

최종
보고서

국내 소 유산증의 원인분석 및 대책수립
Diagnostic Survey of Bovine Abortion in Korea and
Establishment of Preventive Measures

연구기관
서울대학교

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 소 유산증의 원인분석 및 대책수립”과제 (제1 세부과제: 소 유산의 임상학적 연구, 제2 세부과제: 소 유산의 병리학적 조사 및 기생충성과 곰팡이성 유산에 대한 분석, 제3 세부과제: 소 전염성 유산의 미생물학적 연구, 협동연구과제: 유산의 사료영양적 분석과 환경 및 사양관리 평가)의 최종 보고서로 제출합니다

2002년 6월 일

주관연구기관 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 김 대 용

세부연구책임자 : 이 병 천

: 유 한 상

협동연구기관 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 김 창 근

연구원 : 강성근, 박봉균,

윤희정, 남호우, 윤화영,

진영화, 김재훈

요 약 문

I. 제 목

국내 소 유산증의 원인분석 및 대책수립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

소의 유·조·사산은 전세계적으로 뿐만 아니라 유방염 및 발굽병과 더불어 국내 낙농업의 최대 경제 손실 요인의 하나로서 생산성의 저하로 인하여 매년 엄청난 손실을 주소 있는 것으로 간주되고 있으나 정확한 분석은 이루어지지 않았다. 더욱이 최근에 와서는 새로운 원인체 및 요인의 개재로 이러한 소의 유·조·사산이 증가하는 추세이다. 따라서 국내에서도 소의 유산에 대한 체계적인 역학 조사를 통하여 전염성 및 비전염성 유·조·사산의 원인을 정확하게 분석 파악함과 동시에 외국의 자료와 비교 분석하여 적절한 대책을 수립, 축산 농가의 생산성을 증대시키고 축산의 경제성을 향상시키는 것이 절실히 요구되고 있다.

축산농가의 번식 장애에 대한 효율적인 방역을 위해서 선진 축산국가에서는 소 번식장애에 관한 지속적인 연구와 유사산증의 신속한 원인 규명으로 근본적이고 체계적인 대책을 마련하고 있는 추세이다. 또한 WTO 출범에 따라 축산업도 무한 경쟁 시대에 돌입함에 따라 우리 나라 축산업의 국제경쟁력 향상을 위해서는 축산 농가에 경제적 손실이 가장 큰 번식 장애의 원인 규명이 시급하며, 유사산증의 철저한 원인 규명과 지속적인 조사가 이루어진다면 종합적인 대책 수립이 가능할 것으로 사료되며, 아울러 이로 인한 피해를 격감시킬 수 있어 축산업의 국제 경쟁력 향상에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

유산이나 사산의 원인을 밝히는 데는 여러 가지 요인들이 작용하여 합당한 진단에 도달하기 위해서는 임상학적, 병리학적 및 미생물학적 등 다양한 방면에서 체계적인 접근이 요구된다. 감염성 요인에 의한 태아사일 경우 태아 전신에 동일한 병변이 나타나지 않을 수 있고, 여러 가지 원인체를 모두 배

양 또는 분리 할 수 없기 때문에 어느 하나라고 단정하기 어려워 종합적인 판단이 요구된다.

이러한 측면에서 볼 때 유산과 사산 등의 원인에 접근하는 방법을 체계적으로 규정하고 진단율을 높여 원인체에 노출을 줄이는 기법의 개발이 필요하다. 예를 들어 진균성 유산은 대부분 산발적이며 이것이 확인되면 곰팡이에 대한 노출을 줄이는 등 대책을 수립해야 한다. 외국의 연구 결과에 의하면 대부분의 소 전염성 및 비전염성 유산에 대한 주요한 원인 질병들은 특정 지역에 무관하게 발생하고 있다. 하지만 일부는 지역의 기후, 농장의 크기, 사양 관리, 백신 프로그램, 야생 동물과의 접촉 가능성, 동물의 이동과 같은 여러 가지 요소와도 관련이 있으며, 이것과 관련되어 어떠한 유산 등은 특정 지역에 국한되어 발생하는 양상을 볼 수 있다. 어떠한 원인체에 의해 임신 시 감염이 이루어져 유산이 발생하면 모체의 태반이 심하게 손상되고 자궁소구는 괴사되며 비후된다. 현재까지도 태어나 태반 조직의 배양을 통한 원인체의 분리 동정, 병리 조직 검사 등 다양한 진단법이 제시되고 있으나, 국내 목장 상황에서 이를 체계적으로 조사, 연구한 자료는 미흡한 실정이다.

결론적으로 요약하면 현재 국내에서 소의 유산율은 증가하고 있으며 우군의 약 10% 이상으로 추정되고 있다. 이는 정상수준의 약 2-3배에 해당하는 높은 수준으로서 축산생산성 저하의 주요한 원인으로 대두되고 있다. 하지만 그에 대한 종합적인 연구는 상대적으로 매우 미비한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 소 유산 및 사산에 있어 임상적 측면과 병리학적 기생충학적 측면, 그리고 세균 및 바이러스학적 측면에서 각각 접근하여 종합적인 결과를 도출함으로써 국내 소 유산 발생의 현황 및 원인별 규명 및 진단법과 예측 가능한 부분에 있어서는 유산발생 차단을 위한 기술을 개발 하고자 함이 본 과제의 목표이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구과제의 목적을 달성하기 위하여 4개의 세부과제로 나누어 연구를 수행하였으며 세부과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다

세부과제 “소 유산의 임상학적 연구”에서는 먼저 1년 차에는 유산발생 시

유산태아 및 혈청샘플을 수집하고 모체에 대한 임상학적 및 직장검사를 통해 원인을 종합적으로 분석한다. 그리고 2년 차에선 유산 후 생산성 감소를 예방할 수 있는 임상학적 처치 protocol을 제시하고, 유산발생 후 다발하는 생식기 질병의 진단 및 처치법을 제시하며, 밝혀진 원인에 대한 임상학적 차단법을 모색한다. 한편 전국적 유산발생 원인 및 양태에 따른 역학지도를 작성한다. 최종연차에서는 임신기간 단계에 따른 유산발생 원인의 파악 및 이에 따른 예방대책을 수립하고 다른 세부과제에 개발되는 방제기술의 적용 및 기존기술과의 검토를 실시한다.

세부과제 “소 유산의 병리학적 조사 및 기생충성과 곰팡이성 유산에 대한 분석”에서는 의뢰되는 유산태아에 대한 부검 및 병리조직학적 검사를 실시하여 감염성 유산의 경우 미생물과 혈청검사 결과와 연계하여 유산의 원인을 밝힌다. 또한 원충성 유산의 주요 원인체인 *N. canium*의 국내 분리주의 병원성 및 특성을 분석하며 그 결과를 토대로 국내 분리주를 이용한 혈청검사법과 분자생물학적 방법을 이용한 정밀 진단법을 확립한다. 확립된 진단법을 이용하여 소 및 전염원으로 작용할 가능성이 있는 각종 이종동물에 대한 혈청검사를 실시하여 그 결과를 방제대책에 활용한다. 그리고 예방치료의 개념으로 항원충제로서의 가능성이 있는 물질을 탐색하며 불활화 백신을 확립하여 그것의 효과를 시험한다.

세부과제 “소 전염성 유산의 미생물학적 연구”에서는 전염성 유산의 주요 원인체의 분리, 동정 및 검색을 통한 역학적 연구를 하며, 주요 원인체의 항원 및 유전자를 분석하고, 원인체의 검색을 위한 ELISA 및 PCR등의 새로운 진단법을 개발한다. 그리고 주요 원인체에 대한 유전학적 기법을 이용한 분자역학적 기법을 확립한다. 최종적으로는 전염성 유산중에 대한 치료, 예방대책을 수립 및 야외적용을 실시한다.

협동연구과제 “유산의 사료영양적 분석과 환경 및 사양관리 평가”에서는 사료분석을 통한 영양상의 문제점을 조사하고, 혈액을 이용한 혈 중 영양상태를 조사하며, 사육환경과 사양관리상태를 다각적으로 조사 분석하여 영양, 사료, 및 환경적인 요인이 유산에 미치는 영향을 조사한다. 또한 젖소에서의 유산발생 실태를 파악하고 문제점을 찾아 그 발생을 줄이고 예방효과를 높이기 위한 대책을 수립하는데 목표를 두고 연구를 수행하였다. 조사 대상 목장

을 현장방문 설문조사 및 확인조사가 이뤄졌으며 또한 국가 유우균 산유능력 검정(DHI Testing Program)에 참여한 목장의 번식관련 자료를 분석에 활용하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용방안

본 연구 기간 (1999. 6 - 2002. 6) 동안 총 338 예의 유산태아 및 혈청을 대상으로 유산의 원인을 분석한 결과 49.8%가 감염성 원인에 의한 유산으로 밝혀졌으며 9.8%가 비감염성 원인에 의한 유산으로 밝혀졌다. 따라서 59.6%에서 유산의 원인을 밝힐 수 있었으며 나머지 32.5%에서는 정밀검사를 실시한 결과 특별한 원인을 확인할 수 없었으며 8%인 27예는 사후변화가 심하여 부검을 실시하지 못하였다. 유산의 발생양상에 있어서는 다른 나라의 조사결과와 비교하여 몇 가지의 상반되는 결과를 얻었으나 대체적으로 외국의 조사와 비슷한 양상을 보이고 있었다. 단일 원인체로는 원충성 원인체인 *N. caninum*이 가장 큰 비중을 차지하고 있음이 확인되어 앞으로도 더 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 외국의 경우에 비해서 곰팡이에 의한 유산은 연구기간 중 단 1예도 확인되지 않았으며 바이러스성 유산의 경우는 연구기간 중 일시적으로 아까바네 바이러스 감염에 의한 유산이 증가한 것이 외에는 몇 예에서 IBR과 BVD에 의한 유산이 확인되었다. 세균성 유산의 경우에는 세균성 유산으로 추정되는 것은 일부 확인되었으나 태반에 대한 검사가 제대로 이루어지지 않은 관계로 특정한 원인체를 확인하는 데에는 어려움이 있었다. 비 감염성 원인은 육안검사 및 병력을 근거로 다양한 종류의 원인이 게재되어 있었다. 본 연구결과에서 보듯이 유산 원인을 밝힐 수 없었던 예에 대해서는 장기적 사양관리 상태, 운동장 및 우사의 환경상태 그리고 기타 질병과의 연관성 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되며 앞으로도 지속적으로 수행되어져야 할 것으로 사료된다.

지역적 유산발생을 조사한 결과 젖소사육이 많고 비교적 원인규명에 대한 요구가 많은 경기도에서 많은 시료 분석이 이루어졌다. 특히 유산의 경제적 심각성을 이미 목장에서 잘 알고 있었기에 유산 발생 시 유산태아 및 부속물을 냉장보관 후 본 연구팀에 연락하여 원인규명이 이루어 질 수 있었으며,

이와 같은 유산발생시의 대처요령은 향후 영농지도에 활용하여 국가기관 및 관련연구팀에서 지속적으로 모니터링하여 신종 유산원인체의 유입이나 발생을 차단해야 할 것이다. 유조사산과 연관될 수 있는 질병에 대한 백신접종 실태를 조사한 결과 백신접종율이 매우 저조하였으며, 혈청학적 분석에서도 낮은 항체가를 보였는데 이는 이들 질병 원인체에 노출 시 집단적으로 질병이 발생할 수 있는 위험한 요인으로 지적되었으며, 특히 2000년도 겨울철에 발생한 Akabane에 의한 집단적 유산은 이러한 낮은 백신접종율을 볼 때 예측된 사실이었다. 본 연구 결과는 향후 전염성 질병에 의한 유조사산을 줄이기 위해 백신접종을 철저히 하도록 정책 반영 및 영농지도에 활용되어야 할 것이다. 계절적 요인으로는 여름철에 유산발생이 많았으나 조사기간 중에 Akabane의 집단발생이 겨울철에 있어 계절적 유의성은 없었다. 그러나 여름철에 급격한 기후변화 등으로 오는 소 자체 외인성 스트레스와 사료작물 준비로 오는 노동력 분산으로 인한 소의 관리 소홀 등 여름철에는 다른 계절에 비해 유산이 일어날 요인이 많은 것으로 사료되므로 본 연구결과는 이에 대한 영농지도 자료로 활용되어야 할 것이다. 또한 유산발생 후 빠른 기간 내에 재임신을 위해 모체의 생식기 검사 및 처치를 수의사에게 의뢰토록 하는 것이 부적절한 자가치료를 통한 공태기의 연장을 막을 수 있는 방법이므로 이를 영농지도에 활용해야 할 것이다.

원인분석 및 혈청학적 조사에서도 확인되었듯이 *N. caninum*은 단일 원인체로는 국내 소유산의 원인 중 제일 높은 비중을 차지하고 있음이 확인됨에 따라서 제2세부과제에서는 이미 확보하고 있는 국내 분리주의 병원성 및 특성규명을 하였고, 혈청 및 병리부검 시 네오스포라 감염을 확진 할 수 있는 특이성과 민감도가 높은 진단법을 확립하였고, 또한 소를 비롯한 이종동물에 대한 혈청검사를 실시하였다. 한편 예방 및 치료 측면에서 네오스포라 국내 분리주를 이용하여 불활화 원충을 추출하여 마우스 및 소에 적용하여 항체형성능을 평가하였고 원충에 대한 한약재 추출물의 항원충효과를 아울러 검증하였다. 국내 분리주 2두 모두 마우스 감염실험 결과 병원성이 있음이 확인되었고 다른 나라의 분리주들과 비교한 결과 정상면에서는 큰 차이가 없었다. 병리조직학적으로 감염이 의심되는 개체의 파라핀 블록에서 추출한 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 결과 면역조직화학 및 신선한 조직을 이용한

PCR 보다 민감도가 높은, 확진법을 확립할 수 있었으며 네오스포라 Nc-p43 단백질을 표적으로한 ELISA법을 확립하였고 기존의 방법보다 특이성이 높은 방법으로 앞으로 혈청검사에 활용할 수 있으리라 기대된다. 또한 응집반응의 원리를 이용한 혈청검사법을 확립하여 소 개 뿐 아니라 각종 동물을 대상으로도 네오스포라에 대한 혈청검사가 가능하며 본 방법은 네오스포라 감염증에 대한 역학적 조사연구에 널리 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 진단법들은 각 시도 시험소 등 관계 연구기관에서 진단법으로 활용할 수 있을 것이다. 혈청검사 결과 젖소에 비해서 한우의 경우 혈청양성률이 매우 낮았으며 이것은 사육 및 사양조건에 차이에 기인한 것으로 생각된다. 개의 경우 네오스포라에 의한 유산이 보고된 목장의 경우 도시지역의 개보다 높은 혈청양성률을 보임으로서 수평감염이 이루어지고 있음을 알 수 있었으며 흥미로운 사실은 야생 개과 동물인 한국너구리가 비록 검사두수는 작지만 20%의 혈청 양성율을 보였다. 이러한 사실은 개가 네오스포라의 종숙주로 알려진 것을 근거로 볼 때 감염원으로 작용할 수 있는 가능성을 내포하는 것이기 때문에 목장에서 이러한 야생동물의 접근을 최소화해야 할 것으로 사료된다. 본 연구 결과 유산의 원인체인 네오스포라는 이종가축 특히 개 또는 야생동물과의 접촉에 의한 것도 중요한 감염원으로 사료되므로 이러한 이종가축과의 차단에 대한 영농지도 자료로 본 연구결과가 활용되어야 한다.

