 양성율(%) |   |   |   |      |
|-----|-----|------|------|------------------|---|---|---|------|
|     |     |      |      | 1                | 3 | 5 | 7 | 9(주) |
| 자 돈 | 19  | x 10 | 돼지회충 | 10.1             | 0 | 0 | 0 | 0    |
| 육성돈 | 18  | x 50 | 돼지회충 | 16.7             | 0 | 0 | 0 | 0    |
|     |     |      | 돼지편충 | 10.1             | 0 | 0 | 0 | 0    |
| 총 계 | 37  | 1090 |      | 10.8             | 0 | 0 | 0 | 0    |

국내 시판 광범위 구충제와 새로운 구충제의 효능을 평가하기 위하여 경기도 안성 지역의 종돈장에서 내외부 기생충의 분포를 조사한 결과 36.8%의 높은 감염율을 보였으며, 모돈에서는 대장 발란티디움, 돼지회충, 콕시듐 및 응애류가, 자돈에서는 콕시듐이, 그리고 웅돈에서는 대장발란티디움이 주로 감염되었다 (표 12).

Table 12. The effects of drug I and D against parasite before administration in Kyunggido An-sung area

| 구분 | 돈방수 | 검사두수 | 돼지<br>회충 | 돼지<br>편충 | 돼지<br>장결절충 | 분선충 | 대장<br>발란티디움 | 콕시듐 | Mite | 계(%)     |
|----|-----|------|----------|----------|------------|-----|-------------|-----|------|----------|
|    |     |      |          |          |            |     |             |     |      |          |
| 모돈 | 68  | 68   | 4(1)     | 15(2)    |            |     |             | 6   | 3(1) | 26(38.2) |
| 자돈 | 13  | x 30 |          |          |            |     |             | 4   |      | 4(30.8)  |
| 응돈 | 14  | 14   | 1        | 4        |            |     |             |     |      | 5(35.7)  |
| 총계 | 95  | 472  | 5(1)     | 19(2)    |            |     |             | 10  | 3(1) | 35(36.8) |

선충류 구충제인 I 및 D 약제를 처치하고 주별로 기생충 총란의 유무를 관찰한 결과 투약 1주일 후에는 7.3%의 총란 또는 총체가 관찰되었으나 3주일 후부터 9주일까지는 관찰되지 않았다 (표 13).

Table 13. The effects of drug I and D against parasite after administration in Kyunggido An-sung area

| 구분 | 돈방수 | 검사두수 | 기생충  | 투약후 주별 총란 양성율(%) |   |   |   |      |
|----|-----|------|------|------------------|---|---|---|------|
|    |     |      |      | 1                | 3 | 5 | 7 | 9(주) |
| 자돈 | 68  | 68   | 돼지회충 | 4.4              | 0 | 0 | 0 | 0    |
|    |     |      | 개선충  | 2.9              | 0 | 0 | 0 | 0    |
| 응돈 | 14  | 14   | 돼지회충 | 7.1              | 0 | 0 | 0 | 0    |
| 총계 | 82  | 82   |      | 7.3              | 0 | 0 | 0 | 0    |

국내 시판 광범위 구충제와 새로운 구충제의 효능을 평가하기 위하여 경기도 안성 지역의 종돈장에서 내외부 기생충의 분포를 조사한 결과 36.8%의 높은 감염율을 보였으며, 모돈에서는 대장발란티디움, 돼지회충, 콕시듐 및 응애류가, 자돈에서는 콕시듐이, 그리고 응돈에서는 대장발란티디움이 주로 감염되었다 (표 14).

Table 14. The effects of drug B against parasite after administration in Kyunggido kim-po area

| 구분  | 돈방수 | 검사두수 | 돼지 회충 | 돼지 편충 | 돼지 장결절충 | 분선충 | 대장 발란티디움 | 룩시듬 | Mite | 계(%) |
|-----|-----|------|-------|-------|---------|-----|----------|-----|------|------|
| 모 돈 | 30  | 30   | -     | -     | -       | -   | -        | -   | -    | -    |
| 자 돈 | 18  | x 20 | -     | -     | -       | -   | -        | -   | -    | -    |
| 비육돈 | 45  | x 10 | -     | -     | -       | -   | -        | -   | -    | -    |
| 총 계 | 93  | 840  | -     | -     | -       | -   | -        | -   | -    | -    |

기생충의 감염이 확인된 양돈장의 비육돈, 모돈 및 자돈에 대하여 선충류인 돼지회충과 외부기생충에 대하여 최근 내부 선충류와 외부기생충인 옴이나 진드기 등에 효능이 가장 우수한 구충제로 알려진 I 약제의 한 구충효능을 시험하였다. 최근에 비육돈의 전기사료에는 대개가 구충제가 첨가되어 있어 기생충에 감염된 돈군을 찾기가 힘들고 감염율도 매우 낮은 편이며 비육 말기 경에나 감염돈이 검출되는 편이었다. 양돈장에서 비육돈을 대상으로 기생충의 유무를 검사하여 각 돈방당 3개의 시료중 최소한도 1개 1이상이 총란양성으로 나오는 돈방을 대상으로 그 돈방내에 있는 모든 비육돈에 대하여 투약시험을 실시하였다. I 약제 투약구는 9의 돈방의 비육돈들을 그리고 대조구는 2개의 돈방의 비육돈들을 시험에 공시하여 실시하였다. 시험중 폐사된 비육돈은 없었으며, 설사는 관찰되지 않았다. 총란양성율이 33%인 것은 각각의 돈방마다 3개의 분변을 취하여 그 중에서 1개의 분변시료에서 총란이 검출된 것을 말함이며, 시험구별 총란양성율은 투약 1주일 후에 감염대조구 33%에 대하여 I 약제 투약구는 0%이었으며, 투약 2주일 후에는 대조구 50%에 대하여 모든 투약구에서 관찰되지 않았다. 성충의 배출율은 투약 후 기생충이 배출된 개체의 전체 두수에 대한 비율을 말하며, 집단 사육되는 돈군에서 개체의 총체 배출은 분변 덩어리별로 회충의 총체가 들어있는 것을 관찰하여 추정하였으며, 대조구는 기생충의 배출을 관찰할 수 없었으나 투약구는 모두 28.7%의 배출율을 보였다. 모든 투약구에서 모든

실험에 공시된 돼지는 투약 후 주사부위의 염증반응, 발열반응, 신경증상 및 그 밖의 비정상적인 행동이나 외모 등이 관찰되지 않았다 (표 15).

Table 15. The antiparasitic effects of drug I in growing pig (endoparasites)

| 공시약제 | 시험<br>두수 | 충란양성(%)  |          |         |         | 충란<br>음전<br>율(%) | 성충<br>배출(%)  |
|------|----------|----------|----------|---------|---------|------------------|--------------|
|      |          | 0주       | 1주       | 2주      | 3주      |                  |              |
| I    | 135      | 7/27(33) | 3/27(11) | 0/27(0) | 0/27(0) | 100              | 35/135(26.7) |
| 대조구  | 30       | 2/6(33)  | 2/6(33)  | 3/6(50) | 3/6(50) | 0                | 0/30(0)      |

모든 모돈에서 시험 개시전이나 투약 후 1, 2 및 3주일에 설사는 관찰되지 않았으며, 충란양성율은 대조구가 35-40%에 비하여 I 약제 투약구에서는 투약전 33%에서 투약후 1주일에는 8.8%, 2주일에는 1.2%, 그리고 3주일 후에는 관찰되지 않았다. 총체의 배설은 I 약제 투약구에서 투약 후 2일부터 배설되기 시작하여 13일 만에 종료되었다. 그리고 외부기생충은 글리세린도말 피부도말 검사법을 써서 검사할 수 있으나 그 검출율이 매우 낮아 구충전과 후 피부의 병변과 돈사 칸막이에 비벼대는 상태의 변화로 파악하였으며 투약 후 1, 2, 3주일에 관찰한 결과 대조구에서는 모돈들이 때때로 칸막이에 비벼대나 투약구에서는 전혀 관찰되지 않았다. 투약 후 2주일에 방문하였을 때 문 앞의 투약구의 돼지들이 칸막이에 비벼대기에 구충이 안되었나 하고 놀랐으나 농장주께서 담배를 피우고 있어 담배연기를 맡으면 비벼대는 습성이 있다며 확인시켜 주어 안심하였다. 모든 투약구에서 모든 실험에 공시된 돼지는 투약 후 주사부위의 염증반응, 발열반응, 신경증상 및 그 밖의 비정상적인 행동이나 외모 등이 관찰되지 않았다 (표 16).