산양 및 젖소를 대상으로 3가지 방법으로 (formalin, saponin, sonication) 불활화 시킨 원충을 감염시킨 결과 감염 후 비감염군에 비해서 충분한 방어항체가 형성됨을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 임신동물에 대한 방어효능 시험은 시험의 성격상 이루어지지 않았지만 기존의 연구결과들과 비교해 볼 때 본 과제에서 확립한 불활화 원충은 질병의 전파, 감염, 진행을 경감시키고 어느 정도는 방어 효과를 보일 수 있을 것으로 추정된다. 한약제 및 artemisinin의 경우 in vitro 상에서 항원충 효과를 검색한 결과 한약제의 경우 *Torilis japonica*와 *Sophora flavescens*이 특히 효과가 높았다. 따라서 현재는 이들 한약제의 추출물을 HPLC를 이용하여 분획 중에 있으며 앞으로 계속하여 이 분획들에 대한 항원충 효능이 평가될 것이다. Artemisinin도 강한 항원충효과를 확인할 수 있었다. 면역 억제 마우스에서 급성 *N caninum* 감염에 대하여 이미 닭 맹장톡시증에 효능이 있는 것으로 보고된 S

flavescens (고삼), *S acutum* (방기), *U macrocarpa* (무이), *T japonica* (사상자)의 항원중효과를 실험한 결과 생존율이나 병변정도에서 경감효과가 있음이 확인되었다. 앞으로도 본 연구결과를 토대로 한약재나 천연식물유래의 새로운 항원중성 신물질에 대한 탐색작업이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 생각되며 앞으로 개발되는 신물질들은 백신과 더불어 네오스포라 유산에 대한 예방 및 치료에 적용할 수 있을 것이다.

소 유산증 중 세균이나 바이러스의 전염성 원인체에 의한 유산의 원인규명 및 예방대책의 수립을 하기 위하여 소 유산가검물 (유산태아 262 예, 태반 44 예, 우유 32 예)에서 세균 및 바이러스성 원인체의 분리, 동정을 시도한 결과, 이들 가검물로부터 68 종 342 주의 세균을 분리, 동정하였고, 바이러스는 IBR virus, BVD virus, Akabane virus를 각각 14, 31 및 6 주를 동정하였고, 이중 BVD virus 는 5 주를 분리하여 CPE 형성능, 유전자의 sequencing 등 이들에 대한 특성을 조사 분석하였다. 혈청학적 조사에서는 *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans*, *Camphylobacter fetus* 및 Q fever 에 대한 조사한 결과 *B. abortus* 에 대하여는 2 두가 양성 판정되어서 관계 법령에 따라서 처리 하였고, *Camphylobacter fetus*, 및 Q fever 에 대하여는 21% 와 9.7% 양성 반응을 나타내었다. 바이러스성 질병에 대하여는 IBR virus 에 대하여 10.6%, BVD virus 에 대하여는 77.0% 및 Akabane virus 에 대하여는 53.3%의 양성율을 나타내었다. 이 결과들을 볼 때에 *Camphylobacter fetus* 감염증에 대한 추후 좀더 깊이 있는 연구가 필요하다고 생각되며, IBR virus 등 virus 성 질병에 대하여는 예방접종을 적극 추천하여야 할 것으로 생각된다. 또한 유산 원인체들의 효율적인 진단을 위하여 이들 세균성 및 바이러스성 원인체들의 신속, 정확한 검사를 위한 PCR 진단기법을 확립하였고, *B. abortus* 에 대하여는 조기 또는 herd screening을 위한 16.5 kDa 와 26kDa 의 재조합 단백질 항원을 이용한 ELISA 법을 시도하였으나, 표준 진단법에 의한 결과와 비교할 때에 좀더 보완이 필요한 시점이다. Virus 성 원인체에 대하여는 형광항체법을 이용하여 가검물로부터 직접 진단하는기법을 확립하였다. 그러나, 유전자 분석을 통한 PCR 진단 기법 및 형광 항체법에 의한 신속, 정확한 진단기법은 국내 여러 병성감정기관에 기술 보급하여 직접 적용할수 있을 것으로 생각된다. 국내에서 *B. abortus*에 의한 소 Brucellosis 의

만연에 대한 오염원 추적에 위한 역학조사 기법을 확립하기 위하여 URP primer을 이용한 RAPD 법을 확립하였고 국내 야외 분리균주에 적용하였다. 적용결과 본 RAPD 법은 특이성이 인정되어 추후 오염원 추적과 같은 역학적 연구에 적용 가능할 것으로 생각된다. 이러한 원인체들의 분석에 부가하여, 국내 농가에서 소 유산증 예방을 위하여 실시하는 실정을 조사하기 위하여 소 유산증에 대한 설문조사를 실시하여 국내 양축농가에서 소 유산증 예방을 위하여 실시하고 있는 법들 즉 백신접종, 축사 및 주위 소독, brucella 검진확인, 정기적인 검사등에 대하여 현 상황을 조사하였다. 조사결과 아직까지 축산현장에서 소 유산증에 대한 백신접종, Brucella 의 검진 확인, 예방적인 정기검사 등에서 매우 미흡한 것으로 나타나 추후 각 양축농가에 대하여 이러한 사항들에 대하여 철저히 이행될 수 있도록 적극적인 영농지도가 필요하다고 생각된다.

경기 및 충청 9개지역 254개목장의 젖소 8,893두에 대한 평균유산율과 범위는 5.9%와 1.5-9.1%였으며 유산율이 지역간에 차이가 있음을 확인하였다. 특히 조사두수가 많았던 지역(화성, 안성, 평택, 이천, 여주)내 유우균 산유능력검정(한국 DHI Testing Program) 참여와 비참여 목장의 유산율은 5.4%와 4.9%였다. 유우균 능력검정 참여목장의 번식기록에 근거한 유산율은 검정두수 규모에 따라 20두미만, 21-40두, 41두이상에서 각각 22.5%, 14.3% 및 9.9%였고, 21두이상 규모에서 16,000건의 임신중 유산율은 12.1%였다. 이는 유산우 기록중 임신중단 재수정기록이 포함된 유산율로서 현장조사보다 2배 높은 수준이었다. 이 조사에서도 계절간 및 지역간 유산율의 차이는 현장조사와 같은 경향이었다.

정상 임신우와 유산우의 임신기간중 혈청내 다량광물질(P, Ca, Mg)과 미량광물질(Zn, Cu, Mn)수준 및 glucose와 cholesterol 수준은 두 군간에 차이가 없었으며 유산유발 원인정도의 수준은 아니었다. 유산계절 또는 유산우 산차간에 혈액내 광물질수준의 차이는 없었다. 혈액성분조사에서 이들 영양소 부족에 의한 유산개체는 없었다.

유산우에 급여된 사료성분 조사에서 TMR, 배합사료, 조사료내 조단백, 조지방, 광물질 수준은 거의가 요구량 수준보다 높았다. 그러나 조사료내 NDF와 ADF는 권장수준에 만족된 수준은 아니었다. 만일 1일섭취량이 절대 부족

의 경우가 아니라면 이들 사료에 의해 유산유발의 염려는 없는 것으로 사료되었다. 현장조사에 의한 유산발생 원인조사에서 432예 중 원인불명이 47.9%였으며, 보다 발생빈도가 많은 원인으로서는 스트레스성 16.0%, 받히기, 투장, 타박등의 물리적 위협요인 14.4%, 감염증 8.1% 그리고 예방접종 후유증 6.3%였다. 관리자의 경험, 사양관리, 건강관리 개선에 대한 강한 의지가 유산발생을 줄이는데 크게 영향하였으며 또한 정기적 건강 및 위생관리가 행해진 축군에서 유산율이 낮았다. 축사구조와 시설도 유산의 위협요인이 되었다.

본 연구결과들은 첫째 국내 젖소와 번식육우의 유산 연구에 기초자료로 활용토록 한다. 본 연구에서 국내 젖소의 번식관리 상태가 부실하고 문제점이 많음을 확인하였으며 유우군 능력검정 자료의 분석에서 육안으로 확인된 유산기록 이외에 임신으로 인정된 뒤에도 상당한 개체가 재발정-재수정으로 이어지는 유산이 약 10-30%에 이르고 있었다. 앞으로 이러한 문제의 조사와 원인규명은 물론이고 적절한 대책이 시급히 모색되어야 한다. 두번째로 유산과 관련된 영양소의 과부족상태에 관한 연구는 유산발생을 최소화 할 수 있는 사양기술의 개발과 영양소의 효율적이용 측면에서도 앞으로 더욱 집중적인 연구가 필요하다. 이러한 연구는 학계, 사료업계, 약품업계, 정부연구기관, 민간컨설팅회사가 공동 관심사 속에서 이뤄져야 한다. 세번째로는 국가기관, 협동조합, 협회 등에서 유우군 능력검정기록을 위한 번식관련 자료의 기록과 분석평가에 유산관련 기록방법의 재조정과 보완이 필요함을 인식시키고 새로운 자료 입력방법 연구와 이용에 활용토록 한다. 네 번째로는 연구결과를 사료회사, 동물약품회사에서의 사료첨가제, 첨가물의 신제품기술개발을 위해 제공되고 산업화 촉진을 위한 기술지도에 활용한다.

SUMMARY

Bovine abortion is one of the most critical disease problems in the dairy cattle industry worldwide because of its negative economic impact. Also, bovine abortion is one of three disease problems in Korean dairy cattle industry as well including mastitis and foodlot. Surveys on the causes of bovine abortion have been reported from several countries. Identifying the causes of bovine abortion is the most important for establishing a proper rational herd management, which can protect the dairy farmers from economic losses. This type of survey is also significant for investigating whether any regional differences secondary to the climates and types of cattle management or environmental factors can affect the pattern or prevalence of abortifacients, which has not been previously studied in Korea systematically and nationwide.

Causes of bovine abortion were surveyed in Korea during a research period (June, 1999-June 2002) from the cases submitted to College of Veterinary Medicine, Seoul National University, principal research organization. The research team is composed of four fields; Theriogenology, Pathology/Parasitology, Microbiology (Bacteriology and Virology), and Animal Nutrition. These four fields interrelate closely to identify the causes of bovine abortion. Three hundred and thirty-three aborted bovine fetuses and maternal sera were evaluated through necropsy, histopathology, bacteriology, virology, PCR, and serological tests.

The infective causes of abortion were identified in 168 (49.8%) cases, of which 71 (21%) were due to infection with *N. caninum*. Viral and bacterial causes were diagnosed in 84 (24.9%) and 13 (3.9%) aborted fetuses, respectively. Abortion caused by mycotic infection was not found during the study. Noninfectious causes such as multiple pregnancy, maternal weakness, torsion of umbilical cord, or environmental factors were observed in 33 (9.8 %) cases. No specific causes were identified in

remaining 110 (32.5%) cases and 27 (8%) were not able to perform necropsy because of severe postmortem autolysis. Based on clinical and epidemiological results of our research data collected from aborted fetus, some of important utilization of our results could be projected.

Considering economic losses due to abortion, our results have to be informed to the farmer or owners of farm in order to prevent subsequent abortion. Since successful and complete diagnosis could be made in case that aborted fetus and placenta are well preserved by the farmers and collected by our research team, our results has to be utilized as a educational tools to teach the farmer for the importance of sample preservation and monitoring of potential causes of abortion. Our results also showed that vaccination rate and antibody titer in sera was very low. This has been proposed as a risk factor for abortion in massive number of animals. In fact, low vaccination has led to outbreak in abortion by akabane virus infection in winter of 2000. Therefore, our results from akabane-induced abortion has to be used as a educational data in order to increase vaccination rates and thereby decrease abortion rate in the farm. When analyzed seasonal effect on abortion, there are highest number of abortion cases in summer. This is due to heat stress to the cows and lack of good management of farm in summer. Therefore, our results has to be presented to the farmers or owners in order for farmers to take actions to decrease abortion rate in summer. Our results suggest that the appropriate treatments after abortion have to be done by a veterinarian, not by farmers or owners, in order to restore the reproductive system for the next pregnancy. This results has to be enlightened to the farmers or owners to have better pregnancy rate after abortion. Based on our results of causes of abortion by infectious agents, new flocks of cattle have to be subjected to the serum antibody test for infectious agents by the National Research Center and this policy has to be informed all of farmers or owners of farms in Korea

Considering the significance of *N. caninum* infection as a cause of bovine abortion in Korea, establishment of diagnostic methods with high sensitivity and specificity is highly in need. For that purpose, first we established PCR-based diagnostic strategy using DNA extracted from paraffin blocks. This method was more sensitive than immunohistochemistry and PCR using fresh tissues, and therefore can be practically applicable for rapid and routine diagnosis of *N. caninum* infection. We also set up ELISA method using *N. caninum* major surface protein, Nc-p43 as antigenic domain. Formalin-fixed whole tachyzoite-based agglutination test was also established for serodiagnosis of *N. caninum* infection in various animal species. These three diagnostic methods established in this study can be used at other government-owned or private research institutes. Prevalence of antibodies to *N. caninum* in dogs, cattle, raccon dogs, and mice were examined. In dogs, the seropositive rate of dogs that have been kept at farms which had experienced neosporosis had significantly high rate compared to dogs at the urban area. Twenty % of raccon dogs examined by NAT were seropositive to *N. caninum*. These results suggested that horizontal transmission occurs in the dairy farms and raccon dogs might act as a infective source since they had free access to farms especially during nighttime. This phenomenon should take consider for preventive measure of bovine neosporosis. Seroprevalence of Korean native beef cattle was significantly lower than that of dairy cattle probably due to differences in the management.

N. caninum Korean isolate was inactivated by three methods that include formalin-treatment, saponin-treatment, and ultrasonification. When inactivated tachyzoites were infected to cattle, significant level of antibody

titer were developed post infection. Even in vivo bovine challenge experiment was not performed, based on the results of that study, it has been suggested that they will probably have some degree of protective effect against *N. caninum* infection. Artemisinin was effective against *N. caninum* tachyzoites intracellular multiplication in cultured cells. Anti-protozoal efficacy of alcohol extracts of several herbs were performed and found out that *Torilis japonica* and *Sophora flavescens* were effective. These compounds might be of value in the prevention and treatment of bovine neosporosis. Further characterization of specific fractions of each chemical is in process to develop as new anti-protozoal compounds.

To find out causes and develop preventive measures, bacterial and viral agents were isolated and identified from specimen of bovine abortion; 262 fetus, 44 placenta, and 32 milk samples. Three hundred forty two bacterial strains were isolated from them and 68 species were identified using a Vitek system. Identified viral strains were 14, 31 and 6 in IBR virus, BVD virus and Akabane virus, respectively. Of the viral strains, 5 strains of BVD virus were isolated and characterized in cytopathic effect, nucleotide sequences. Serological tests in *B. abortus*, *Leptospira interrogans*, *Camphylobacter fetus* infection and Q fever were performed with sera collected from all over the country. Two cows showed positive reaction in *B. abortus* infection were slaughtered followed by a national law. Positive rates in the samples were 21% and 9.7% in *Camphylobacter fetus* infection and Q fever. In viral agents, 10.6%, 77.0% and 53.3% of them were positive against IBR virus, BVD virus and Akabane virus, respectively. These results suggested that future study should be done in *C. fetus* and BVD virus infection and vaccination against viral agents should be strongly recommended, especially against IBR virus. Genetical or immunological diagnostic methods against bacterial and viral

causative agents were developed or established to diagnose bovine abortion. Most of them could be applied for field trials to diagnose the bovine abortion through transfer of the techniques to national or regional diagnostic labs. We also established and applied a RAPD method using URP primers to trace an origin in the *B. abortus* infection, especially in bovine brucellosis. The method could be useful to investigate the origin of the infection and epidemiological study in bovine abortion.

Korean situation in preventive measures of bovine abortion was surveyed by questionnaires ; vaccination, disinfection, confirmation of brucellosis test before purchase, regular serological tests against causative agents of bovine abortion. Data from the questionnaires could give lots of information to develop and apply new preventive measure of bovine abortion in our country. The data could be used to develop guidelines for establishment of preventive measures against bovine abortion.

As our results suggested, long-term research project has to be launched in order to elucidate the cause of unknown abortion cases in this study. This includes the effect of long-term management system, environmental factors and relationship with other diseases. In conclusion, considering importance of abortion in the economics of the dairy and livestock industry, the proposed important utilization of our results has to be considered as one of critical factor to make anti-abortion policy by the administration.

It is well known that poor reproductive performance in dairy industry decreases economic profits resulting from long calving intervals and decreased milk production. To achieve optimal reproductive performance, high intake of a well balanced ration and good health program is required and multifarious technical and managerial strategies are required to solve and alleviate reproductive problems including abortion. The dietary perturbation that may decrease reproductive efficiency include inadequate energy, excess crude protein and vitamin and mineral unbalance.

From this prospective field survey, the abortion rate for 8,893 dairy cows in a total of 254 dairy farms: 216 farms in 6 regions of Kyunggi province and 38 dairy farms in 3 regions of Chungcheong province was 5.9% with a range of 1.5 to 9.1% among all 9 regions. The 4 regions having a great number of surveyed cows, the herds in Pyoungtack and Icheon-Yeaju regions were particularly at higher rate of abortion than those in Hwasung and Ansong regions and the abortion rate for herds enrolled and unenrolled in the Korean's DHI Testing Program was 5.4% and 4.9%, respectively. Based on the reproductive records of herds participating in DHI Testing Program, the abortion rate by herd sizes was 22.5% for ≤ 21 cows, 14.3% for 21-40 cows and 9.9% for ≥ 41 cows, respectively. Overall abortion for 16,700 pregnancies from ≥ 21 cows was 12.1% and was nearly twice higher than that from the field observational survey due to including the abortion of cows that their fetal losses were not observed and were reinseminated. Differences in the abortion rates between seasons and regions from this analysis showed a similar tendency with those from the field survey.

The levels and changes of macro (P, Ca, Mg) and trace (Zn, Cu, Mn) minerals in serum during pregnancy of the aborted cows were nearly similar with those of normal pregnant cows compared as a counterparts. Although low serum levels in some minerals were occasionally noted from the aborted cows, these levels were not a possible risk factor for abortion. There were no great differences in serum mineral levels between season months and parities of aborted cows. Glucose and cholesterol levels in serum were not different between normal and aborted cows during gestation. However, due to the wide range in levels, it was difficult to use these serum profiles in predicting abortion problems.

Based on dietary analysis of feedstuff, the levels of crude protein, crude fat and minerals in TMR and mixed concentrates were almost higher than those of required levels. However, the levels of NDF and ADF in forage

or hay were partially not satisfied to recommended conditions. If there are no very serious problems in dairy feed intake, it seems to be not concerned about abortion risks from these feedstuffs.

The experiences and strong innovative willingness to feeding management, reproduction and health control of dairy farmers appeared to have a large effect in alleviation of abortion risks. In addition, the cows in herds under regular health and sanitary programs showed lower abortion rates than those in irregular or unsanitary condition herds. The types and facilities of barn were investigated as possible causative factors for abortion, but their cause-and-effect relationship were difficult to determine from this study and further studies on these fields are required to find optimal conditions for the alleviation of risk factors for abortion.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	35
Part 1 Background of this project	35
Part 2 Necessity of this project	36
Part 3 Subject and range of this project	38
Part 4 Annual subject and content	40
Chapter 2 Diagnostic Survey of Bovine Abortion	43
Part 1 Introduction	43
Part 2 Materials and Method	48
1. Study samples	48
2. Gross and histopathology	48
3. Bacteriology	48
4. Virology	48
5. Serology	49
6. Immunohistochemistry for Akabane virus	49
7. RTPCR	50
8. Other tests	50
Part 3 Results	51
1. Gross pathology	51
2. Histopathology	51
3. Serology	52
4. Microbiology	53
5. Noninfectious causes	54
Part4 Discussion	57
Chapter 3 Clinical Investigation of Bovine Abortion	78
Part 1 Introduction	78
Part 2 Materials and Method	79
1. Survey	79
2. Sample collection	79
3. Clinical examination of aborted cow	80
4. Ultrasound and rectal examination	80
Part 3 Results and Discussion	81

1. Statistics of abortion by region	81
2. Statistics of abortion by season	82
3. Statistics of abortion by term	83
4. Statistics of abortion by aborted age	83
5. Physical examination of aborted cow	84
가. Examination of ovary	84
나. Examination of uterine body	84
다. Examination of horns	85
라. Examination of vaginal extrusion	85
6. Result of serology	86
가. Bacteria	86
1) Brucellosis	86
나. Virus	87
1) BVD	87
2) Akane	88
3) IBR	88
라. Survey on vaccination status	89
마. Effect of coraised animal on abortion	89

Chapter 4 Histopathological examination and study of protozoal and
Mycotic abortion

Part 1 Introduction	91
Part 2 Characterization of Korean <i>N. caninum</i> isolates	93
1. Materials and Method	93
가. Maintenance of isolates	93
나. Experimental animals	93
다. Experimental protocols	94
라. Histopathology	94
마. Immunohistochemistry	94
바. Isolation of infected isolates	95
사. Production of polyclonal antibody	95
아. SDSPAGE and Western blotting	95
2. Results	96
가. Clinical signs and mortality	96

나. Histopathology and immunohistochemistry	97
다. Reisolation of infected isolates	98
라. Western blotting	98
3. Discussion	98
Part 3 Establishment of Diagnostics for <i>N. caninum</i> infection	103
1. Diagnosis of <i>N. caninum</i> using PCR of DNA, extracted from paraffin blocks	103
가. Materials and Methods	103
1) Study samples	103
2) Immunohistochemistry	103
3) PCR	103
나. Results	104
1) Immunohistochemistry	104
2) PCR	104
다. Discussion	104
2. Establishment of ELISA based on recombinant <i>N. caninum</i> Np43 protein ..	107
가. Materials and Methods	107
1) Antigen preparation	107
2) RTPCR	107
3) construction of plasmid and protein expression	107
4) Western blotting	108
5) ELISA	108
6) Sample sera	108
나. Results	108
다. Discussion	109
3. Establishment of Neospora agglutination test	116
가. Materials and Methods	116
1) Preparation of antigen	116
2) Agglutination test	116
나. Results	116
다. Discussion	116
Part 4 Serology of dogs, raccon dogs and mice on <i>N. caninum</i> and preventive strategy for protozoal abortion	118
1. Materials and Methods	118

가. Study samples	118
나. Serology	118
2. Results	118
가. Serology	118
나. Preventive strategy	119
3. Discussion	119
Part 5 Vaccine Development of Screening of Antiprotozoal agents	122
1. Application of inactivated <i>N. caninum</i> tachyzoites to mice	122
가. Materials and Methods	122
1) Preparation of protozoa	122
2) Experimental Animals	122
3) Infection	122
4) Challenge	122
5) Preparation of IFA and ELISA	122
6) IFA test	123
7) ELISA test	123
8) Neutralization test	123
9) Protective effect of inactivated tachyzoites against pregnant mice	124
나. Results	124
1) Immunogenicity of live and inactivated <i>N. caninum</i> tachyzoites in mice	124
2) Serology	124
가) IFA	124
나) ELISA	124
다) Neutralization test	129
라) Protective effect on pregnant mice	131
다. Discussion	132
2. Application of inactivated tachyzoites in goat and cattle	133
가. Materials and Methods	133
1) Serology of goat and cattle following infection	133
2) IFA and ELISA	133
3) Neutralization test	133
나. Results	133
1) Immunogenicity of inactivated tachyzoites in goats	133

가) IFA	134
나) ELISA	136
2) Immunogenicity of inactivated tachyzoites in cattle	138
가) Immunogenicity of inactivated tachyzoites in Korean native cattle ..	138
나) ELISA	139
다. Discussion	141
3. Antiprotozoal effect of selected herbal extracts on neosporosis in immunocompromised mice	143
가. Materials and Methods	143
1) Preparation of protozoa	143
2) Experimental animals	143
3) Test compounds	143
4) Experimental design	143
5) Evaluation of the efficacy of test compounds	143
6) Analysis of brain tissue lesion	143
나. Results	144
1) Clinical signs and mortality	144
다. Discussion	147
4. Antiprotozoal effect of selected herbal extracts against <i>N. caninum</i> in cultured cells	149
가. Materials and Methods	149
1) Parasites	149
2) ED cells	149
3) Test compounds	149
4) Isotpes	149
5) Experimental design	149
나. Results	150
다. Discussion	151
5. Serology of <i>Tritrichomonas fetus</i> by ELISA	152
가. Materials and Methods	152
1) Standard test organism	152
2) Experimental animal and antisera	152
3) Test sera	152
4) TYM media	152

5) Preparation of soluble antigen for ELISA	152
6) ELISA	153
7) Western blotting	153
나. Results	153
1) IgG level of mice infected with <i>T. fetus</i> determined by ELISA	153
2) ELISA of sera for <i>T. fetus</i> infection	153
3) Western blotting of sera	154
다. Discussion	154
Part 6 Serology of <i>N. caninum</i> in dairy and Korean native beef cattle	156
1 Materials and Methods	156
가. Test sera	156
나. Preparation of antigen plates	156
다. Serology	156
2. Results	157
3. Discussion	157
Chapter 5 Microbiological Investigation of Bovine Abortion	160
Part 1 Introduction	160
Part 2 Materials and Method	162
1. Isolation and identification of causative agents	162
가. Bacteriology	162
나. Virology	162
1) Isolation of BVD virus	162
2) Isolation of Akabane virus	162
3) Isolation of IBR virus	163
2. Serology	163
가. Serology on bacterial agents	163
나. Serology on viral agents	164
3. Development and establishment of diagnostic methods	165
가. Diagnostic method based on genetic analysis	165
1) Bacterial agents	165
나. Serological diagnosis of <i>Brucella abortus</i>	166
다. FA test for IBR and BVD	167
4. Genetic and epidemiological analysis of <i>Brucella</i> based on RAPD	167

5. Questionnaires on bovine abortion	168
Part 3 Results	171
1. Isolation and characterization of agents	171
가. Bacterial agents	171
나. Viral agents	174
1) Virus Isolation	174
2) Isolation and Characterization of BVD virus	174
2. Serological survey on causative agents of bovine abortion	177
가. Bacteriology	177
1) Serology in the first years	177
2) Serology in the second years	178
3) Serology in the third years	178
4) Positive rates in the serology on the total specimen	178
나. Virology	179
3. Establishment and development of diagnostic methods	180
가. Bacterial agents	180
1) Establishment of diagnostic methods by PCR	180
2) Serological test using recombinant antigens of <i>B. abortus</i>	182
나. Viral agents	183
1) Establishment of diagnostic methods by PCR	183
2) Detection of BVD and IBR virus by direct FA	187
4. Molecular epidemiological analysis of <i>B. abortus</i>	187
5. Analysis of questionnaires on bovine abortion	195
가. General questions	195
나. Bovine abortion related questions	195
Part4 Discussion	200
Chapter 6 Nutritional and Managemental Investigation of Bovine Abortion	
Part 1 Introductio	205
Part 2 Abortion rate by field survey in dairy cattle	205
1. Materials and Methods	206
가. Regions of survey	206
나. Methods and times of survey	206

다. Survey of abortion occurrence	206
2. Results and discussion	207
Part 3 Abortion rate based on DHI Testing Program	210
1. Materials and Methods	210
가. Regions of survey	210
나. Survey of abortion occurrence	211
다. Survey of monthly pregnant cows	211
라. Survey of abortion rate	211
마. Abortion survey in DHI tested farms of Kyunggi and Chungcheong province	211
2. Results and discussion	212
Part 4 Levels of serum minerals and metabolites aborted cows	215
1. Materials and Methods	215
가. Blood collection	215
나. Determination of serum minerals	215
다. Determination of serum glucose and cholesterol	215
라. Standards of serum mineral levels	215
2. Results and discussion	219
Part 5 Survey of feed composition in aborted cows	219
1. Materials and Methods	219
가. Feed sampling	219
나. Analysis of feedstuff	219
2. Results and discussion	219
Part 6 Causal analysis of abortion	224
1. Materials and Methods	224
가. Regions and farms of survey	224
나. Survey of aborted cows	224
다. Survey of feeding management conditions	224
2. Results and discussion	224
Chapter 7 References	229

목 차

제 1 장 서론	35
제 1 절 연구배경	35
제 2 절 연구개발의 필요성	36
제 3 절 연구개발의 목표	38
제 4 절 연차별 연구개발 목표 및 내용	40
제 2 장 국내 소 유산증의 원인분석	43
제 1 절 서론	43
제 2 절 재료 및 방법	48
1. 검사 재료	48
2. 부검 및 병리조직학적 검사	48
3. 유산 관련 세균성 원인체 분리, 동정	48
4. Virus 성 질병 원인체의 형광항체검사 및 분리	49
5. 혈청검사	49
6. 아까바네의 면역화학염색	50
7. RTPCR	50
8. 기타 검사	51
제 3 절 결과	51
1. 육안소견	51
2. 병리조직학적 소견	52
3. 혈청검사	53
4. 원인체 분리동정	53
5. 형광항체를 이용한 바이러스 검색 및 분리동정	54
제 4 절 고찰	57
제 3 장 소 유산의 임상학적 연구	78
제 1 절 서설	78
제 2 절 재료 및 방법	79
1. 유산 발생의 실태 조사	79
2. 시료의 채취	79
3. 유산우의 검진	80

4. 모체의 직장검사 및 초음파 검사	80
제 3절 결과 및 고찰	81
1. 지역별 유산 조사 상황	81
2. 계절별 유산 발생 상황	82
3. 산차별 유산 발생 현황	83
4. 임신 일령별 유산 발생현황	83
5. 유사산 모체의 생식기 및 전신검사 항목	84
가. 난소 촉진소견	84
나. 자궁의 촉진소견	84
다. 자궁경	85
라. 질 삼출물 및 기타	85
6. 혈청검사결과	86
가. 세균성 질병	86
1) Brucellosis	86
나. 바이러스성 질병	87
1) BVD	87
2) Akabane virus	88
3) IBR	88
라. 유산 발생한 농장에서의 vaccination	89
마. 동거가축과의 유산의 발생관계	89
제 4 장 소 유산의 병리학적조사 및 기생충성과 곰팡이성 유산에 대한 분석	
제 1 절 서론	91
제 2 절 네오스포라 국내분리주의 정상분석	93
1. 재료 및 방법	93
가. 공시원충 및 tachyzoite의 준비	93
나. 실험동물	93
다. 실험동물 접종	94
라. 병리학적 검사	94
마. 면역조직화학염색	94
바.원충의 재분리	95
사. 다클론 항체의 생산	95
아. SDSPAGE 및 Western blotting	95
2. 결과	96

가. 임상증상 및 폐사율	96
나. 병리학 및 면역조직화학염색	97
다. 원충재분리	98
라. Western blotting	98
3. 고찰	98
제 3 절 N. caninum 감염증에 대한 진단법 확립	103
1. 파라핀블록 PCR을 이용한 네오스포라 진단법	103
가. 재료 및 방법	103
1) 실험재료	103
2) 면역조직화학염색	103
3) 중합효소연쇄반응 (PCR)	103
나. 결과	104
1) 면역조직화학염색	104
2) PCR	104
다. 고찰	104
2. 재조합 Np43단백질을 이용한 ELISA법의 확립	107
가. 재료 및 방법	107
1) 항원의 준비	107
2) RTPCR	107
3) 재조합 plamid의 construction 및 단백질의 발현	107
4) Western blotting	108
5) ELISA	108
6) sample sera	108
나. 결과	108
다. 고찰	109
3. 응집반응을 이용한 혈청검사법의 확립	116
가. 재료 및 방법	116
1)원충 및 항원의 준비	116
2)응집반응	116
나. 결과	116
다. 고찰	116
제 4 절 개, 한국너구리 및 마우스에 대한 N. caninum 혈청검사 및 원충성 유산에 대한 방제대책	118
1. 재료 및 방법	118