Table 16. The antiparasitic effects of drug I in sow

| 공시약제 | 시험<br>두수 | 충란양성(%)   |           |           |          | 충란<br>음전<br>율(%) | 성충<br>배출<br>율(%) | 외부<br>기생<br>충(%) |
|------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|------------------|------------------|------------------|
|      |          | 0주        | 1주        | 2주        | 3주       |                  |                  |                  |
| I    | 80       | 26/80(33) | 7/80(8.8) | 1/80(1.2) | 0/80(0)  | 100              | 40               | 100              |
| 대조구  | 20       | 8/20(40)  | 8/20(40)  | 7/20(35)  | 8/20(40) | 0                | 0                | 0                |

이상의 결과로 미루어 국내에 시판중인 대부분의 구충제는 국내 양돈장에서 주로 발생하고 있는 선충류인 돼지회충과 돼지편충 등에 대하여 우수한 구충효과를 가지고 있으므로 적절한 시기에 구충제를 투여한다면 기생충에 의한 질병 문제는 해결할 수 있을 것으로 사려된다.

## 2) 인공감염시험

모든 시험구에서 폐사는 없었고 설사도 나타나지 않았다. 투약 후 I 약제 투약구에서는 모든 시험돈들이 1~8일 사이에 충체의 배설을 관찰하였으며 대조구에서는 충체의 배설을 관찰할 수 없었다. 투약 5주일 후 모든 시험돈들을 부검하여 충체의 유무를 확인한 결과 대조구에서는 모든 시험돈들의 소장내에서 다수의 회충이 관찰되었으나 모든 투약구에서는 충체가 관찰되지 않았다. 특히 자충에 대한 구충효과를 보기 위하여 투약시와 투약 1~5주전에 각각 50개 정도의 감염기자충을 함유한 돼지회충란과 돼지편충란을 인공감염시켰으나 모든 투약구에서는 충체가 전혀 관찰되지 않아 자충에 대한 구충효과도 가지고 있는 것으로 사려된다. 시험개시에 시험돈의 각 개체별 체중은 계측하였으나 종료시 개체별 체중은 사료의 제한 급여로 증체량에 대한 성적이 의미가 없으므로 계측하지 않았다. 모든 투약구에서 모든 실험에 공시된 돼지는 투약 후 주사부위의 염증반응, 발열반응, 신경증상 및 그 밖의 비정상적인 행동이나 외모 등이 관찰되지 않았다 (표 17).

Table 17. The antiparasitic effects of drug I to artificial infected swine with endoparasites

| 공시약제 | 시험 | 충체의 배설   | 부검결과  |
|------|----|----------|-------|
|      | 두수 |          |       |
| I    | 30 | 투약후 1~8일 | 충체 없음 |
| 대조구  | 7  | -100%    | 회충감염  |

가) 돼지회충(*Ascaris suum*) 인공감염시험

비육돈에 대한 인공감염 시험결과 충란검사에 의한 시험구별 양성율은 시험개시 시기에는 돼지회충이 모든 시험구에서 100의 충란 검출율을 보였다. 투약 후 1주일령에는 대조구가 돼지회충 80% 양성율을 보인 반면에 I 약제 투약구는 돼지회충 57%의 양성율을 보였고 투약 2주일 후부터 5주일까지는 대조구가 돼지회충 80~100%의 양성율을 보인 반면 투약구에서 돼지회충의 충란은 전혀 검출되지 않았다(표 18).

Table 18. The antiparasitic effects of drug I to artificial infected swine with endoparasites

| 공시약제 | 시험<br>두수 | 충란양성(%)    |           |          |         |         |         | 충란<br>음전<br>율(%) |
|------|----------|------------|-----------|----------|---------|---------|---------|------------------|
|      |          | 0주         | 1주        | 2주       | 3주      | 4주      | 5주      |                  |
| I    | 30       | 30/30(100) | 17/30(57) | 0/30(0)  | 0/30(0) | 0/30(0) | 0/30(0) | 100              |
| 대조구  | 7        | 7/7(100)   | 6/7(86)   | 7/7(100) | 6/7(86) | 6/7(86) | 6/7(86) | 0                |

시험돈에 대한 분변검사 결과 시험개시일인 투약일에는 모든 개체에서 충란이 검출되었으며 개체별 분변 g당 충란수는 돼지회충이 100~10,566개의 충란이 관

찰되었다. 투약 후 대조구에서는 지속적으로 총란의 배설을 관찰할 수 있었으나 투약구에서는 투약 1주일 후에 모든 시험돈들이 총란의 배설이 급격히 감소하였으며 2주일 후에는 전혀 관찰되지 않았다 (표 19).

Table 19. The antiparasitic effects of drug I to artificial infected swine with endoparasites - EPG counting

| 공시약제 | 시험<br>두수 | EPG(Mean ± SD) |         |          |         |         |         |
|------|----------|----------------|---------|----------|---------|---------|---------|
|      |          | 0주             | 1주      | 2주       | 3주      | 4주      | 5주      |
| I    | 30       | 2374±1715      | 106±58  | 0±0      | 0±0     | 0±0     | 0±0     |
| 대조구  | 7        | 2069±1121      | 971±551 | 1058±904 | 483±348 | 248±216 | 410±374 |

나) 돼지편충 인공감염시험

비육돈에 대한 인공감염 시험결과 총란검사에 의한 시험구별 양성율은 시험개시 시기에는 돼지편충은 모든 시험구에서 20~100%의 양성율을 보였다. 투약 후 1주일령에는 대조구가 돼지편충 40%의 양성율을 보인 반면에 I 약제 투약구는 돼지편충 13%의 양성율을 보였고 투약 2주일 후부터 5주일까지는 대조구가 돼지편충 0~60%의 양성율을 보인 반면 투약구에서 돼지편충의 총란은 전혀 검출되지 않았다(표 20).

Table 20. The antiparasitic effects of drug I to artificial infected swine with endoparasites -Excretion of egg

| 공시약제 | 시험<br>두수 | 총란양성율(%)  |          |         |         |         |         | 총란<br>음전<br>율(%) |
|------|----------|-----------|----------|---------|---------|---------|---------|------------------|
|      |          | 0주        | 1주       | 2주      | 3주      | 4주      | 5주      |                  |
| I    | 30       | 25/30(83) | 4/30(13) | 0/30(0) | 0/30(0) | 0/30(0) | 0/30(0) | 100              |
| 대조구  | 7        | 2/7(29)   | 4/7(57)  | 6/7(86) | 2/7(29) | 0/7(0)  | 0/7(0)  | 0                |

시험돈에 대한 분변검사결과 시험개시일인 투약일에는 모든 개체에서 충란이 검출되었으며 개체별 분변 g당 충란수는 돼지편충이 0~215개의 충란이 관찰되었다. 투약 후 대조구에서는 지속적으로 충란의 배설을 관찰할 수 있었으나 투약구에서는 투약 1주일 후에 모든 시험돈들이 충란의 배설이 급격히 감소하였으며 2주일 후에는 전혀 관찰되지 않았다 (표 21).