가. 혈청샘플	118
나. 혈청검사	118
2. 결과	118
가. 혈청검사	118
나. 방역대책	119
3. 고찰	119
제 5 절 네오스포라 감염병의 치료 및 예방에 관한 연구	122
1. 불활화 원충의 마우스 실험	122
가. 재료 및 방법	122
1) 공시 원충 및 <i>Neospora caninum</i> 항원 준비	122
2) 실험 동물	122
3) <i>Neospora caninum</i> 항원의 동물접종	122
4). Challenge	122
5) IFA 및 ELISA용 항원 제조	122
6) IFA (Indirect fluorescent antibody test)	123
7) ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay)	123
8) 중화시험	123
9) 백신에 대한 임신 동물의 방어시험	124
나. 결과	124
1) <i>Neospora caninum</i> 생원충 및 불활화 원충의 마우스에서의 면역 효능평가	124
2) Serologic titers	125
가) IFA	125
나) ELISA	127
다) 중화시험	129
라) 임신 동물의 방어시험	131
다. 결론 및 고찰	131
2. 불활화 원충의 산양 및 소 야외적용시험	133
가. 재료 및 방법	133
1) 불활화 항원을 접종한 산양 및 소의 혈청 항체가 조사	133
2) IFA와 ELISA	133

3) 중화시험	133
나. 결과	133
1) 산양에서의 <i>Neospora caninum</i> tachyzoites 불활화 항원의 면역원성 ...	133
가) IFA	133
나) ELISA	134
다) 중화시험	136
2) 소에서의 <i>Neospora caninum</i> tachyzoites 불활화 항원의 면역원성	138
가) 한우에서의 <i>Neospora caninum</i> tachyzoites 불활화 항원의 면역원성 .	138
나) ELISA	139
다. 결론 및 고찰	141
3. 면역 억제 마우스에서 급성 네오스포라증 (Neosporosis)에 대한 몇 가지 생약제제의 감수성 분석	143
가. 재료 및 방법	143
1) 공시 원충 및 <i>Neospora caninum</i> 항원 준비	143
2) 실험 동물	143
3) 생약 제제	143
4) 실험 설계	143
5) 실험 약제의 효능 평가	143
6) 뇌병변도 분석(Brain tissue lesion analysis)	143
나. 결과	144
1) 생존율 및 임상증상	144
다. 결론 및 고찰	147
4. 배양세포에서 <i>Neospora caninum</i> 원충에 대한 몇 가지 생약제제의 감수성 검사	149
가. 재료 및 방법	149
1) Parasites	149
2) ED cells	149
3) 생약 제제	149
4) Isotope	149
5) 실험 설계	149

나. 결과	150
1) In vitro 내에서 한약제의 <i>Neospora caninum</i> 에 대한 항원층 효능	150
다. 결론 및 고찰	151
5. 효소면역흡착법(ELISA)을 이용한 쇠세모편모충(<i>Tritrichomonas foetus</i>) 감염진단	152
가. 재료 및 방법	152
1) 공시원충	152
2) 실험동물 및 항혈청	152
3) 검사 혈청	152
4) TYM 배지	152
5) ELISA를 위한 soluble antigen의 제조	152
6) ELISA(Enzymelinked immunosorbent assay)	153
7) Western blotting	153
나. 결과	153
1) ELISA를 이용한 쇠세모편모충(<i>T foetus</i>) 접종 마우스의 혈청내 IgG 항체가	153
2) 소 혈청내의 쇠세모편모충(<i>T foetus</i>) 에 대한 항체유무	153
3) <i>T foetus</i> 에 대한 ELISA 의양성 소 혈청의 Western blotting	154
다. 결론 및 고찰	154
제 6절 한우 및 젖소에 대한 <i>Neospora caninum</i> 의 혈청조사	156
1. 재료 및 방법	156
가. 검사 재료	156
나. 항원 슬라이드 제작	156
다. 혈청검사	156
2 결과	157
3. 고찰	157
제 5 장 전염성 유산증에 대한 미생물학적 연구	160
제 1 절 서 론	160
제 2 절 재 료 및 방 법	162

1. 유산가검물의 원인체 분리, 동정	162
가. 유산 관련 세균성 원인체 분리, 동정	162
나. Virus 성 질병 원인체의 분리	162
1) BVD virus 의 분리	162
2) Akabane virus 의 분리	162
3) IBR virus 의 분리	163
2. 유산 관련 미생물 원인체에 대한 혈청학적 조사	163
가. 세균성 원인체에 대한 혈청학적 검사	163
나. Virus 성 원인체에 대한 혈청학적 검사	164
3. 유산 관련 진단법의 개발 및 확립	165
가. 유전자 검색기법을 이용한 진단 기법 개발	165
1) 세균성 원인체 검색 기법 개발	165
나. 부루셀라에 대한 혈청학적진단기법 개발	166
다. 직접 형광 항체법에 의한 BVD, IBR 바이러스의 검출	167
4. RAPD 기법을 이용한 부루셀라균의 분자, 역학적 분석기법 확립	167
5. 소 유산중에 대한 설문조사	168
제 3 절 결 과	171
1. 유산 가검물의 원인체 분리 동정	171
가. 세균성 원인체	171
나. 바이러스성 원인체	174
1) Virus 분리	174
2) BVD virus 분리 및 특성 조사	174
2. 유산관련 원인체에 대한 혈청학적 조사	177
가. 세균성 원인체	177
1) 1차년도 혈청학적 검사 결과	177
2) 2차년도 혈청학적 검사 결과	178
3) 3차년도 혈청학적 검사 결과	178
4) 총 혈청가검물에 대한 항체 양성수	178
나. 바이러스성 원인체	179
3. 유산 관련 원인체에 대한 진단 기법 확립 및 개발	180

가. 세균성 원인체	180
1) PCR 을 이용한 진단기법 확립	180
2) 재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단 기법 연구	182
나. 바이러스성 원인체	183
1) PCR 을 이용한 진단기법 확립	183
2) 직접 형광 항체법에 의한 BVD, IBR 바이러스의 검출	187
4. 오염원 추적을 위한 부루셀라균에 대한 분자생물학적 진단	187
5. 소 유산증에 관한 설문 조사 결과	195
가. 일반적인 사항	195
나. 소 유산 관련 사항	195
제4절 고찰	200
제6장 소 유산증의 영양 및 사양환경적 원인분석과 개선방안	
제1절 서론	205
제2절 현장조사에 의한 젖소의 유산발생을	205
1. 재료 및 방법	206
가. 조사지역	206
나. 조사방법과 시기	206
다. 유산발생 조사	206
2. 결과 및 고찰	207
제3절 유우균 산유능력 검정기록분석에 의한 유산발생을	210
1. 조사재료 및 방법	210
가. 조사지역	210
나. 유산발생 조사	211
다. 목장내 월평균 임신두수 조사	211
라. 유산을 조사	211
마. 경기도와 충청도 유우균 검정목장 전체의 유산을 조사	211
2. 결과 및 고찰	212
제4절 유산유의 혈액내 광물질 및 대사물질 수준	215
1. 재료 및 방법	215

가. 채혈	215
나. 혈청내 광물질 측정	215
다. 혈청내 Glucose와 총 Cholesterol 측정	215
라. 혈청내 광물질 과부족의 기준	215
2. 결과 및 고찰	215
제 5절 유산우 급여사료의 성분조사	219
1. 재료 및 방법	219
가. 사료의 시료 채취	219
나. 사료의 일반성분 분석	219
2. 결과 및 고찰	219
제 6절 유산 원인 분석	224
1. 조사재료 및 방법	224
가. 조사지역 및 대상	224
나. 유산우 조사방법	224
다. 사양관리 조건 조사	224
2. 결과 및 고찰	224
제7장 참고문헌	229

제 1 장 서 론

제 1절 연구배경

경제동물인 소를 사육하여 얻는 소득은 우유, 고기 및 번식을 통한 송아지 생산이 주가 된다. 분만은 곧 생산의 시작이기 때문에 유두 또는 육우에서 경제성 산물의 창출을 통한 국제 경쟁력을 향상시키기 위해서는 무엇보다도 정상적인 수태와 분만이 가장 중요하다.

젖소의 유사산과 이어지는 번식장애는 우군관리 시 가장 문제가 되는 유방염 및 발굽병과 함께 목장의 3대 질병의 하나로서 이로 인하여 축산농가가 입는 피해는 실로 엄청나다는 것은 잘 알려진 사실이다.

소의 유·조·사산은 전세계적으로 뿐만 아니라 국내 낙농업의 최대 경제 손실 요인의 하나로서 생산성의 저하로 인하여 매년 엄청난 손실을 주소 있는 것으로 간주되고 있으나 정확한 분석은 이루어지지 않았다. 더욱이 최근에 와서는 새로운 원인체 및 요인의 개재로 이러한 소의 유·조·사산이 증가하는 추세이다. 따라서 국내에서도 소의 유산에 대한 체계적인 역학 조사를 통하여 전염성 및 비전염성 유·조·사산의 원인을 정확하게 분석 파악함과 동시에 외국의 자료와 비교 분석하여 적절한 대책을 수립, 축산 농가의 생산성을 증대시키고 축산의 경제성을 향상시키는 것이 절실히 요구되고 있다.

축산농가의 번식 장애에 대한 효율적인 방역을 위해서 선진 축산국가에서는 소 번식장애에 관한 지속적인 연구와 유사산증의 신속한 원인 규명으로 근본적이고 체계적인 대책을 마련하고 있는 추세이다. 또한 WTO 출범에 따라 축산업도 무한 경쟁 시대에 돌입함에 따라 우리 나라 축산업의 국제경쟁력 향상을 위해서는 축산 농가에 경제적 손실이 가장 큰 번식 장애의 원인 규명이 시급하며, 유사산증의 철저한 원인 규명과 지속적인 조사가 이루어진다면 종합적인 대책 수립이 가능할 것으로 사료되며, 아울러 이로 인한 피해를 격감시킬 수 있어 축산업의 국제 경쟁력 향상에 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구팀은 본 과제와 관련된 기초 연구를 수년간 진행하여 왔으며, 해당

분야에서는 이에 관한 임상적인 경험과 정보를 충분히 지니고 있다고 여겨지며 향후 2-3년간의 기술 집약적인 후속 연구를 수행하면 예정된 연구 목표를 달성할 수 있을 것으로 기대된다.

추후 본 연구의 결과는 축산 농가의 소득 증대와 생산성 향상에 직접 적용이 가능할 뿐만 아니라, 국내에 존재하지 않는 유산 원인체를 확실히 규명하여 발생국으로부터 무분별한 축산물의 수입에 대처할 수 있는 자료로 활용할 수 있을 것이다.

국내에서 소의 유사산과 관련된 연구가 미비한 상황을 고려해 볼 때 앞으로 장기적인 차원에서 축산 농가의 생산성 향상은 물론, 축산업의 국가 경쟁력도 향상시킬 수 있으리라 전망한다. 다만 현 시점에서는 질병 발생에 대한 역학 조사 등의 단기적인 연구에 집중될 수밖에 없지만, 향후 장기적인 차원에서 여러 유형의 전염성 및 비전염성 질병에 대한 발병 기전, 신속한 진단법 그리고 vaccine의 개발과 같은 기초 연구 부분에도 지원이 지속된다면 소의 유산에 대한 국내의 연구 수준도 상당히 향상될 수 있으리라 전망된다.

제 2 절 연구개발의 필요성

국내에서도 소 유사산과 사산은 목장에서 발생하는 가장 해결하기 어려운 문제로서 발생시에 원인체의 진단은 아직 낮은 실정이며, 이에 대한 연구가 있어야 하겠다. 더욱이 유사산이나 사산의 원인은 매우 다양하여 체계적인 접근 연구 방법이 중요하다. 그 동안 소 유사산에 대한 연구가 일부 있었으나 대부분 육안적으로 확연하게 원인이 규명되는 경우에 원인체에 관심이 집중되어 왔으며, 이러한 발견 또한 선진국에서 새로운 원인체의 분리한 방법이 보고된 경우 이를 국내상황에서 확인하는데 그친 경우가 많아 발생현황에 관해서도 체계적인 분석 기술이 필요하다.

국내 축산 농가는 대규모로 소를 사육하는 목장보다는 소규모 (착유우 기준 10-20두) 목장이 대부분이며, 이로 인해 축주 및 개업수의사들은 우군의 집단관리 (herd management) 보다는 개체의 이상에 주된 관심을 가지고 유사산의 원인 규명 및 처치를 행해 왔으나, 최근에 들어서는 우군에 대한 집단 관리의 중요성에 대한 관심이 높아지고 있다. 개체에 한정될 경우에 진단의

연계가 이뤄지지 않은 문제점을 지니고 있어 지금이라도 종합적인 연구를 통한 지역별 또는 전국적인 분포 파악이 필요하다.

유산이나 사산의 원인을 밝히는 데는 여러 가지 요인들이 작용하여 합당한 진단에 도달하기 위해서는 임상학적, 병리학적 및 미생물학적 등 다양한 방면에서 체계적인 접근이 요구된다. 감염성 요인에 의한 태아사일 경우 태아 전신에 동일한 병변이 나타나지 않을 수 있고, 여러 가지 원인체를 모두 배양 또는 분리 할 수 없기 때문에 어느 하나라고 단정하기 어려워 종합적인 판단이 요구된다.

이러한 측면에서 볼 때 유산과 사산 등의 원인에 접근하는 방법을 체계적으로 규정하고 진단율을 높여 원인체에 노출을 줄이는 기법의 개발이 필요하다. 예를 들어 진균성 유산은 대부분 산발적이며 이것이 확인되면 곰팡이에 대한 노출을 줄이는 등 대책을 수립해야 한다. 외국의 연구 결과에 의하면 대부분의 소 전염성 및 비전염성 유산에 대한 주요한 원인 질병들은 특정 지역에 무관하게 발생하고 있다. 하지만 일부는 지역의 기후, 농장의 크기, 사양 관리, 백신 프로그램, 야생 동물과의 접촉 가능성, 동물의 이동과 같은 여러 가지 요소와도 관련이 있으며, 이것과 관련되어 어떠한 유산 등은 특정 지역에 국한되어 발생하는 양상을 볼 수 있다. 어떠한 원인체에 의해 임신 시 감염이 이루어져 유산이 발생하면 모체의 태반이 심하게 손상되고 자궁소구는 괴사되며 비후된다. 현재까지도 태어나 태반 조직의 배양을 통한 원인체의 분리 동정, 병리 조직 검사 등 다양한 진단법이 제시되고 있으나, 국내 목장 상황에서 이를 체계적으로 조사, 연구한 자료는 미흡한 실정이다.

결론적으로 요약하면 현재 국내에서 소의 유산율은 증가하고 있으며 우군의 약 10% 이상으로 추정되고 있다. 이는 정상수준의 약 2-3배에 해당하는 매우 높은 수준으로서 축산생산성 저하의 주요한 원인으로 대두되고 있다. 하지만 그에 대한 종합적인 연구는 상대적으로 매우 미비한 상황이다. 따라서 본 연구에서는 소 유산 및 사산에 있어 임상적 측면과 병리학적 기생충학적 측면, 그리고 세균 및 바이러스학적 측면에서 각각 접근하여 종합적인 결과를 도출함으로써 국내 소 유산 발생의 현황 및 원인별 규명 및 진단법과 예측 가능한 부분에 있어서는 유산발생 차단을 위한 기술을 개발 하고자 한다.

제 3 절 연구개발의 목표

◎ 연구개발 목표

- 국내 소의 유·조·사산의 발생 상황 및 원인을 체계적으로 분석하고, 주요 원인체의 분리, 동정 및 혈청역학적 조사를 실시하여, 효율적인 방제대책을 수립하여 축산 현장에 적용함으로써 농가의 소득 증대에 기여하는 한편 대외 경쟁력을 제고
- 최신의 면역학적 및 유전학적 기법을 이용하여 주요 원인체를 신속, 정확하게 진단할 수 있고, 야외 활용도가 높은 유·조·사산 원인체들에 대하여 특이성이 높은 진단법의 개발
- 분자역학적 기법을 이용하여 감염 원인체의 추적 기법을 확립하여, 질병의 효율적인 예방을 위한 감시체계를 확립
- 소의 유산에 있어서 사료영양과 환경 및 사양관리가 미치는 영향을 조사 평가하여 유산증 원인에 대한 분석자료를 제공하고 유산증 발생을 감소를 위한 영양, 사양관리 및 환경상의 효율적인 개선방안 수립

◎ 연구개발 내용

- 본 연구에서는 국내 목장에서 발생한 유·조·사산에 대한 실태 조사를 위해 본 연구팀과 목장 및 개업 수의사가 유기적인 체계를 구축하여 유산관련 다양한 risk factor들에 대한 실태 파악 및 분석 실시
- 감염성원인에 의한 유산에 관한 다양한 정보를 종합적으로 수집 및 분석
- 유산 발생의 현장을 방문하여 모체의 신체검사, 생식기계 검사 등의 다양한 검사를 통한 임상학적 평가를 실시
- 유·조·사산 우에서 유산 태아, 태반 또는 기타 부산물 등의 시료를 채취하여 해부, 병리, 조직학적검사 및 면역 조직 화학적 염색 검사를 실시
- 가검재료는 실험실내에서 세균, 바이러스, 곰팡이성 원인체의 분리 동정을 실시하며, 이들 원인체들에 대한 면역학적 및 유전학적 진단기법의 개발 및 야외 적용 시험실시
- 국내 소의 유·조·사산의 주요 원인체들에 대한 혈청역학 조사 실시 및 항원 분석을 통한 야외 진단 kit 및 예방약 개발

○ 국내 소의 유, 조산 주요 원인체의 세포 성분 및 유전자 분석 기법을 이용한 추적기법 개발 및 확립

○ 소의 유산에 있어서 사료영양과 환경 및 사양관리가 미치는 영향에 대한 조사는 소의 임신 기간 중 유산시기가 45 ~ 260일이고 계절, 지역 등 여러 요인들로 인해 단기간 내에 평가하기가 어렵다. 따라서 다년간에 걸친 조사와 종합적인 대책 마련

- 주연구과제 수행을 위해 방문하는 농가의 영양 및 사양관리 실태를 사양 환경과 사료영양적 측면에서 중점조사
- 유산 발생시 소가 섭취한 사료를 수거하여 영양학적인 측면에서 유산과 관련된 항목을 조사 평가
- 유산이 발생한 현장을 방문하여 주변의 환경 및 사양관리를 조사 평가
- 목장 축군의 번식관리조사 내용을 사양관리 상태와 비교 분석

제 4 절 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유산의 임상학적 연구분석 및 역학조사 (제1세부 : 이병천) ○ 유산태아에 대한 병리 조직학적 검사 및 기생충성과 곰팡이성 유산에 대한 분석 및 단클론 항체의 생산 (제2세부 : 김대용) ○ 유산의 전염성 원인체 규명 및 진단법 개발 (제3세부 : 유한상) ○ 유산의 사료 영양 분석과 환경 및 사양관리 조사 (협동과제 : 김창근) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 목장에서 발생한 유·조·사산에 대한 실태 조사 ○ 유·조·사산 우에서 유산태아, 태반 및 기타 시료를 채취하여 육안적인 검사 실시 ○ 연구팀에 의해 작성된 차트를 기록하고 병력 청취를 통한 가능한 모든 정보 확보 ○ 모체는 임상적검사 및 직장검사를 통해 이후 원인을 분석 ○ 초음파 검사를 통한 생식기 검사를 실시 ○ 유산태아 및 태반에 대하여 병리조직학적 검사를 통하여 유산의 원인을 밝히는 한편 필요에 따라서는 면역조직화학기법이나 배양을 실시하여 원인체를 동정 ○ 간접형광항체법을 이용하여 젖소와 접촉 경험이 없는 한우 및 목장에서 같이 사육증인 개 및 기타 동물을 대상으로 소 유산관련 원충의 혈청검사를 실시한다 ○ 백신 및 진단법 개발을 위한 기초자료로서 국내 분리주의 성장분석 ○ 네오스포라 단클론항체를 생산하며 생산된 항체는 진단법의 개발이나 기초연구에 추후 이용 ○ 네오스포라 백신개발을 위해 항체가 측정 및 증화 시험을 실시하며 반복된 세포배양 및 물리적 처리에 의한 약독화 면역항원의 작출 ○ 목장을 직접 방문하여 사육환경, 사료상태등 오염원에 대한 risk factor를 조사 ○ 전염성 유산의 주요 원인체 세균 및 바이러스의 분리, 동정 및 검사를 통한 역학적 연구 ○ 전염성 주요 원인체의 항원 및 유전자 분석 ○ 전염성 주요 원인체 검사를 위한 ELISA 및 PCR 등 새로운 진단기법 개발 ○ 주요 원인체에 대한 유전학적 기법을 이용한 분자 역학적 기법 확립 ○ 소가 섭취한 사료를 분석하여 영양상의 문제점 조사 ○ 혈액을 채취하여 혈중 영양상태 조사 ○ 농장을 방문하여 사육환경, 사양관리 상태 조사

<p>2차년도 (2000)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소 유산의 임상적 원인규명, 진단 및 번식 영향 평가 (제1세부 : 이병천) ○ 유산태아의 병리조직학적 검사 및 원충성 유산의 진단법 개발 및 방제대책 수립 (제2세부 : 김대용) ○ 전염성 유산의 역학적 원인분석 및 원인체의 특성 조사 분석 (제3세부 : 유한상) ○ 유산의 사료영양적 분석과 환경 및 사양관리 평가 (협동과제 : 김창근) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유조사산 실태 연구조사를 계속하여 실시 ○ 유산 후 생산성 감소를 예방할 수 있는 임상학적 처치 protocol 제시 ○ 유산 발생후 다발하는 생식기 질병의 진단 및 처치법 제시 ○ 모체 혈청의 임상병리학적 검사에 의한 원인분석 및 처치방법 모색 ○ 밝혀진 원인에 대한 임상학적 차단법을 모색. ○ 전국적 유산발생 원인 및 양태에 따른 역학지도 작성 ○ 유산태아 및 태반에 대하여 병리조직학적 검사 및 혈청검사를 계속 실시한다. ○ 네오스포라의 경우 혈청 양성률이 높은 목장의 지속적인 사양관리 사육조건 등을분석 ○ 특이성이 높고 실용성이 높은 네오스포라 진단키트의 개발 ○ 1년차에서 확보한 네오스포라 면역항원의 동물접종에 의한 면역원성을 확인 ○ 개 혈청 검사성적을 토대로 개 분변을 대상으로 분변검사 및 PCR 이용하여 원충의 배출유무를 확인 ○ 전염성 유산중 주요 원인 세균 및 바이러스의 분리, 동정을 통한 유. 조. 사산 원인체에 대한 역학적 연구 계속 실시 ○ 국내 분리 전염성 유산 원인체의 특성 조사 및 비교 분석 ○ 전염성 유산 원인체에 대한 새로운 진단기법의 야외 적용 및 진단 효율 평가 ○ 야외 분리균주의 분자 유전학적 분류 ○ 당해연도 발생유산에 대해 1차년도 연구내용 반복수행, 자료보완 ○ 소가 섭취한 사료를 분석하여 영양상의 문제점 분석 및 평가 ○ 혈액을 채취하여 혈중 영양상태 분석 및 평가 ○ 환경 및 사양관리 요인을 다각적으로 분석 평가
------------------------	---	---

<p>3차년도 (2001)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유산의 원인분석을 통한 예방 대책 수립 (제1세부 : 강성근) ○ 전염성유산의 병리학 적 진단의 표준화, 진단법의 실용화, 및 백신의 야외적용 (제2세부 : 김대용) ○ 전염성 유산의 역학적 원인분석, 대책수립 및 야외 적용 (제3세부 : 유한상) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제 1, 2차년도의 결과에 따른 요인의 집중적 탐구 및 분석 ○ 임신기간의 단계에 따른 유산 발생 원인의 파악 및 이에 따른 예방 대책 수립 ○ 대상목장을 선정하여 제 2 및 3 세부과제에서 개발된 방제기술의 적용 및 기존기술과의 검토 ○ 유산태아 및 태반에 대하여 병리조직학적 검사 및 혈청검사를 실시 ○ 2차년도에서 개발된 진단법의 효율평가 및 적용 ○ 네오스포라 원충의 항원을 분석, 또한 자출된 약독화 원충 또는 불활화 원충백신의 산양(30두)에 대한 방어 효능시험 및 야외 적용시험(소 30두) ○ 원충성 유산의 방제대책 수립 ○ 전염성 유산의 세균성 및 바이러스성 원인체의 분리, 동정을 통한 역학적 분석 실시 ○ 전염성 유산중에 대한 치료, 예방 대책 수립 및 야외 적용 ○ 야외 적용 결과의 효율 평가
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유산증과 관련된 영양, 사료 환경적 요인의 종합분석 대책 수립 (협동과제 : 김창근) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 당해연도 발생유산에 대해 1-2차년도 연구결과의 보완 조사와 평가 ○ 1, 2차년도의 결과를 토대로 영양, 사료, 환경적 분석 및 이에 따른 대책 수립 ○ 개선효과에 대한 분석 및 활용

제 2장 국내 소 유산증의 원인분석

제 1 절 서 론

소에서 유산을 비롯한 번식장해와 관련 된 것들은 전세계 공통적으로 축산업의 생산성 및 경제적 손실과 가장 밀접하게 관련되어 있다. 따라서 유산의 정확한 원인을 밝히는 것은 전체적인 우군의 관리측면에서 볼 때 매우 중요하다. 유산의 원인증은 매우 다양하다. 많은 종류의 세균, 바이러스, 원충과 같은 미생물에 의해서도 유산이 유발되지만 그에 못지 않게 비전염성의 원인들 즉 환경, 사양, 및 처치에 의한 원인도 매우 중요하다. 또한 유산은 경우에 따라서는 사양조건이나 기후 등과 같은 인자에 의해서 지역적으로 발생하기도 한다. 그렇기 때문에 유산이 발생하였을 경우 신속하고 적절하게 유산의 원인을 규명하는 것이 매우 중요하다. 세계 여러나라 들은 오래 전부터 국가 혹은 지역적으로 유산의 원인분석에 대한 결과를 'data base' 형태로 잘 관리하고 있다. 미국과 일본 그리고 덴마크의 유산분석결과는 다음에 기술하였다. 하지만 국내에서는 위와 같은 조사가 아직 체계적으로 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 장에서는 연구기간 동안 조사한 국내 소 유산증의 원인분석에 대한 결과에 대해서 기술하고자 한다. 참고로 최근에 미국에서 조사한 유산원인분석에 대한 자료를 첨부하였다.

© Table 1. Summary of Retrospective Abortion Surveys in USA

State Reporting						
	California		South Dakota		South Dakota	
Years	1985-89		1968-72		1982-83	
Total cases	468		2544		958	
% Diagnosed	45.5		35.3		31.9	
% Infectious	43.9		30.7		29.9	
Cause (%) (Descending order)	Protozoal	19.2	IBR	15.9	Misc.bact.	6.4
	Misc.bact	7.5	Mycotic	3.5	IBR	6.0
	A. Pyogenes	5.3	Campylobacter	3.0	A.pyogenes	5.0
	IBR	3.8	A. pyogenes	2.7	mycotic	4.3
	Anomalies	2.4	Misc. bact.	2.7	BVD	3.7
	Leptospira	1.9	EBA	0.8	Listeria	2.5
	EBA	1.7	Brucella	0.6	Anomalies	1.4
	BVD	1.5	Leptospira	0.6	Leptospira	0.8
	Nitrate	1.5	Listeria	0.6	Campylobacter	0.5
	Salmonella	1.5	BVD	0.1	Dystocia	0.5
State Reporting						
	Michigan		Oklahoma		Australia (Victoria)	
Years	1983-89		1985-87		1981	
Total cases	847		(Jan.-June)		265	
% Diagnosed	41.0		98		37.0	
% Infectious	22.8		27.5		35.0	
Cause (%) (Descending order)	Misc.bact.	6.6	IBR	4.1	Mycotic	10.4
	A.pyogenes	4.8	Campylobacter	4.1	Salmonella	6.4
	IBR	3.4	Anomalies	4.1	Misc. bact.	4.5
	Mycotic	2.6	A. pyogenes	3.1	Campylobacter	4.1
	Anomalies	2.5	Mycotic	3.1	A. pyogenes	3.8
	Salmonella	2.2	Misc. bact.	3.1	Leptospira	3.0
	Listeria	1.3	Chlamydia	2.0	Protozoal	1.9
	Ureaplasma	0.8	Brucella	2.0	Anomalies	1.5
	Campylobacter	0.2	Leptospira	1.0	Listera	1.1
Prtozoal	0.2	Dystocia	1.0	Brucella	0.4	

◎ **A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California**

Mark L. Anderson, Pat C Blanchard, Bradd C Barr, Rick L. Hoffman

(Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2:283-287)

본 논문은 캘리포니아 진단센타로 의뢰된 486두의 유산태아에 대한 병리조직학적 검사, 미생물검사 및 혈청검사를 기준으로 한 검사결과이다

- ① 총 검사 486두 유산인의 특별한 원인체가 확인된 것은 29.5%인 138두이다. 이중 세균성 유산은 16.2%인 76두에서 확인되었으며 유산은 대부분 산발적인 유산이었다. 세균중 *Actinomyces pyogenes*, *Sterptococcus spp*, *Leptospira spp*, *Salmonella spp*, *E. coli*, 및 *Bacillus spp*.등이 가장 흔하게 분리되었으며 이러한 결과는 Kirkbride가 발표한 것과 유사한 양상을 보이고 있다.
- ② 바이러스에 의한 유산은 5.6%인 26 예에서 확인되었으며 IBR, BVD 그리고 PI3에 의한 유산이 각각 18, 7, 및 1 예였다. 이 결과 역시 Kirkbride의 연구결과와 비슷하다
- ③ 원충성감염에 의한 유산은 3.2%인 15예에서 확인되었다
- ④ 곰팡이성 유산이 1.1%인 5예에서 확인되었다
- ⑤ 1.7%인 8예에는 비감염성 원인에 의한 유산으로 판명되었다. 그 중 7예는 nitrate 중독이었으며 나머지 1예는 lymphoma이었다
- ⑥ 29.9%인 140두에서는 유산의 원인을 뒷받침할 만한 특별한 육안 혹은 병리조직학적 변화가 관찰되지 않았다.
- ⑦ 40.6%인 190두에서는 다양한 형태의 병변은 존재하고 있었으나 특별한 원인체는 확인되지 않았다. 하지만 여기서 특기할 사항은 비록 원충은 확인되지 않았으나 ③에서 언급한 원충성 유산으로 확진된 예들과 유사한 병리조직학적 변화를 보이는 것이 17.1%인 80두에서 확인되었다. 따라서 확진된 예와 추정되는 예를 합치면 20.3%로 현재 알려진 캘리포니아 지역에서 *N. caninum*에 의한 유산율과 비슷한 수치이다.