Table 21. The antiparasitic effects of drug I to artificial infected growing pig with endoparasites - EPG counting

| 공시약제 | 시험<br>두수 | EPG(Mean ± SD) |         |           |          |       |       |
|------|----------|----------------|---------|-----------|----------|-------|-------|
|      |          | 0주             | 1주      | 2주        | 3주       | 4주    | 5주    |
| I    | 30       | 99 ± 24        | 21 ± 18 | 0 ± 0     | 0 ± 0    | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| 대조구  | 7        | 25 ± 56        | 53 ± 77 | 174 ± 259 | 98 ± 218 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |

나. 포유자돈 콕시듐증에 대한 치료시험

경기도 이천 지역의 2개의 종돈장에서 포유자돈의 *Isospora suis* 콕시듐 감염율을 조사한 결과 일령에 따라서 약간의 차이는 있으나 25.5~48.9%의 높은 감염율을 보였으며, 감염정도도 400~550,000까지 다양한 오오시스트의 배설수준을 보였다(표 22).

Table 22. *Coccidium* infection rate and excretion of oocyst in suckling pig

| 지 역 | 검사복수 | 일령 | 감염복수(%)  | OPG 계산*(범위)              |
|-----|------|----|----------|--------------------------|
| 이 천 | 45   | 3  | 22(48.9) | 3.65 ± 3.64(400~18000)   |
|     | 42   | 14 | 14(33.3) | 4.65 ± 4.97(700~550000)  |
|     | 47   | 21 | 12(25.5) | 4.25 ± 4.30(1500~110000) |

\* : OPG는 log<sub>10</sub>으로 환산된 수치임

B 약제가 포유자돈의 체중에 미치는 영향을 조사하기 위하여 투약후 대조구와 비교한 결과, 각 시험군의 체중은 투약시기인 3일령에는 비슷한 수준이었으나, 투약후 11일과 18일 후에는 투약구가 대조구보다 높게 나타났다. B 약제가 포유자돈의 증체량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3일령에 투약한후 대조구와 비교한 결과, 전 시험기간의 증체량은 대조구에 비하여 0.28kg의 증체 개선효과가 있었으며 95% 수준에서 유의차가 인정되었다. 특히, 투약시인 3일령부터 14일령까지의 증체량은 투약구가 대조구보다 95% 수준에서 유의차있게 높았으나, 14일령부터 21일령 사이에는 유의차가 인정되지 않았다 (표 23).

Table 23. The growing weight in control and administration of drug B

| 시험구 | 증체량(Kg)    |           |            | 비 고 |
|-----|------------|-----------|------------|-----|
|     | 3~14       | 14~21(일령) | 소 계        |     |
| 대조구 | 1.91±0.75  | 1.44±0.54 | 3.35±1.02  |     |
| 시험구 | 2.06±0.71* | 1.57±0.52 | 3.63±1.04* |     |

\* : 유의차 있음(p<0.05)

각 시험농장에서 매일 설사를 가져오는 돈방과 정도를 조사하여 5일간씩의 설사빈도 (frequency of diarrhea)와 설사정도 (score of diarrhea)를 정리하여 통계처리한 결과 투약구는 대조구에 비하여 95% 수준에서 유의차 있게 낮은 빈도와 정도의 설사를 보였으며, 특히 투약 9일후부터는 대조구에서 지속적이고 매우 심한 설사를 보인 반면 투약구에서는 거의 설사가 발생하지 않았다 (표 24).

Table 24. The diarrheal period and degree in control and administration of drug B

| 시험구 | 구분    | 설사 빈도 및 정도(%) |            |            |              | Total         |
|-----|-------|---------------|------------|------------|--------------|---------------|
|     |       | 1~5           | 6~10       | 11~15      | 16~21(일령)    |               |
| 대조  | 설사/두수 | 14/100(14)    | 28/100(28) | 45/100(45) | 49/120(40.8) | 136/420(32.4) |
|     | 설사정도  | 0.23±0.39     | 0.48±0.53* | 0.86±0.44* | 0.78±0.48*   | 0.70±1.05*    |
| 투약  | 설사/두구 | 7/100(7)      | 6/100(6)   | 16/100(16) | 30/120(25)   | 59/420(14.0)  |
|     | 설사정도  | 0.17±0.41     | 0.11±0.29  | 0.26±0.33  | 0.49±0.49    | 0.27±0.41     |

\* : 유의차 있음(p<0.05)

오오시스트의 배설수준을 조사하기 위하여 7~9일, 11~13일, 그리고 20~22일 사이에 분변을 수거하여 돈방별로 오오시스트의 유무 및 분변 g당 오오시스트의 배설 (OPG)을 조사한 결과 투약구가 대조구보다 낮은 양성을 나타냈으며, 특히 투약 1주일후부터는 투약구에서는 원충의 감염 (10~15%)이 대조구 (40~55%)와 비교하여 매우 낮은 수준으로 관찰되었다 (표 25).

Table 25. The excretion level of oocyst in suckling pig in control and administration of drug B

| 시험구 | 구 분        | 오오시스트의 배설(%) |           |             |
|-----|------------|--------------|-----------|-------------|
|     |            | 7-9          | 11-13     | 20-22(조사일령) |
| 대조구 | 감염구/시험구(%) | 11/20(55)    | 11/20(55) | 8/20(40)    |
|     | OPG 합계     | 4.73         | 5.36      | 5.27        |
|     | OPG(M±SD)  | 3.43±3.59    | 4.06±4.60 | 3.97±4.40   |
| 투약구 | 감염구/시험구(%) | 11/20(55)    | 2/20(10)  | 3/20(15)    |
|     | OPG 합계     | 4.64         | 4.02      | 4.88        |
|     | OPG(M±SD)  | 3.34±3.64    | 2.72±3.25 | 3.58±4.13   |

\* : OPG는 Log<sub>10</sub>으로 환산된 수치임

Martineau 등은 toltrazuril의 돼지 콕시듐증 치료 실험에서 오오시스트의 배설수준과 증체량에 있어서 5% toltrazuril 0.2ml, 0.4ml, 및 0.6ml의 투약 시험구가 대조구보다 매우 우수함을 보고하였고, Madsen 등은 돼지 콕시듐증에 대하여 두당 5% toltrazuril (Baycox) 1ml씩을 투약한 시험구가 대조구보다 체중이나 증체에서 유의성 있는 결과는 없었지만, 설사빈도, 설사정도 및 오오시스트의 배설수준은 유의차 있게 우수하였다고 하였으며, 또한 비슷한 실험에서 돼지 Kg당 toltrazuril을 10mg, 20mg 및 30mg씩 투약한 시험구가 20mg 및 30mg의 수준에서는 대조구보다 증체, 설사빈도, 설사정도 및 오오시스트의 배설수준 등이 유의차 있게 우수함을 보고하였다. 또한 Boulanger 등은 베네즈웰라에서 돼지에 대한 설사를 예방하고 치료하기 위하여 toltrazuril의 효과를 평가하여 마리당 toltrazuril을 20mg씩 투약한 시험구가 대조구보다 체중이나 증체에는 유의성 있는 결과를 얻지는 못하였지만 오오시스트의 배설수준은 유의차 있게 저하됨을 보고하였다.

이와 같이 외국에서도 실험에 따라 투약구와 대조구간의 증체량의 차이가 다양하게 나타났으나 설사빈도나 정도에서는 현저한 차이가 있었으며, 오오시스트의

배설수준 역시 차이가 많이 나타남을 볼 수 있다. 본 실험에서는 증체량과 설사빈도 및 정도, 그리고 오오시스트의 배설수준에서 대조구와 투약구간에 차이가 관찰됨을 볼 수 있었다. 그러므로 국내 종돈장에서 B 약제를 사용하면 포유자돈의 설사를 줄이고 증체량을 증가시켜 생산성을 많이 향상시켜줄 것으로 기대된다.