◎ 미국 South Dakota Animal Disease Research and Diagnostic Laboratory에 의뢰된 유산태아에 대한 원인분석 (총 8,982 case)

Agent	Total	%of total
<i>Actinomyces pyogenes</i>	378	4.22
<i>Bacillus sp</i>	321	3.58
<i>Listeria sp</i>	121	1.35
<i>Escherichia coli</i>	98	1.09
<i>Leptospira interrogans</i>	79	0.88
<i>Pasteurella hemolytica</i>	37	0.41
<i>Streptococcus sp.</i>	27	0.30
<i>Pasteurella multocida</i>	26	0.29
<i>Salmonella sp.</i>	26	0.29
<i>Brucella abortus</i>	24	0.27
<i>Haemophilus sommus</i>	21	0.23
<i>Staphylococcus sp.</i>	21	0.23
<i>Campylobacter fetus spp. venerealis</i>	19	0.21
<i>Campylobacter fetus spp. fetus</i>	17	0.19
<i>Pseudomonas sp.</i>	15	0.17
<i>Campylobacter jejuni</i>	14	0.16
<i>Aeromonas sp.</i>	11	0.12
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	8	0.09
<i>Ureplasma diversum</i>	7	0.08
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	6	0.07
<i>Campylobacter (unidentified)</i>	5	0.06
<i>Chlamydia psittaci</i>	3	0.03
<i>Anaplasma marginale</i>	2	0.02
<i>Proteus sp.</i>	2	0.02
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	2	0.02
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	1	0.01
<i>Enterobacter sp.</i>	1	0.01
<i>Moraxella sp.</i>	1	0.01

Table 4. viruses associated with 8,962 bovine abortions and stillbirths.

	No. of specimens	% of total examined
Bovine herpesvirus-1	485	5.41
Bovine viral diarrhea virus	407	4.54
Bovine herpes virus-4	47	0.52
Enterovirus	2	0.02
Parvovirus	2	0.02
Bovine leukosis virus	2	0.02
Adenovirus	1	0.01
Parainfluenza virus	1	0.01
Pseudorabis virus	1	0.01
Total	948	10.58

○ 최근 축우의 능력이 고능력화로 개량되면서 영양소의 부족과 과급여에 따른 문제점이 크게 부각되고 있으며 축우의 생산성, 번식장애, 유산 및 건강과의 연관성에 대한 연구도 매우 활발하다. 한편 질소와 인 성분은 과다급여에 따른 공해문제도 축산환경오염과 연계시켜 관심이 고조되고 있다. 또한 축우 생산성제고와 건강을 위한 경제적이고 위생적인 최적 환경조건과 관련된 축사시설에 관한 연구결과가 많이 제공되고 있다. 이러한 문제를 다룬 서적들이 최근 발행되었고 그 내용과 정보는 국내 축우산업에도 많은 고려와 도입이 조속히 이뤄져야 할 것이다. 최근 발행서적의 소개로 해외정보를 요약할 수 있겠다. (협동연구과제 조사 자료)

- ① The mineral nutrition of livestock, Underwood와 Suttle 저 (1999), CABI 발행
- ② Forage evaluation in ruminant, Givens등 저(2000), CABI 발행
- ③ Dairy management praticies, housing and cattle health, 미국낙농학회 발행(2000)

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 검사 재료

원인분석에 사용한 가검물들은 연구기간 (1999년 6월 15일부터 2002년 6월 14일) 동안 전국적으로 약 236 개의 젓소목장으로부터 의뢰된 젓소 혹은 한우의 유산태아 338 마리를 대상으로 하였다. 유산가검물의 유산 일령은 crown-rump 길이 혹은 인공수정날짜를 근거로 하여 추정하였다. 또한 2000년 8월에 원주지역에서 신경증상을 보였던 2 에서 7 살된 5 마리의 젓소 성우를 절박 도살한 다음 뇌, 척수를 이용하여 신경증상의 원인규명을 위하여 검사를 수행하였다. 또한 그 후 2000년 9월과 10월에 성우와 비슷하게 태어나자마자 기립불능의 증세를 보이던 19 마리의 생 후 5일령에서 4개월령된 송아지 19마리도 안락사 시킨 다음 부검을 실시하였다.

2. 부검 및 병리조직학적 검사

유산태아는 외관검사를 충분히 실시한 다음 일반적인 부검술식에 준해서 부검을 실시하였다. 부검 후 육안적으로 병변이 확인된 모든 부위와 뇌와 척수 혹은 골격근을 포함한 모든 주요실질장기들을 10% 중성완충 포리말린에 충분히 고정하였다. 고정이 된 조직들은 통상적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀에 포매하였다. 파라핀 포매블록은 4 μ m의 두께로 자른 후 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색하여 광학현미경하에서 병리조직학적 변화를 관찰하였다. 곰팡이나 원충의 개체유무를 확인하기 위해서 필요에 따라서는 원인체의 존재유무를 특수염색을 추가로 실시하여 확인하였다.

3. 유산 관련 세균성 원인체 분리, 동정

유산 가검물로부터 세균성 원인체를 분리하기 위하여 유산 태아를 부검 후 실질장기 (폐, 신장, 심장등) 및 흉, 복수액을 채취하여 Brucella agar (Difco), BPNV agar [Nutrinet agar 916 ml, 10 g dextrose in 50 ml of bovine serum, Bacitracin (25,000 IU/ml) 10ml, Polymyxin B (5,000 IU/ml, 0.83 ml, Nalidixic acid (5mg/l), 1 ml, Nystatin (100 IU/ml), 10 ml, Vancomycin (20mg/l), 10ml, Cycloheximide (100mg/l), 2 ml] 및 Blood agar (Comed) 등

에 접종한후 37°C에서 5% CO₂ 분압하에서 24-48 시간 배양 후 단일집락을 분리하여 Gram염색, oxidase, catalase 등 간단한 생화학적 검사를 실시한 후 미생물 자동 동정 장치 (Vitek system)을 이용하여 동정하였다. 본 연구를 통하여 세균성 원인체 분리 동정을 위하여 사용한 가검물은 유산태아 262 예, 태반 44 예 및 우유 32 예 이었다.

4. Virus 성 질병 원인체의 형광항체검사 및 분리

1) BVD 와 IBR virus를 검출하기 위하여 각각의 direct FA conjugate 를 이용하여 형광항체법을 이용하여 확인하기 위하여 가검물 유제액을 접종한 cell culture plate를 PBS로 washing 한 후 80% acetone으로 10 분간 고정하였다. 고정한 후 37°C에서 10 분간 건조 시킨 후 형광항체와 20분간 37°C에서 반응 시켰다. 반응 후 FA rinse buffer로 washing 하고 형광현미경상에서 관찰하였다.

2) BVD virus 의 분리 ; 유산 가검물을 PBS로 10% 유제액을 하여 4,500rpm에서 30분간 원심분리 후, 상층액을 0.8µm, 0.2µm filter로 연속 여과한후 virus 분리에 사용하였다. 96 well microplate 에 monolayer 가 형성된 MDBK cell 에 가검물 여과액을 접종한후 37°C에서 한 시간 동안 흡착시킨 후 PBS 로 세척하고, 여기에 배양 배지(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)을 추가하여 37°C에서 5 일간 배양한 후, 동일한 방법으로 4 대 계대 배양한후 BVD 특이 CPE를 확인하였으며, 이를 RT-PCR 을 통해 재확인 하였다.

3)Akabane virus 의 분리 ; Akabane virus 의 분리는 Vero cell 과 HmLu-1 cell 을 사용 하여 BVD virus 분리와 동일한 방법으로 수행하였고, HmLu-1 cell 에 3대 계대 배양하여 Akabane virus 특이 CPE를 확인하였으며,이를 RT-PCR 을 실시하여 Akabane virus 특이 band를 확인 하였다.

4) IBR virus 의 분리 ; IBR virus 의 분리는 vero cell을 이용하여 위와 같이 동일한 방법에 의하여 수행하였다.

5. 혈청 검사

Brucella abortus, *Leptospira interrogans*,과 *Campylobacter fetus*의 혈청 검사는 표준화된 tube agglutination test, microscopoe agglutination test,

microplate agglutination test를 실시하였다. *Toxoplasma gondii*와 *Neospora caninum*는 enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) 나 indirect fluorescent antibody test (IFAT) 법을 이용하여 검사하였다. *Tritrichomonas fetus*와 *Chlamydia psittaci*에 대한 혈청검사도 IFAT법을 이용하였다. Akabane 바이러스와 Aino 바이러스는 serum neutralization test (SNT: 혈청 중화시험법)를 이용하여 검사하였다.

6. 아카바네 바이러스의 면역조직화학염색

병변이 확인된 뇌와 척수 혹은 골격근이 포함된 파라핀 블록을 5 μ m의 두께로 박절한 다음 탈파라핀 시킨 다음 순차적으로 알코올로 탈수하였다. 그 후 슬라이드를 3% H₂O₂가 함유된 무수 메탄올에서 5분간 처리하여 내인성 peroxidase activity를 제거하였다. 다음 0.1% pronase로 37°C에서 10분간 처리한 후 blocking solution (Zymed, USA)에 반응시켜 비특이반응을 제거하였다. 일차 항체는 1:256으로 희석한 AKV OBE-1에 대한 rabbit polyclonal antibody를 M. Haritani로 (일본 National Institute of Animal Health)부터 분양 받아 실험에 사용하였으며 4°C에서 overnight하여 반응시켰다. 이차 항체는 biotinylated goatanti-rabbit IgG (Vector Lab, USA)를 1:200으로 희석하여 37°C에서 20분간 반응시킨 뒤 avidin-biotin complex 용액에 20분간 적용시키고 DAB로 발색시켰다. 핵대조 염색으로는 Harris' hematoxylin 염색을 하여 광학현미경으로 검경하였다. 양성대조군으로는 실험적으로 OBE-1주를 감염시킨 마우스 뇌조직을 이용하였다.

7. RT-PCR

뇌와 척수조직을 액체질소를 이용하여 균질화시킨 후 TRIZOL 용액 (GIBCO BRL, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA 합성 kit (Takara, Japan)를 이용하여 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 제작하였다. 아카바네 바이러스 S gene를 target으로 하였으며 primer의 순서는 기존의 논문을 참조로 하여 forward (5'ACCAGAAGAAGGCCAAGATG3')과 reverse (5'CACACGGTGCATGTCGATTA3')를 사용하였다. PCR 혼합액의 조성은 3 μ l의 cDNA를 포함한 25 μ l의 반응액으로 구성하였다. 반응액에는

3.5 mM MgCl₂, 10X reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.1% Triton X-100), PCR primer를 각 50 pmol, 각각의 dNTP를 0.3 M, 1 unit Taq polymerase를 사용하였다. PCR은 Perkin-Elmer Thermocycler 9600을 이용하여 수행하였으며, 반응조건은 94℃에서 5분간 predenaturation 하였으며, 94℃에서 30초간 denaturation, 58℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension 하는 과정을 30회 반복하고 마지막으로 72℃에서 7분간 extension 하도록 하였다. 증폭산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하였으며 ethidium bromide로 염색하여 자외선광으로 DNA 증폭산물을 확인하였다. 아까바네 바이러스 OBE-1을 양성대조군으로 사용하였으며 정상소의 뇌조직을 음성대조군으로 사용하였다.

8. 기타 검사

신경증상을 보였던 성우와 송아지에 대해서는 다음에 열거한 원인체에 대해서 기존의 발표된 자료 및 방법을 통하여 PCR을 수행하였다. bovine ephemeral fever virus, bovine immunodeficiency virus, IBR, BVD, bovine herpes virus-5 와 *Chlamydia*에 대해서 PCR을 수행하였으며 *N. caninum*의 경우는 파립핀블록을 이용하여 PCR을 수행하였다. 또한 혈청중화시험법을 이용하여 Chuzan virus, bovine ephemeral fever virus, BVD, Ibaraki 그리고 일본뇌염 바이러스에 대한 혈청검사를 수행하였고 아울러 간접형광항체법을 이용하여 *N. caninum*과 *Chlamydia*에 대한 검사를, ELISA를 이용해서는 Aujesky's disease 바이러스에 대한 혈청검사를 수행하였다.

제 3 절 결과

유산태아에 대한 검사 및 분석 결과는 Table 1 에 요약하여 표시하였다. 검사를 실시한 총 338 두 중 59.6 %인 201두에서 유산의 정확한 원인을 밝힐 수 있었으며 사후변화가 매우 심하여 부검을 실시하지 못한 27두를 포함하여 137두에서는 유산을 뒷받침할 만한 특별한 원인을 찾아낼 수 없었다.

1. 육안소견

대부분의 예에서는 특별한 육안소견을 관찰할 수 없었다. 두 개체에서는

0.5 에서 4 mm에 달하는 한계명료한 유백색조의 반점들이 심근과 골격근에서 관찰되었다. 소뇌 형성부전 (cerebellar hypoplasia)과 arthrogryposis-hydranencephaly (AHS) syndrome은 각각 4와 9예의 유산태아에서 관찰되었다 (Figs 1 to 5). 한 예에서는 심장에서 유백색조의 결절이 존재하고 있었고 신장의 수질부위도 유백색조의 색조로 변색되어 있었다. 기타 부검 시 관찰되었던 육안 소견들로는 제대의 꼬임증, 이두 기형체 (Fig. 6), 심실중격 결손과 같은 심장기형, 간 섬유화가 동반된 간비대증 등이 있다.

2. 병리조직학적 소견

검사한 338예 중 71예에서 네오스포라 감염을 의심할 수 있는 병리조직학적 변화를 관찰할 수 있었다. 경도에서 심한 정도의 다발 병소성 피사를 동반한 비화농성 염증성 변화가 뇌, 심장, 심위막 그리고 간혹 간에서 관찰되었다. 뇌에서는 뇌막과 혈관주위에 임파구, 형질세포와 대식구의 침윤이 관찰되었으며 그와 더불어 뇌실질에서는 국소 다발성의 피사 및 gliosis등이 확인되었으며 (Figs 7 and 8) tissue cyst 도 병변 부위에서 관찰되었다 (Fig. 13). 심장과 골격근에는 임파구, 형질세포 및 대식구의 침윤이 관찰되었고 심근과 골격근들은 그로 인하여 피사 또는 단절되어 있었다 (Figs 9 and 11). 심근에 병변이 확인되었던 대부분의 예에서는 심한 임파구, 형질세포와 대식구의 침윤으로 인하여 심외막이 심하게 비후된 것을 확인할 수 있었다 (Fig 10). 간에서도 portal과 periportal 부위에 간세포의 피사 및 단핵구의 침윤이 확인되었다 (Fig 12). 면역조직화학 염색을 실시한 결과 일부의 예에서는 뇌와 심근 등에서 바나나 형태의 tachyzoite를 확인할 수 있었고 대뇌에서는 두꺼운 벽으로 이루어진 tissue cyst도 확인되었다 (Fig 14). 31예에서는 다른 실질장기에는 병변이 없이 단지 밑에서 언급된 성우와 송아지에서 처럼 뇌와 척수에서 신경소실이 동반된 비화농성 염증이 존재하는 것이 확인되었다 (Figs 16-18).

12예에서는 급성 화농성 폐렴병변이 존재하고 있었고 1예에서는 화농성 뇌막뇌염(meningencephalitis)이 확인되었다 (Fig 19). 형광항체 검사에서 IBR에 양성이었던 2예에서는 국소성의 감염 및 비장염이 동반되었다. 하지만 병리조직학적 관찰결과 두 예 모두에서 바이러스성 봉입체는 확인되지 않았다.

한 예에서는 전신장기로 파급된 림프육종이 확인되었다 (Figs 20 and 21).

신경증상을 보였던 성우에서는 병변의 심하기 정도에서는 차이가 있었지만 대체적으로 대뇌와 척수에 공히 전형적인 비화농성 염증소견이 관찰되었다. 대뇌의 경우 혈관주위 단핵구 침윤 (perivascular cuffing), 신경세포의 괴사 및 탐식 (neuronophagia)와 gliosis등이 관찰되었다 (Figs 23 and 24). 병변은 대뇌 중 pons나 medulla oblongata등 뇌간부위에서는 병변이 특히 심했다. 척수에서는 병변이 ventral horn gray matter에 양측성으로 뇌에서 보였던 비화농성 염증이 관찰되었다 (Figs 25 and 26). 골격근은 심하게 위축되어 있었다. 아까바네 바이러스 특이 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 실시한 결과 검사한 성우 5두 중 4두에서 양성 반응을 보였다 (Figs 27 and 28). PCR 검사에서도 성우 5두 중 4두에서 아까바네 바이러스 S gene에 대한 양성밴드를 검출할 수 있었다 (Fig 29). 기립불능의 증상을 보였던 송아지에서도 (Fig. 22) 개체간에 병변의 정도 차이는 있지만 역시 성우에서 관찰되었던 것과 거의 유사한 병리조직학적 변화를 확인할 수 있었다.

3. 혈청 검사

세균성 원인체에 대하여는 총 2,246 예의 혈청에 대하여 세균학적 질병에 대하여 검색한 결과 Table 2와 같다. 즉, *Brucella* 는 2,246 개의 혈청 검사 결과 두 개체가 양성을 나타내었고, *Leptospira* 는 검사를 실시한 81 두 모두 음성이었다. *Campylobacter* 는 81 두 중 17 두가 (21%) 양성 반응을 나타내었다. Q fever 에 대하여는 185 두 중 18 두가 (9.7%) 양성을 나타내었다.

바이러스성 원인체에 대하여는 아래 표에서와 같이 본 연구기간 동안 2,979 예의 가검 혈청에 대하여 소 유산 관련 virus 에 대한 혈청학적 검사 결과 BVD virus 에 대하여 77.0% 로 가장 높게 나타났고, Akabane virus 에 대하여는 53.3%, IBR virus 에 대하여는 10.6% 로 나타났다. 원충의 경우는 *N. caninum*의 경우를 제외하고는 연구기간 중 의뢰된 모든 개체는 *T. gondii*와 *T. fetus*에 대해서는 음성이었다.

4. 소 전염성 원인체의 분리, 동정 및 검색

소 유산증의 원인 분석을 위하여 본 연구를 통하여 (1999. 6. 15 - 2002. 5. 31) 세균성 원인

체를 분리, 동정 하기 위하여 사용한 가검물 (유산태아 262 예, 태반 44 예, 우유 32 예) 로 분리, 동정한 세균은 342 주로 다양하였으나, 소 유산과 직접적으로 관련이 있을것으로 생각되는 균주는 없었다 (제 5 장 의 표 참조).

5. 형광항체법을 이용한 바이러스 검색 및 바이러스 분리 동정

1) 형광항체법 검사 결과

BVD 와 IBR virus를 검출하기 위하여 각각의 direct FA conjugate (VMRD, INC, Catalog No. 210-62-BVD 와 Catalog No. 210-690 IBR)를 이용하여 형광항체법에 의하여 실시하고 형광현미경상에서 관찰하였다. 관찰결과 가검물 중 BVD virus 및 IBR virus 가 각각 16 개 및 5 개가 검출되었다.

2) 바이러스 분리 결과

Virus 분리는 Table 3에서와 같이 본 연구기간동안 바이러스 분리를 위하여 사용한 가검물은 유산태아를 포함하여 총 426 예이었으며 이중 IBR virus 14 예, BVD virus 31 예, Akabane virus 6 예를 동정할수 있었고, 분리된 바이러스는 IBR virus 5 주, BVD virus 5 주, Akabane virus 1 주 이었다.

TABLE 1 Summary of the causes of 338 aborted bovine fetuses

Cause	Number of fetus	Percentage
Infectious	168	49.8
Neospora caninum	71	21.0
confirmed*	59	17.5
presumptive**	12	3.5
Bacterial infection	13	3.9
bronchopneumonia	12	3.6
meningoencephalitis	1	0.3
Viral infection	84	24.9
Akabane	31	9.2
Arbovirus	47	13.9
IBR	2	0.6
BVD	4	1.2
Non infectious	33	9.8
Iatrogenic	2	0.6
Dystocia	2	0.6
Congenital lymphosarcoma	1	0.3
Multiple pregnant	8	2.4
Atresia coli	1	0.3
Ventricular septal defects	2	0.6
Diprosopus	1	0.3
Maternal weakness and toxemia	8	2.4
Environmental stress	4	1.2
Tortion of the umbilical cord	1	0.3
Fibrosing hepatomegaly	2	0.6
Splenic rupture	1	0.3
Unnecropsied***	27	8.0
Unknown	110	32.5
Total	338	100

* lesion present and PCR- and sero-positive

**lesion present but PCR- and sero-negative

***can't be necropsied due to severe postmortem autolysis

Table 2 Summary of serology for bacterial pathogen

질병명	항 체 양 성 수			
	Brucella	Leptospira	Campylobacter	Q fever
양성수/가검물수	2/2,246	0/81	17/81	18/185

* Brucella 에 대하여는 전체 우군들에 대하여 실시하였으나 기타는 유산을 나타낸 개체들에 대하여 실시하였음.

Table 3 Summary of serology to IBRV, BVDV, and Akabane virus

혈청수	항 체 양 성 율		
	IBRV	BVDV	Akabane virus
1 년차 711	43 (6.05%)	578 (81.29%)	298 (41.91%)
2 년차 1,846	223 (12.1%)	1,390 (75.3%)	994 (53.8%)
3 년차 422	51 (12.1%)	327 (77.5%)	297 (70.4%)
총 계 2,979	317 (10.6%)	2,295 (77.0%)	1,589 (53.3%)

Table 4 유산가검물로부터 분리, 동정된 IBR virus, BVD virus 및 Akabane virus

가검물수	바이러스 동정수			바이러스 분리수		
	I	B	A	I	B	A
1 년차 114	5	14	0	1	2	0
2 년차 256	2	2	6	2	2	1
3 년차 56	2	1	0	2	1	0
총 계 426	14	31	6	5	5	1

I : IBR virus, B : BVD virus, A : Akabane virus

제 4 절 고찰

예시된 바와 같이 원인분석을 실시한 338두의 유조사산 태아에 대한 최종 진단별 분류는 감염성원인에 의한 유산이 168두로 49.8%를 차지하였으며, 비 감염성원인에 의한 유산은 33두로 9.8%를 그리고 사후변화가 심해 부검을 통한 원인 규명이 불가능한 경우가 27두로 8.0% 였으며, 원인을 규명할 수 없는 유산태아는 110두로 32.5%였다. 감염성 원인으로는 *N caninum*에 의한 것이 71두 21%(의증 포함), 세균성유산이 13두로 3.9%를 보였다. 바이러스성 유산으로는 Akabane에 의한 유산이 31두 (9.2%), IBR 2두 0.6%, 그리고 BVD에 의한 유산이 4두로 1.2%였다. 한편, 정확한 원인은 확인되지 않았으나 Akabane와 같은 arbovirus 감염으로 추정되는 예가 47두 (13.9%)로 높은 비중을 차지하고 있었다.

특히 연구기간 동안 Akabane를 포함한 arbovirus에 의한 유산이 78두인 23.1%로 조사되었으며, 이는 2000년 가을에서 2001년 봄 동안 전국적으로 이의 발생이 빈발했던 요인에 기인되었다. 이는 본 연구팀에 의해 이미 원인 규명된 2000년 여름 및 초가을에 전국적으로 발생한 소위 “downor cow syndrome” (진단은 원주지역의 일부 소에 국한된 것임) 이후에 임신우에서 이에 의한 유조사산이 전국적으로 발생한 점은 역학적으로 주목해야 할 점으로 사료된다. 또한 전국적 혈청학적 조사에서도 나타나듯이 *N caninum* 양성우는 547두 (21%) 이었으며, 이러한 높은 양성율이 실제 유산의 직간접적으로 *N caninum*이 원인으로 기여하여 조사된 유조사산 태아의 71두 (21%)가 이에 의한 유산으로 판명된 것으로 사료된다. 소에 있어서 바이러스 질환에 대한 백신 접종이 다른 축종에 비해서 낮은 실정으로 세균 및 바이러스가 여전히 유산의 원인으로 작용하고 있음이 입증되었다. 또한 유산원인 규명에 있어 선진외국의 연구자들의 연구결과에서도 유산의 확진율은 40% 전후인 것을 감안할 때 본 연구과제에도 원인을 규명할 수 없는 유산이 32.5%로 나타났는데 이는 조사기간 동안 다수의 Akabane에 의한 유산의 원인규명이 용이했고 *N caninum*에 의한 유산의 진단법이 향상되었기 때문으로 사료된다.

본 조사에서는 검사 두수 전체 338예 중 59예가 병리조직학적 변화, 면역 화학염색, PCR 및 혈청검사를 종합하여 볼 때 네오스포라 감염에 의한 유산 임이 확인되어 전체 유산 약 17.5%을 차지하고 있음이 본 조사를 통해서 확인되었다. 그러나 네오스포라를 제외한 *T. gondii*와 *T. fetus*에 의한 유산은 확인되지 않았으며 혈청검사에서도 모두 음성인점으로 미루어 볼 때 국내에서 소 유산과 관련된 원충으로는 *N. cainum*만 문제 시 되고 있는 것으로 밝혀졌다.

현재까지는 네오스포라 감염에 의한 소의 반복 유산은 매우 드문 것으로 알려져 있다. 국내에서도 네오스포라에 의한 반복유산은 단 1예가 보고된 바 있다. 본 연구에서는 네오스포라를 포함하여 동일원인에 의한 반복유산은 확인되지 않았다. 전세계적으로 네오스포라 감염에 의한 반복유산은 약 4% 정도로 추정되고 있다.

12마리의 태아와 1마리의 유산태아에서는 세균감염으로 추정되는 화농성 기간지 폐렴과 뇌막뇌염이 관찰되었으나 세균 분리동정을 실시한 결과 원인과 직접적으로 관련된 말한 세균은 확인되지 않았다. 그러나 유산개체의 태반에 대한 동일한 검사가 거의 이루어지지 않은 제한된 점이 있다. 세균 감염 등과 같이 감염성 유산에서는 특히 유산태아와 더불어 태반에 대한 검사도 매우 중요하다 하지만 한국의 실정에서는 유산이 일어나게 되면 태반을 목장에서 같이 사육하는 동물들에게 주는 습성이 있는 관계로 인하여 태반을 검사하기란 쉽지가 않은 사항이다.

아까바네 바이러스는 모기에 의해서 전파되면 감염 시 소에서 유사산을 일으키며 특징적인 "AHS"를 유발한다. 한국에서도 1980년 박동에 의해서 최초로 본 바이러스 감염에 의한 유산이 확인된 바 있다. 하지만 최근에 일본에서는 태어난 지 얼마 안 되는 송아지에서도 아까바네 바이러스 감염에 의한 비화농성 뇌척수염이 확인된바 있다. 본 연구 기간 동안 세계에서 최초로 아까바네 바이러스가 성우에서도 심한 신경증상을 동반한 감염증을 유발할 수 있다는 사실을 입증한 셈이다. 또한 비슷한 시기에 송아지에서도 역시 일본의 경우와 유사하게 아까바네 감염증을 확인하였다. 흥미로운 사실은 성우와 송아지에서 2000년 여름과 가을에 거의 전국적으로 문제시되었던 성우와 송아지에서 2000년 겨울과 2001년 초봄에 AHS가

동반된 아까바네 바이러스 감염에 의한 유산이 다른 해에 비해서 상대적으로 많이 증가했다는 점이다. 이는 아마도 감염된 모체로부터 혈행성으로 바이러스가 임신 중인 태아로 감염되었을 것으로 추정할 수 있다. 자세한 발병기전은 알 수 없으나 2000년 봄 소에서 문제되었던 구제역 때문에 농가들이 백신 접종을 소홀히 한 것과 연관이 있을 것으로 사료된다. 하지만 다른 환경적이나 기타 여러 1차적인 원인에 대한 것도 충분히 고려되어야 하며 아울러 그와 같은 것이 또다시 문제시 될 경우 본 연구결과는 좋은 참고자료로 활용할 수 있을 것이다. 바이러스감염에 의한 유산은 아까바네등 arbobvirus 감염에 의한 것이 거의 대부분이었으며 나머지 IBR과 BVD에 의한 유산만이 확인되었다.

비 감염성원인으로는 의인성 약물의 오용등에 의한 유산이 2두 0.6%로 임신기의 중간발정이 도래하는 경우 이를 비 임신으로 인한 진성발정으로 오인하여 발정을 재개하는 PGF제제의 투여에 의한 유산이었다. 약물 오용에 의한 유산가능성으로는 Steroid 성분이 함유된 소염제의 주사에 의한 원인이 있으나 본 연구과제에서는 목격되지 않았다. 또한 임신중의 백신이나 기타 제제의 투여에 의한 유산의 경우도 목격되지 않아 목장에서 임신우에 대한 약물의 오남용을 주의하고 있음을 알 수 있었다.

임신말기 유산으로 의뢰되었으나 병력청취 난산 2두 0.6%가 조사되었다. 분만 시 목장주가 관찰하지 못하였거나 분만과정의 어려움으로 인해 산도에서 폐사한 경우였다.

본 연구과제의 수행 중에 선천성 림프육종 (congenital lymphosarcoma) 1두 0.3%가 발견되었으며, 이는 대부분 동물에서 관찰되는 종양 중 가장 흔한 종양으로 소에서는 7-8년된 성우에서 주로 발생하는 것으로 알려져 있다. 여러 가지 발생 기전 중 retrovirus인 소 백혈병바이러스가 원인체로 작용한다고 알려져 있으나 유산 모체가 도태처리되어 검사하지는 못하였지만 이러한 림프육종이 유산태아에서 발견된 것은 국내 최초의 보고였다.

다태임신 시 단태에 비해 유산발생 비율은 높은 것으로 알려져 있다. 특히 다태임신 시에는 태아에 가해지는 stress가 높아 이로 인한 태아성 cortisol 분비 및 난소 및 자궁환경의 변화 즉, estrogen의 과다 및 progesterone의 분비부족과 이로 이어지는 PFG의 분비로 태아가 배출되는

것으로 알려져 있다. 임상학적 검사를 통해 다태임신에 의한 유산이 8두 2.4%를 진단하였으며, 7두에서는 2두를 임신하였고 1두의 한우에서는 4두의 다태임신 상태이었다.

조산된 태아에서 선천적 항문폐쇄 자우가 의뢰되어 부검결과 atresia coli로 진단되었다. 여러 가지 발생원인을 추정하고 있으며, 이중 직장검사를 통한 임신진단도 atresia coli를 증가시킨다는 추정이 있으나 이를 입증할 연구는 보고되어 있지 않다. 대부분 태아는 정상적으로 분만되어 수일내에 폐사에 이르게 된다. 1두 0.3%가 조사되었다.

심장판막결손 2두 0.6%가 발견되었다. 이들은 정상상태로 분만되어 폐사되었으며, 부검결과 이로 판명되었다. 이안체 1두 0.3%가 보였다. 일종의 중복기형(Double monster)으로 부르기도 한다. 수정란의 불완전한 분할에 의하며 매우 다양하다. 일부만 합체된 경우도 있으나 대부분 정상분만을 기대하기 어려울 뿐만 아니라 분만의 어려움으로 인해 모체에 치명적인 손상을 초래한다. 정상분만은 어렵고 태아 절제술이나 제왕절개를 통해 추출하는 것이 일반적이다. 본 연구과제에서 진단된 이안체는 diprosopus 구강을 포함한 두 얼굴을 지니고 구개열이 파열되어 있으며 완전히 두 개의 머리로 분리되지는 않았다. 절제술이나 제왕절개술이 필요하다. 본 예에서는 연구팀이 도착하기 전에 무리한 견인추출로 태아는 폐사된 상태였고 모체는 심한 산도의 손상 및 출혈로 회복되기 어려운 상태였다. 이와 유사한 중복기형으로는 이두체(dicephalus)로 한개의 견갑부에 2개의 머리가 붙어있는 것으로 한쪽 머리를 자른 후 절제술 또는 제왕절개술을 실시해야 한다. 이두체는 본 연구기간동안 목격되지 않았다. 그밖에 태아기형으로 dipygus로 몸통 및 일부 다리가 중복으로 존재하는 경우와 Siamese twins(somatodidymi)로 흉골이나 다른 부위만 합체되어 있으며 나머지는 거의 완벽하게 분리되어 있는 경우 그리고 둔부가 붙어 반대 방향으로 위치해 있는 pygodidymus가 있으나 본 연구기간 동안 목격되지는 않았다.