다. 자돈에서 외부기생충(웜)에 대한 구충제의 구충효과 시험

외부기생충에 대한 글리세린 피부도말 검사법이 검출율이 매우 낮아 구충전과 후 피부의 병변과 돈사 칸막이에 비벼대는 상태의 변화로 파악하였으며, 자돈에서 외부기생충인 천공개선충에 대한 구충효과 시험결과 시험약제 투약 후 3주일간의 증체량은 대조구의 5.9kg에 비하여 I 약제 투약구가 6.6kg으로 높았으며 피부 병변은 대조구가 시험 시작 전에는 0.58로 비교적 낮았으나 1주일과 3주일에 각각 1.67과 4.20으로 높이 증가한 반면 I 약제 투약구 투약구는 1.44의 높은 병변이 투약 후 급격히 감소하여 1주일 및 3주일에 각각 0.27과 0.15으로 유의차 있게 감소하였다(표 26). 외부기생충인 천공개선충은 검사법이 일반적으로 글리세린 피부도말 검사법이 사용되나 검출율이 매우 낮다. 피부를 박피하여 조직절편을 직접 도말하여 보거나 수산화 칼륨 (KOH)으로 연화시켜 보거나 또는 병리조직을 통하여 검사할 수 있으나 살아있는 동물에서는 적절하지 못한 방법이다. 그러므로 구충제를 적용함으로써 임상증상과 증체의 개선효과를 통하여 간접적으로 조사하였다.

Table 26. The antiparasitic effects of drug I in piglet (ectoparasites)

| 공시약제 | 시험<br>두수 | 체중(M±SD) |          |           | 증체량<br>B(3-0) | 외부기생충병변도          |                   |                   |
|------|----------|----------|----------|-----------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|      |          | 0주       | 1주       | 3주        |               | 0                 | 1                 | 3                 |
| I    | 90       | 6.6±0.57 | 8.7±0.57 | 13.2±0.60 | 6.6           | 1.44 <sup>b</sup> | 0.27 <sup>a</sup> | 0.15 <sup>a</sup> |
| 대조구  | 15       | 5.1±0.52 | 6.7±0.73 | 11.0±0.74 | 5.9           | 0.58 <sup>a</sup> | 1.67 <sup>b</sup> | 4.20 <sup>b</sup> |

p < 0.01

## 제 5 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

국내에서 분리한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 항원성의 변이가 다양하며, 국내 모돈에서 높은 양성률 (45.2%)을 밝혀졌다. 국내 분리 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스는 포유자돈에게 전형적인 간질성 폐렴을 유발한다. 임신모돈에게 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 접종한 결과 유산과 사산을 유발하는 국내 분리 바이러스도 있고, 유산과 사산을 유발하지 않는 국내 분리 바이러스도 있는 것으로 확인하였다. 또한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 진단에는 조직내 교잡법 (in situ hybridization)이 매우 유용한 것으로 확인되었다. 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 경우 바이러스의 항원성이 다양하기 때문에 현재 사용중인 상업백신이 농장마다 효과가 다르게 나타날 수도 있다. 국내 분리를 이용한 처음 실험적으로 포유자돈에서 간질성 폐렴을 유발하였다. 실험 감염 결과 국내 분리 바이러스도 전형적인 호흡기 질병을 유발하는 것으로 증명되었다. 또한 모돈에서 45.2%의 높은 혈청 양성률에도 불구하고 감염되는 바이러스에 따라서는 생식기 질환의 발생유무의 차이를 관찰할 수 있다. 이러한 관찰은 중요한 의미로서 농장에서 단지 ELISA 검사법 등을 이용한 혈청검사만으로 모돈에서의 생식기 질환을 진단한다면 많은 수의 오진이 유발될 수 있다. 자돈에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 진단하는 방법에는 바이러스의 직접 분리방법이 있는데, 분리 방법은 시간과 경비가 많이 소모될 뿐만 아니라 신선한 가검물을 의뢰해야 되는 단점이 있다. 본 연구를 통해 개발한 조직내 교잡법을 이용하면 바이러스 분리없이도 폐장 등의 장기에서 바이러스의 핵산을 검출할 수 있다. 또한 조직내 교잡법은 포르말린에 고정된 조직을 사용할 수 있으므로 검사 장기의 상태에 크게 영향을 받지 않는 장점이 있다.

PED는 많은 양돈국에서 보고되어지고 있다. 국내에서는 수의과학연구소의 권창희 박사가 KPEDV의 분리를 보고하였다. 이전에 coronavirus로 분류되었던 PED 원인체로서 PEDV는 1978년에 Penasert와 Debouck에 의해 현미경적 성상과 폴리펩타이드 구성물의 결과로 최초로 보고가 되었다. Genus coronavirus는 형태가

다양하다. 1933년에 닭에서 최초로 분리가 된 이후로, Tyrerell과 Byone(1965)는 최초로 사람의 coronavirus를 in vitro에서 증식시키기 위해 human ciliated embryonic trachea에 배양하였다. 현재 이 family에는 13종이 알려져 있으며 이는 사람 뿐만 아니라 소, 돼지, 설치류, 고양이, 조류에 감염된다. Negative stain시 coronavirus입자는 구형으로 형태가 다양하고 중등도로 electro-lucent하며 지름이 75-160nm정도이다. 명확한 envelope의 돌기가 coronavirus의 입자 표면에 퍼져 있다. 일반적으로 20nm정도의 길이로 club모양이나 돌기의 수, 모양, 크기는 바이러스 strain에 따라 다양하다. 따라서 coronaviridae과의 바이러스들의 분류는 주로 negatively stained particle의 전자현미경적 형상에 근거한다. 본 연구에서도 negative stain과 SPIEM을 이용하여 표준 PEDV와 분리를 시도한 PEDV모두 전형적인 coronavirus의 형태가 확인 되었다. PEDV는 TGEV가 자라는 돼지세포에서 자라지 못한다. 바이러스를 증식하는 방법으로 10년전에 heterologous Monkey cell line이 최초로 기술되었다. 이전에 Kusanagi. et. al에 의해 보고된 것처럼 배양 medium에 trypsin을 첨가함으로써 bovine coronavirus의 분리를 촉진한다는 것이 보여졌다. Trypsin을 이용하여 coronavirus의 E2 glycoprotein을 제거하면 virus의 흡수와 침투력이 증가하였다. 물론 MM에서 trypsin의 존재는 PEDV의 복제를 위해서도 필요하다. 그러나 in vivo에서 CV777의 복제를 위한 protease의 source로써 bacterial flora가 필요한 것은 아니다. Kusanagi등은 HmLu, BHK, QE, CRFK, FL cell lines 등 다른 세포들이 trypsin의 cytotoxic action에 의해 심하게 피해를 입으며 culture에 trypsin을 포함한 MM 첨가 후, 3시간 이상을 유지할 수 없다는 것을 보고하였다. PEDV의 성공적인 분리는 trypsin의 cytotoxic action에 대한 배양세포의 저항성에 의존할 것이다. 본 실험에서 우리는 confluent Vero cell에서 10 $\mu$ g/ml trypsin과 항생제를 첨가한 EMEM을 이용하여 CV777을 배양하고 분리하는 데 성공하였다. 그러나 야외주의 경우에는 특이한 CPE를 보이지 않아서 분리하는데 어려움이 따랐다. 따라서 본 연구에서는 설사를 보이는 돼지로부터 Vero cell에 blind passage를 하여 분리하고자 시도 하였는데 면역전자현미경에서 확인한 결과 계대는 되는 것으로 밝혀졌다.

간단한 진단 방법의 결핍으로 인해 오랫동안 PEDV가 돼지에서 설사를 일으키는 원인으로 평가되는 것이 어려웠다. 전자현미경학적, 형광항체법, ELISA 같은 진단기

법이 최근에 보고되었는데 권등이 보고한 바에 따르면 형광항체법을 통해 PEDV에 감염된 양성 개체에 대한 한국 전체에 걸친 지역적 분포를 나타내었다. 이중 양성 개체의 2/3가 2주령 이내의 자돈으로 판명되었고, 나머지는 비유, 육성돈에서 발견되었다. 급성의 설사를 보인 돼지의 역학조사 결과 17.5%가 PEDV의 감염에 의한 것으로 나타났다. 게다가 이 결과로 바이러스가 자돈에서는 치명적일 뿐 아니라, 2주령 이상의 자돈에서도 심한 설사를 야기한다는 것을 확립하였다. ELISA를 이용한 항체 검사에서 약 45%가 PEDV에 양성을 나타내었는데 이는 일부 지역에서의 PEDV의 감염이 풍토성이라는 것을 나타내어주고 있다. 본 연구에서도 ELISA법으로 확인한 결과 서울대수의대에 반입된 돼지들중 대부분의 돼지에서 PEDV의 항체가를 보였는데 이러한 사실은 정의 권등이 보고한 결과와 일치한다. 이와 같이 PEDV가 모든 연령의 돼지에서 장의 병변을 일으킬 수 있다는 사실은 한국에서 예상되는 것보다 더 많은 경제적 손실이 있을 것이라는 것을 의미한다.

최근에 PEDV의 leader sequence가 결정되었으며 이러한 결과를 이용한 역전사 중합효소 연쇄반응이 보고되었다. 이러한 방법들은 시간이 많이 소비될 뿐만 아니라 방법도 복잡하다. 그러나, 이러한 방법들에 비하여 SPIEM은 분변이나 장내용물에 적용할 수가 있다. Sait등은 homologous antibodies로 특별히 형성된 virion을 관찰하였고, Derrick에 의해 전자현미경적 방법이 보고되어졌다. 본 연구에서 수행된 SPIEM은 분변에서 TGEV를 검출하는데 설명된 방법을 일부 수정하여 이용되었다. 이러한 방법은 specific PEDV Ab와 protein-G를 갖는 EM grid 의 coating이 필요하다. 이전의 연구에서 이러한 SPIEM을 실행하는 데, 최적의 조건은 grid를 coating 하는 protein G를 1:200으로 희석하고 virus sample과 PAS Ab를 overnight incubation시키는 것이다. 이러한 방법은 농축이나 정제과정을 필요로 하지 않으며 crude sample에서 virus의 특이적인 trapping과 오염물질의 흡착을 막음으로써 PEDV의 검출 가능성을 매우 높여주었다. TGEV의 경우, 이와 같은 방법을 일반 전자현미경학적 방법보다 최소 100배 이상 민감도 (sensitivity)를 향상시켰다. 이번 실험에서 사용된 SPIEM은 특이성과 정확성을 향상시키기 위해 일부 수정을 하였다. TEM을 이용하여 검사할 때, 바이러스 입자는 다양한 형태를 나타내었으나 표면의 돌기가 있는 outline은 현저한 원형이었다. 많은 particles 은 projections이 없었는데

이것은 EM 준비과정 중 떨어져나간 것이라고 생각이 되어진다. CV777 strain particle은 gold particle로 부착되었다. N-PEDV와 실험감염으로부터 얻은 장내용물의 형태학적 검사 결과, coronavirus와 일치하는 전체적인 형태학적 특징을 나타내었다. SPIEM은 이런 모든 sample에 간단하게 적용할 수가 있다.

본 연구에서 수행한 동물접종실험에서 감염된 8마리 중 2마리가 접종 18시간부터 설사를 나타내었으나 이때 용모위축은 관찰되지 않았다. 접종 50에 모든 감염동물이 설사를 나타내기 시작했다. 접종 62 시간과 접종 71시간에 2마리의 동물이 매우 쇠약해졌고, 구토와 기립 불능을 나타내었다. 접종 100시간과 접종 110시간에 감염실험한 2마리의 동물이 죽었다. PED에 대한 진단과 PEDV 항체의 분포를 연구하는데 사용되고 있는 파라핀 포매한 조직에서의 PEDV에 대한 monoclonal antibody와 PAS antibody를 이용한 면역조직화학염색에서 cryostat는 필요치 않으며 이 sections을 적절한 세부적인 것을 보여주고 상대적으로 영구성을 갖는다. 그러므로 이 방법도 공장에서 PED에 대한 진단과 PEDV 항원의 분포에 대한 연구에 이용될 수 있다. 심한 용모위축을 보이는 자돈에서 PEDV는 장세포에 남아있기도 하고 이미 감염세포를 떠났을 수도 있다. 그러므로, PEDV 항원의 분포는 병의 단계에 따라 다양한 양상을 띠 수가 있다. 조직화학적으로 모든 4개의 효소는 감염된 자돈에서 좀더 열은 염색정도를 보인다. Kweon et al(1996)은 E.coli 와 coccidiosis가 자돈 설사의 중요한 원인으로 밝혀져 있으나, 신생자돈 설사의 20%이상의 PEDV 감염과 연관되어 있어 한국에서 중요한 경제적 손실을 유발하는 것을 밝혔다. 그럼에도 불구하고 현재까지 어떤 보호수단도 개발이 되지 않아 백신의 개발이 시급한 것으로 생각이 된다. 최근의 분자생물학적 연구로 ca-PEDV(Duarte et al. 1994)와 wt-PEDV의 genomic sequence 사이에는 눈에 띄는 차이가 존재하는 것이 밝혀졌다. 그러나, 이러한 nucleotide 배열의 차이가 생물학적 차이와 일치하는지는 명확하지 않다(Duarte et al. 1994). Coussement et al.(1982)에 따르면 실험적으로 ca-PEDV를 감염시킬 경우 용모의 위축이 가장 눈에 띄는 변화로 나타난다. 그러나, 이는 wt-PEDV에서 보고된 것보다 늦게 나타나고 덜 광범위한 것으로 보여진다. 추가적으로 wild type virus와 비교해 ca-PEDV는 현저하게 약독화되어 바이러스 복제는 지연되고 질병을 유발하는 능력도 감소하였으며 조직병리학적 변화가 덜 심하다

(Bernasconi et al. 1995) 또한 Kweon et al.(1996)은 ca-PEDV는 계대를 많이 할 경우, 병원성이 감소하여 생백신으로 약독화백신의 개발을 시도하고 있다. 이번 연구에서는 백신의 안전성과 효과를 측정하고자 생체 실험을 수행하였다. 백신을 근육에 주사한 후에 어떤 임상 증상도 관찰되지 않았기 때문에 본 연구에서 사용한 PEDV는 안전한 것으로 밝혀졌다. 그러나 혈청중의 항체가 측정의 결과는 예상처럼 좋은 결과가 나오지 않았다. 즉, 근육내 백신을 투여하였을 때 혈청항체는 TGE백신들과 함께 복합 투여한 군에서만 상승하였을뿐 다른 동물에서는 1차면역시 정도로 상승한 것 이외에는 2차추가접종시 상승하지 않았다. 그러나 이러한 결과는 ELISA에 의한 어느 정도의 혈청학적 결과 범위가 적당한 보호를 위한 실제 점막면역에 관련되어 있는지가 명확하지 않기 때문에 적당한 백신의 정확한 면역상태를 설명하기는 어렵다고 사료된다. 권등 (1996)이 보고한바에 따르면 모든 돼지에서 백신전보다 눈에 띄는 항체가의 증가는 관찰이 되지 않았지만 75%의 돼지에서 면역상태의 증가가 관찰되었다고 하였다. 경구용 백신은 이러한 문제점을 해결 해줄수 있을 것으로 생각되어 본연구에서 초유를 급여하고 PEDV 항원이 없는 돼지를 이용하여 실험을 수행 하였다. 그러나 그 결과 공격시험에서 백신을 투여한 돼지 뿐만아니라 대조군의 돼지도 일부에서만 설사가 일어났고 통계학적으로 전혀 예측할수 없는 결과를 보였다. 이러한 결과에 대한 이유는 PEDV에 대한 면역반응의 변동이 돼지의 개체에 따라 심한 것이 이유로 추정된다. 향후 정확한 백신의 역가 실험을 위해서는 실험동물의 품질보증문제 (특정병원성 부재 동물생산, 무균동물생산등), PEDV에 대한 면역학적 전개 등이 집중적으로 연구되어 백신과 항체가 사이의 정확한 연관관계를 밝힐 필요성이 있다.

3년간에 조사된 총 두수는 14,983두로써 총 1,916두가 기생충에 감염되어 12.8%를 나타냈으며, 돼지회충 (5.0%), 콕시듐 (3.8%), 대장발란티디움 (1.4%), 외부기생충 (1.3%) 및 돼지편충 (1.2%) 등의 순으로 높은 감염율을 보였다. 돼지의 발육단계별로는 모돈이 기생충 감염율이 18.0% (153두)로 매우 높았으며, 육성돈이 11.0% (981두), 자돈이 10.5% (756두) 순으로 나타났다. 약제 구충효능의 실험 결과는 실험에 공시된 약제들이 모두 효능이 우수하였으며 투약 1주일 후에는 부분적으로 충란이 검출되었으나 투약 3주일 후부터는 충란이 검출되지 않았다. 이것은 투약

후 충체는 제거되었으나 장관내에나 돈사내에 오염된 충란이 완전히 제거되지 않아서 구충이 되었음에도 충란이 검출된 것으로 사려된다. 특히 I 약제나 D 약제는 장내 선충류 뿐만 아니라 개선충인 외부 기생충까지 구충하는 효과가 있어서 1회 투여로 돼지에서 문제시되는 장내 선충과 외부 기생충을 거의 제거할 수 있다는 장점이 있다. 특히 어린 자돈에서의 외부 기생충인 개선충에 이환시 증체저하를 가져와 경제적 손실이 크다. 그러나 이들의 병원체 확인 검사는 용이하지가 않다. 임상증상과 투약 후의 반응은 좋은 치료는 물론 진단으로써도 가치가 있다.

포유자돈에서 콕시듐증은 수년 전까지는 잘 알려지지 않은 질병이나 90년대 중반에 들어와서 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 요즈음 설사를 하는 포유자돈에 항생제 투여를 하여도 잘 듣지 않는 경우가 있는데 이때는 콕시듐증에 의한 설사를 의심할 수가 있다. 포유자돈에서의 콕시듐증은 그 자체로도 문제이지만 세균성이나 바이러스성 설사증을 동반할 수 있는 점이다. 콕시듐증에 감염시 자돈의 심한 설사와 함께 증체저하를 가져와 비육시에도 성장에 영향을 미칠 수 있다.

모돈 또는 웅돈에서는 분만사에 입실 전에 구충하고 분만사는 깨끗이 정소하고 소독할 것, 기생충은 비교적 열에 약하므로 뜨거운 물로 소독하고 소독액으로 재차 소독하는 것이 바람직하다. 후보 모돈이나 웅돈에 대하여는 해당 양돈장에 기생충이 박멸된 것이 확인되기 전까지는 매 2개월마다 구충을 하는 것이 바람직하다. 포유자돈에서는 항 콕시듐 제제 (Toltrazuril 등)로 3-7일령에 구충하고 이유 후 외부 기생충 구충제로 구충하는 것이 바람직하다. 외부 기생충 구충제로는 I 약제나 D 약제 등을 사용하는 것이 좋으며 이 약제들은 내부 선충류에 대하여도 구충효과가 우수하다. 육성돈에서는 현재 육성돈 사료에 구충제 (Flubendazole 등)가 첨가되고 있으므로 이러한 구충제가 첨가된 사료를 급여하면 내부 선충류에 대한 문제는 해결될 수 있다. 구충제가 첨가되지 않은 육성돈 사료를 사용할 경우에는 이유 후 출하 2개월 전까지 2개월 간격으로 구충하는 것이 바람직하다.

## 제 6 장 인용문헌

### 제 1 절 돼지의 돼지 생식기 호흡기 증후군에 대한 방제 프로그램

Albina E, Leforban Y, Baron T, et al.: 1992. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rech Vet* 23:167-176.

Benfield DA, Nelson E, Collins JE, et al.: 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J Vet Diagn Invest* 4:127-133.

Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology*, 142, 629-633.

Christianson, W. T., Collins, J. E., Benfield, D. A. et al, Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.*, 53(4):485-488, 1992.

Christianson WT, Choi C-S, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo H-S: Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res* 57:262-268, 1993

Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Nelson, J. K. et al, Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin.*

*Microbiol.*, 33:1730-1734, 1995.

Collins, J. E., Benfield, D. A., Christianson, W. T. et al, Isolation of swine infertility and respiratory syndrome (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4:117-126, 1992

Conzelmann KK, Visser N, van Woensel P, Thiel HJ: 1993, Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology* 193:329-339.

Dee, S., Joo, H. S., Pijoan, C., Control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transmission: handling infected seedstock. *Compend. Cont Ed*, 16(7):927-933, 1994.

Gagnon CA, Dea S: Differentiation between porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates by restriction fragment length polymorphism of their ORFs 6 and 7 genes. *Can J Vet Res* 62:110-116, 1998

Goyal, S. M., porcine reproductive and respiratory syndrome; review article, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5:656-664, 1993.

Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L. et al, Comparison of the pathogenicity two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, 32:648-660, 1995a.

Halbur, P. G., Miller, L. D., Paul, P. S. et al, Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the

heart and lymphoid system of three week old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.*, 32:200-204, 1995b.

Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L. et al, Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, 33:159-170, 1996.

Hooper SA, White MEC, Twiddy N: 1992, An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet Rec* 131:140-144

Kweon, C-H, Kwon, B-J, Lee, H-J et al, Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Korea. *Korean J. Vet. Res.*, 34(1):77-83, 1994.

Kim HS, Kwang J, Yoon IJ, et al.: 1993, Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133:477-483.

Lager KM, Halbur PG: Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Vet Diagn Invest* 8:275-282, 1996

Larochelle, R., Mardassi, H., Dea, S. et al, Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8:3-10, 1996.

Mardassi, H., Wilson, L., Mounir, S. et al, Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between canadian and european strains by reverse transcription and PCR amplication. *J. Clin. Microbiol.*, 32:2197-2203, 1994.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC: Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am J Vet Res* 55:1391-1398, 1994

Meulenberg, J. J. M., Hulst, M. M., De Meuer, E. J., Moonen, P. L. J. M., Den Besten, A., De Kluyver, E. P., Wensvoort, G. and Moormann, R. J. M. (1993). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 192, 62-72.

Meulenberg JJM, Petersen-Den Besten A, De Kluyver EP, et al.: 1995, Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206:155-163.

Molitor, T., Immune response to PRRS virus. *Proceedings A. D. Leman Swine Conference*, 49-50, 1993.

Morrison RB, Collins JE, Harris L, et al.: 1992. Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). *J Vet Diagn Invest* 4:186-188.

Nelson EA, Christopher-Hennings J, Drew T, et al.: 1993, Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 31:3184-3189.

Plagemann, P. G. W. (1996). Lactate dehydrogenase-elevating virus and related viruses. In: Field Virology, Vol. 2, 1st Edit., B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 1105-1120.

Prieto, C., Suarez, P., Bautista, J. M. et al, Semen changes in boars after experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRSV) virus. *Theriogenol.*, 45:383-395, 1996.

Reeth, K. V., Nauwynck, H., Penseart, M., Dual infection of feeder pigs porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical virological study. *Vet. Microbiol.*, 48:325-335, 1996.

Rossow, K. D., Morrison, R. B., Goyal, S. M. et al, Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6:368-371, 1994a.

Rossow, K. D., Collins, J. E., Goyal, S. M. et al, Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.*, 32:361-373, 1995.

Suarez, P., Zardoya, R., Prieto, C. et al, Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome(PRRS) virus by reverse polymerase reaction(RT-PCR). *Arch. Virol.*, 135: 89-99, 1994.

Sur, J-H, Cooper, V. L., Galeota, J. A. et al, In vivo detection of porcine reproductive and respiratory syndrome RNA by in situ hybridization at different

times postinfection. *J. Clin. Microbiol.*, 34:2280-2286, 1996.

Wensvoort, G., Terpstra, C., Pol J. M. A. et al, Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13:121-130, 1991.

Wesley RD, Mengeling WL, Lager KM, Clouser DF, Landgraf JG, Frey ML: Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J Vet Diagn Invest* 10:140-144, 1998

Yeager, M. J., Prieve, T., Cillins, J. et al, Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine health and production*, 1(5):7-9, 1993.

Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al.: 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 4:144-147.

Yoon, I. J., Joo, H. S., Christianson, W. T., Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Swine health and production*, 1(4):6-9, 1993.

Zeman, D., Neiger, R., Yeager, M. et al, Laboratory investigation of PRRS virus infection in three swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5:522-528, 1993.

Zimmerman, J., Swenson, S. L., Will, R. W. et al, Transmission of PRRS virus. Proceedings A. D. Lemay Swine Conference, 51-52, 1993.

## 제 2 절 돼지 코로나바이러스 감염에 대한 방제프로그램

Bay W. W., Doyle L. P., Hutchings L. M.(1951) : The pathology and symptomatology of transmissible gastroenteritis. *Am. J. Vet. Res.* 12, 215-218.

Bridgen A., Duart M., Tobler K., Laude H., Ackermann M.(1993a) : Sequence determination of nucleocapsid protein gene of the porcine epidemic diarrhea virus confirms that this virus is a coronavirus related to human coronavirus 229E and porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.* 74, 1795-1804.

Brown H. H., Moon H. W.(1979) : Localization and activities of lysosomal enzymes in jejunal and ileal epithelial cells of the young pig. *Am. J. Vet. Res.* 40, 1573-1577.

Caul E. O., Egglestone S. I.(1977) : Further studies on human enteric coronaviruses. *Arch. Virol.* 54, 107-117.

Cavajal A., Lanza I., Diego R., Rubio P, Carmenes P.(1995) : Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 60-64.

Cavajal A., Lanza I., Diego R., Rubio P, Carmenes P.(1995) : Seroprevalence of Porcine Epidemic Diarrhea Virus(PEDV) Infection in Breeding Swine Farms of Castilla Y L on(SPAIN). *Europ. Soc. Vet. Virol.* 455-459.

Chasey D., Cartwright S. F.(1978) : Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. *Res. Vet. Sci.* 25, 255-256.

Coussement W., Ducatelle R., Debouck P., Hoorens, J.(1982) : Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. 1. Histological and histochemical study. *Vet. Pathol.* 19, 46-56.

Cox E., Hooyberghs J. Pensaert M. B.(1990) : Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res. Vet. Sci.* 48, 165-169.

Curzio B., Franco G., Anna U., Kristien V. R., Mathias A., Andreas P.(1995) : Experimental infection of gnotobiotic piglets with a cell culture adapted PEDV: Clinical, Histopathological and Immunohistochemical findings. *Europ. Soc. Virol.* 19, 542-546.

Dea S., Roy R. S., Begin M. E.(1980) : Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines. *Am. J. Vet. Res.* 41, 30-38.

Dea S., Vaillancourt Y. J., Elazhary Y., Martineau G. P.(1985) : An outbreak of diarrhea in piglets caused by a coronavirus antigenically distinct from transmissible gastroenteritis virus. *Can. Vet. J.* 26, 108-111.

Debouck P., Pensaert M. B.(1980) : Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am. J. Vet. Res.* 41, 219-223.

Debouck P., Pensaert M., Coussement W.(1981) : The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777. *Vet. Microbiol.*, 6, 157-167.

Debouck P.(1982) : Prevalence of the porcine epidemic diarrhea(PED) virus in the pig population of different countries. p.53. Proc. 7th Int. Congr. Pig Vet. Sco., Mexico City.

Derrick K. S.(1973) : Quantative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology* 56, 652-653.

Doyle I. P., Hutchings L. M.(1946) : A transmissible gastroenteritis in pigs, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 108, 257-259.

Duarte M., Gelfi J., Lambert P., Passchaert D., Laude H.(1993b) : Genomic organization of porcine epidemic diarrhea virus(PEDV). In *coronaviruses: Molecular Biology and Virus-Host Interactions*, pp. 55-60. Edited by H. Laude and J. F. V. Vautherot., New York: Plenum Press.

Duarte M., Tobler K., Bridgen A., Rasschaert D., Ackermann M., Laude H.(1994) : Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. *Virology*. 198, 466-476.

Ducatelle R., Coussement W., Debouck P., Hoorens J.(1982) : Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopic study. *Vet. Pathol.* 19, 57-60.

Egberink H. F., Ederveen J., Callebaut P., Horzinek M. C.(1988) : Characterization of the structural proteins of porcine epizootic diarrhea virus, strain CV 777. *Am. J. Vet. Res.* 49(8), 1320-1324.

Eicholz A., Crane R. K.(1965) : Studies on the organization of the brush border in intestinal epithelial cells. I. Tris-disruption of isolated hamster brush border and density gradient separation of fractions. *J. Cell. Biol.* 26, 687-691.

Florence G. Burleson, Thomas M. Chambers, Danny L. Wiedbrauk(1992) : *Virology, A Laboratory Manual*, New York, Academic Press, 53-61.

Have P., Moving V., Svasson V., Uttenthal A., Bloch B.(1992) : Coronavirus infection in mink(*Mustela vison*). Serological evidence of infection with coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus and epidemic diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 31, 1-10.

Hofmann M. Robert W.(1988) : Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2235-2239.

Hooper B. E., Haeltman E. O.(1966) : Growth of transmissible gastroenteritis virus in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 27, 286-291.

Hooper B. E., Haelterman E. O.(1969) : Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.* 33, 29-36.

Horvath I., Mocsari E.(1981) : Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis(TGE)-like disease. *Arch. Virol.* 68, 103-113.

Keenan K. P., Jarvis H. R., Marchwicki R. H., Binn L. N.(1976) : Intestinal infection of neonatal dogs with canine coronavirus 1-71: Studies by virologic, histologic, histochemical and immunofluorescent techniques. *Am. J. Vet. Res.* 37,

247-256.

Knuchel M., Ackermann M., Muller H. K., Kihm U.(1992) : An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet. Microbiol.* 32, 117-134.

Kusanagi K., Kuwahara H., Katoh T., Nunoya T., Ishikawa Y., Samejima T., Tajima M.(1992) : Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.* 54(2), 313-318.

Kweon C. H., Kwon B. J., Jung T. S., Kee Y. J., Hur D. H., Hwang E. K., Rhee J. C., An S. H.(1993) : Isolation of porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) in Korea. *Kor. J. Vet. Res.* 33(2), 249-254.

Kweon C. H., Kwon B. J., Kang Y. B., An S. H.(1994) : Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) infection in Korea. *Kor. J. Vet. Res.* 34(2), 321-326.

Kweon C. H., Lee J. G., Kang Y. B., Jang G. H., Kweon G. O., Hah W., Lee O. H., C. Chae(1996) : Field trial of attenuated porcine epidemic diarrhea virus(KPEDV-9) as vaccine, *Proceedings of the 14th IPVS Congress, Bologna, Italy*, 91, 7-10.

Kweon C. H., Lee J. G., Han M. G., Kang Y. B.(1997) : Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* 59(3), 231-232.

Morin M. Morehouse L. G., Solorzana R. F., Olson L. D.(1973) : Transmissible gastroenteritis in feeder swine: clinical, immunofluorescence and histopathological observations. *Can. J. Comp. Med.* 37, 239-248.

Overton J. R., Eicholz A., Crane R. K.(1965) : Studies on the organization of the brush border in intestinal cells. II. Fine structure of fractions of tris-disrupted hamster brush border. *J. Cell. Biol.* 26, 693-706.

Pensaert M. B., Haelterman E. O., Burnstein T.(1968) : Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.* 32, 555-561.

Pensaert M., Haelterman E. O., Burnstein T.(1970) : Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. *Arch Gesamte Virusforsch.* 31, 321-334.

Pensaert M. B., Debouck P.(1978) : A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58, 243-247.

Pensaert M. B., Debouck P., Reynolds D. J.(1981) : An immune electron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV777, and several coronaviruses. *Arch. Virol.* 68(1), 45-52.

Pensaert M. B.(1989) : Porcine epidemic diarrhea virus. In: *Virus infections of porcines*(ed M.B. Pensaert), pp 167-176, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.

Pijpers A., van Nieuwstadt A. P., Terpstra C., Verheijden J. H. M.(1993) : Porcine epidemic diarrhea virus as a cause of persistent diarrhea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet. Rec.* 132, 129-131.

Pomeroy K. A., Patel B. L., Larsen C. T., Pomeroy B. S.(1978) : Combined immunofluorescence and transmission electron microscopic studies of sequential intestinal samples from turkey embryos and poult infected with turkey enteritis coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1348-1354.

Pospishil A., Hess R. G., Bachmann P. A.(1981) : Light microscopic and ultrahistology of intestinal changes in pig infected with epizootic diarrhea virus(EDV): comparison with transmissible gastroenteritis(TGE) virus and porcine rotavirus infections. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin, B*, 28, 564-577.

Rottier P. J. M., Spaan W. J. M., Horzinek M. C.(1981) : Translation of three mouse hepatitis virus virus strain A subgenomic RNA's in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Gen. Virol.* 38, 20-26.

Saif L. J., Bohl E. H., Kohler E. M., Hughes J. H.(1977) : Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus(rotavirus-like agent of swine). *Am. J. Vet. Res.* 38(1), 13-20.

Spaan W., Cavanagh D., Horzinek M. C.(1988) : Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.* 69, 2939-2952.

Sturman L. S., Holmes K. V.(1983) : The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 28, 35-112.

Sturman L. S., Ricard C. S., Holmes K. V.(1985) : Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: activation of cell-fusing activity of virions by trypsin and separation of two different 90K cleavage fragments. *J. Virol.* 56, 904-911.

Sueyoshi M., Tsuda T., Yamazaki K., Yoshida K., Nakazawa M., Sato K., Minami T., Iwashita K., Watanabe M., Suzuki Y., Mori M.(1995) : An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea. *J. Comp. Pathol.* 113, 59-67.

Takeuchi A., Binn L. N., Jervis H. R., Keenan K. P., Hildebrand P. K., Valas T. R. B., Bland F. F.(1976) : Electron microscope study of experimental enteric infection in neonatal dogs with a canine coronavirus. *Lab. Invest.* 34, 539-549.

Takahashi K., Okada K., Ohshima K.(1983) : An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 45, 829-832.

Tobler K., Ackermann M.(1996) : Identification and characterization of new and unknown coronaviruses using RT-PCR and degenerate primers. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138(2), 80-86.

Trapp A. L., Sanger V. L., Stainaker E.(1966) : Lesions of the small intestinal mucosa in transmissible gastroenteritis-infected germ free pigs. *Am. J. Vet. Res.* 27, 1695-1702.

Turgeon D. C., Morrin M., Jollette J., Higgins R., Marsolais G., Franco E. D.(1981) : Coronavirus-like particles associated with diarrhea in baby pigs in

Quebec. Can. Vet. J. 21, 100-101.

Tyrell D. A., Almeida J. D., Berry D. M. et al.(1968) : Coronaviruses. Nature. 220, 650.

Tyrell D. A., Almeida J. D., Cunninham C. H., Dowlndle W. R., Hofstad M. S., Mcintosh K., Tajima M., Zakstelskays L. Y., Easterday B. C., Kapikian A.(1975) : Coronaviridae. Intervirology. 5, 76-82.

Utiger A., Rosskopf M., Guscetti F., Ackermann M.(1993) : Preliminary characterization of a monoclonal antibody specific for a viral 27kDa glycoprotein family synthesized in porcine epidemic diarrhea virus infected cells. Adv. Exp. Med. Biol. 342, 197-202.

Van Nieuwstadt A. P., Cornelissen J. B. W. J., Vreeswijk J.(1988) : Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. Res. Vet. Sci.. 44, 286-294.

Wood I. N.(1977) : An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. Vet. Rec. 100, 243-244.

Wood I. N.(1979) : Transmissible gastroenteritis and epidemic diarrhea of pigs. Br. Vet. J. 135, 305-314.

Zhou Y. L., Ederveen J., Egberink H., Pensaert M., Horzinek M. C.(1988) : Porcine epidemic diarrhea virus(CV777) and feline infectious peritonitis virus(FIPV) are antigenically related. Arch. Virol. 102, 63-71.

### 제 3 절 돼지의 생산성 향상을 위한 내외부 기생충성 질병의 방제프로그램

Boulanger A, A De Jesus, De Araujo, E Sogbe, V Utrera, D Herrera and G Pappaterra(1994). Efficacy of toltrazuril(BaycoxR) in the prevention of coccidial diarrhea in piglets in venezuela. Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand. p 258.

Eom and Rim(1992). Natural infections of Asian *Taenia saginata* metacestodes in the livers of Korean domestic pigs. 기생충학잡지. 제30권 제1호. pp 15~20.

Leman, AD, BE Straw, WL Mengeling, S D'Allaire and DI Taylor(1992). Diseases of swine. 7th ed. Iowa State University Press. pp 660~664.

Madsen, P, Sv Aa Henriksen and K Larsen(1994). Efficacy of Baycox on *Isospora suis* coccidiosis in piglets - A pilot study. Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand. p 366

Martineau, GP, J Menard, H Carabi, A Villeneuve and G Dumase(1994). Strategic control of porcine coccidiosis with toltrazuril. Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand. p 243.

Mundt, HC and A Haberkorn(1990). Proc 11 the IPVS Congree. p 325.

강영배. 위성환. 김상희. 장환. 최상호(1989). 최근 기업화 양돈장의 돼지 내부기생충 감염실태 변화양상 조사. 한국수의공중보건학회지. 13(1) 15~19.

김승호, 김영주(1989). 제주도에 있어서 Toxoplasma항체분포에 관한 연구 1. 돼지, 고양이 및 식육섭취자에 있어서의 Toxoplasma항체분포에 대하여. 대한수의학회지, 29(3) 333~342.

문무홍(1989). 국내 돼지의 Sarcocystis 감염과 Sarcocystiswhd의 동정에 관한 연구. 대한수의학회지, 29(3) 325~331.

서명득, 장동화, 주후돈(1989). ELISA를 이용한 돼지 톡소플라스마병의 조기 진단에 관한 연구. 대한수의학회지, 29(4) 567~575.

장두환, 노재욱, 강두원(1991). 발효톱밥 돈사에 대한 돼지 내부기생충 조사. 대한수의학회지, 31(4) 509~513.