임상학적 검사를 통해 모체의 쇠약 및 독혈증으로 인한 유조사산이 8두로 2.4%를 보였다. 대부분 전신질환과 연관된 것으로서 모체의 급성유방염 (1두), 고창증 (1두), 기타 소화기 장애 (2두) 및 비 특이성 소모성질환 (4두)에 이환된 경우였다. 대부분 모체도 더 이상 임신을 유지할 수 없는 상태였고

1두에서는 이미 태아 침지가 발생한 상태였으며, 1두에서는 심한 자가용해가 발생한 상태로 태아에서 원인을 찾기 어려운 경우였다.

급격한 기후변화 및 인위적 소음에 의한 환경스트레스성 유산이 4두 1.2%로 조사되었다. 1두의 예에서는 여름철 급작스런 천둥번개로 인해 우군의 동요가 목격된 경우로 24 시간 후에 유산이 발생하였다. 또한 3두의 예에서는 인근에 대형 공사가 진행 (교량 및 도로)되고 있는 지역이었으며, 평상시의 소음도 문제가 되었으나 공사 중 폭약 사용으로 인한 폭파소음이 유산에 관여한 것으로 임상학적 검사를 통해 확인할 수 있었다. 이들 4두에서 다른 감염성 원인은 발견할 수 없었다. 이들의 유산 기전은 stress에 의한 cortisol 분비 및 이로 인한 황체의 퇴행, 그리고 난소내에서 progesterone감소 및 estrogen치의 증가로 인한 자궁수축과 자궁경의 이완에 의해 유산에 이르게 된 것으로 사료된다.

또한 제대염전에 의한 유산이 1두 0.3%가 있었으며, 심한 제대의 꼬임을 육안적으로 확인할 수 있었다. 비 특이성 원인에 의한 비장파열 및 이차적인 hypovolemic shock에 의한 유조사산이 1두 0.3% 목격되었으며, 다른 감염성 원인은 발견되지 않았다.

그러나 본 연구기간의 조사된 338두 중 27두 8.0%는 자가용해가 심해 병리조직학적 진단을 통한 원인규명을 할 수 없었다. 자가용해는 2가지로 구분할 수 있는데 태아가 모체 자궁내에서 폐사하여 2-3일 이상 경과한 경우에 흔히 보였다 (폐사는 유산의 징후가 보인 시점 즉, 등을 구부르며 노책, 질 삼출물 출현 등, 을 기준으로 함). 또한 모체내에서는 자가용해 되지 않고 배출되었으나 여름철의 경우 외기내에 6-12시간 이상 노출된 경우에는 병리조직학적 검사를 수행할 수 없을 정도로 자가용해와 부패가 진행되었다. 일부의 예에서는 임상학적 검사 및 혈청학적 검사를 통해 원인을 진단할 수 있었으나 27두에서는 규명하지 못 하였다.

본 연구에서 총 338두 중 94두 27.8%에서는 세균, 바이러스 및 기생충학적 검사와 임상학적 소견으로도 원인을 밝힐 수 없었다.

결론적으로 말하면 본 조사에서는 국내의 경우 단일 원인체로는 *N. caninum*이 국내 젖소의 유사산과 관련된 가장 중요한 원인체임이 확인되었고 다른 나라와의 결과를 비교해 볼 때 곰팡이에 의한 유산이 관찰되지 않았

을 뿐 대체로 비슷한 양상을 보였다. 연구기간 동안 바이러스에 의한 유산이 높았던 것은 arbovirus 감염에 의한 유산이 일시적으로 증가했던 것과 연관이 있으리라 본다. 하지만 대부분의 외국의 survey조사에도 볼 수 있듯이 실제로 많은 예에서는 특별한 원인을 확인할 수 없었다. 따라서 앞으로도 국내에서 발생하는 쯏소 및 한우의 유산에 대한 조사는 국가적인 차원에서 지속적으로 수행되어야 하리라 사료된다.



Fig. 1. Note arthrogryposis of an aborted bovine fetus

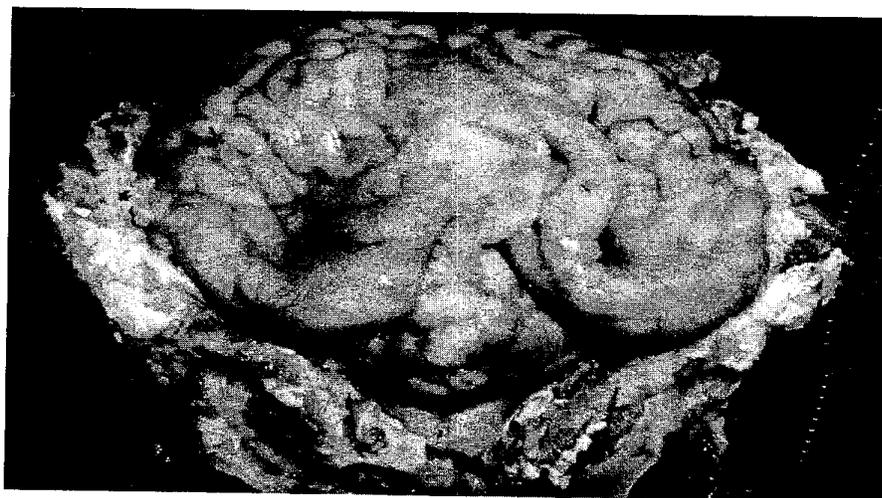


Fig 2. Note porencephaly



Fig. 1. Note arthrogyriposis of an aborted bovine fetus



Fig 2. Note porencephaly



Fig. 3 Note hydranencephaly

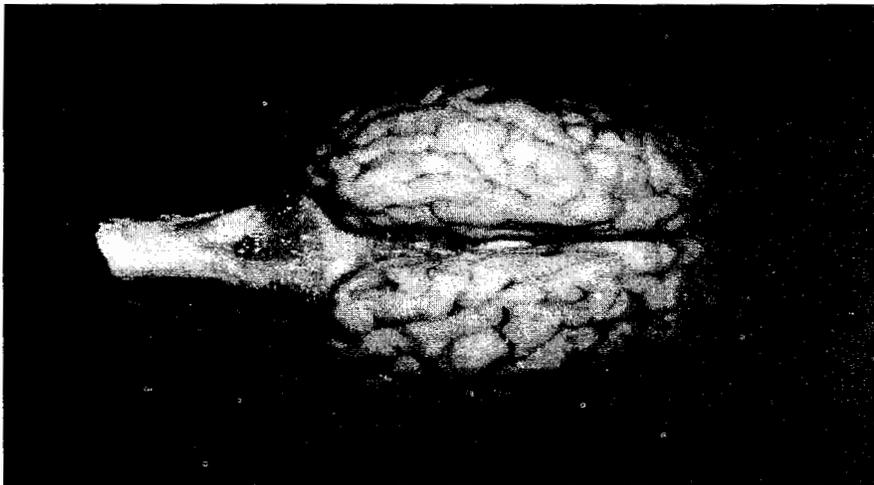


Fig.4 Note cerebellar hypoplasia

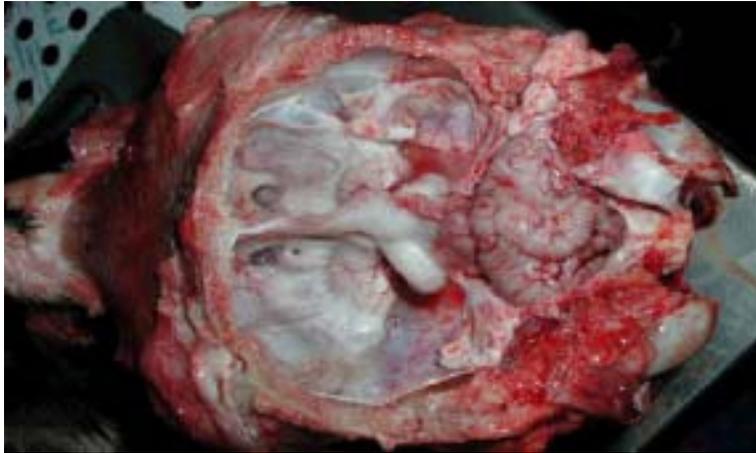


Fig. 3 Note hydranencephaly



Fig.4 Note cerebellar hypoplasia



Fig. 5. Note cerebellar hypoplasia

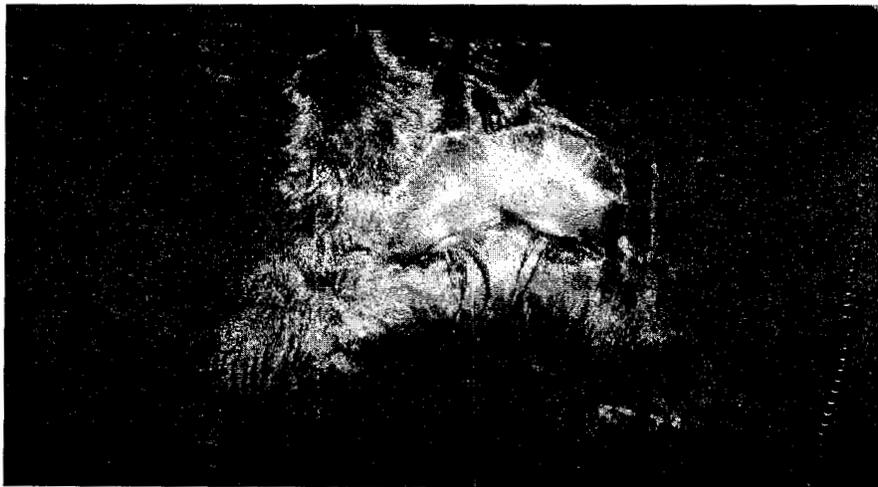


Fig. 6 Note Diprosopus

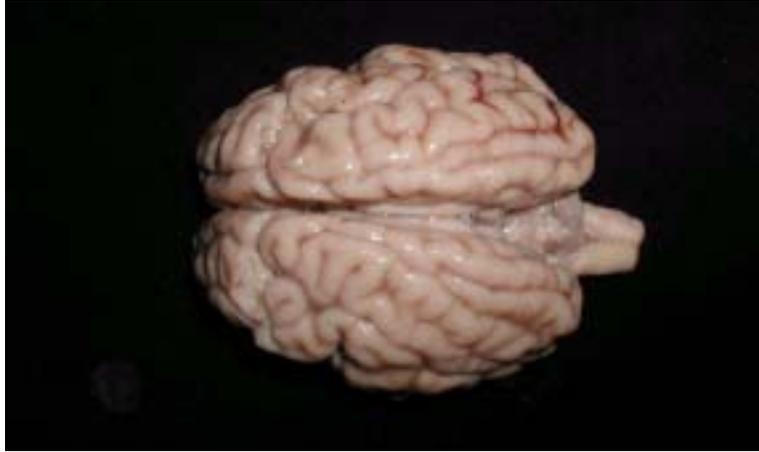


Fig. 5. Note cerebellar hypoplasia



Fig. 6 Note Diprosopus

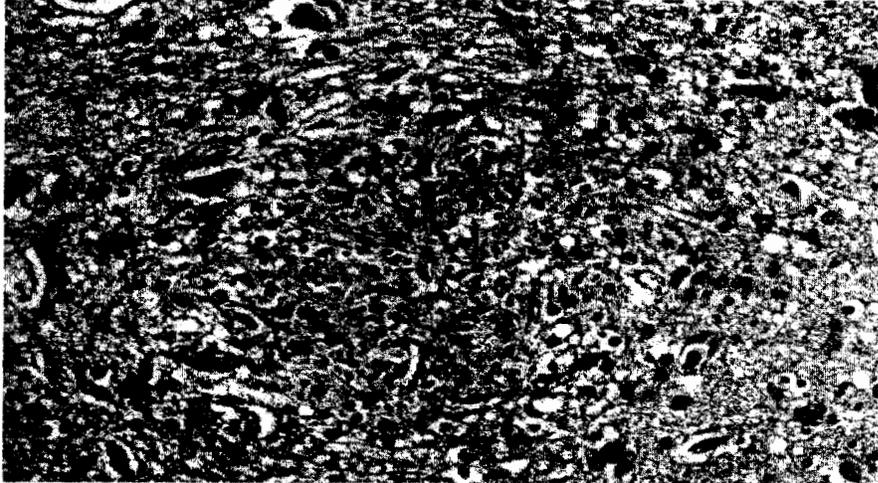


Fig. 7. Note focal necrotizing npsuuppurative inflammation in the brain. HE.

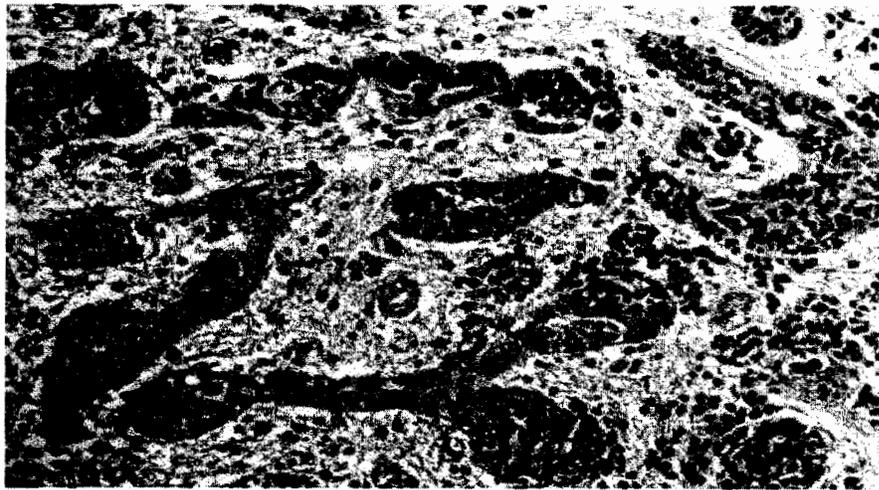


Fig. 8 Note severe perivascular cuffing of mixed mononuclear cells. H&E.

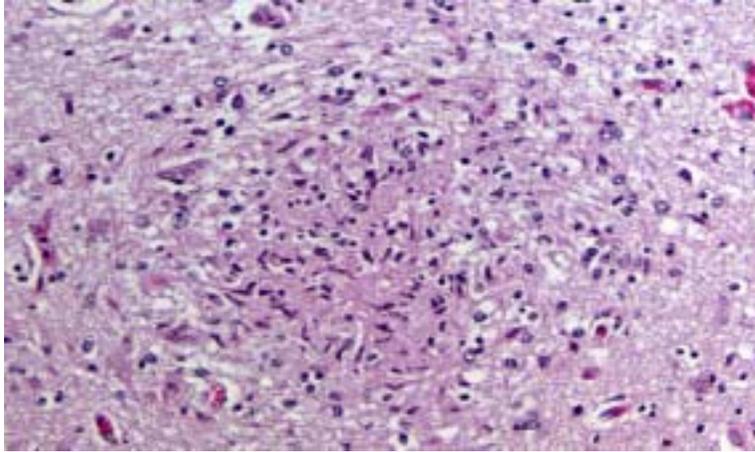


Fig. 7. Note focal necrotizing npsuuppurative inflammation in the brain. HE.

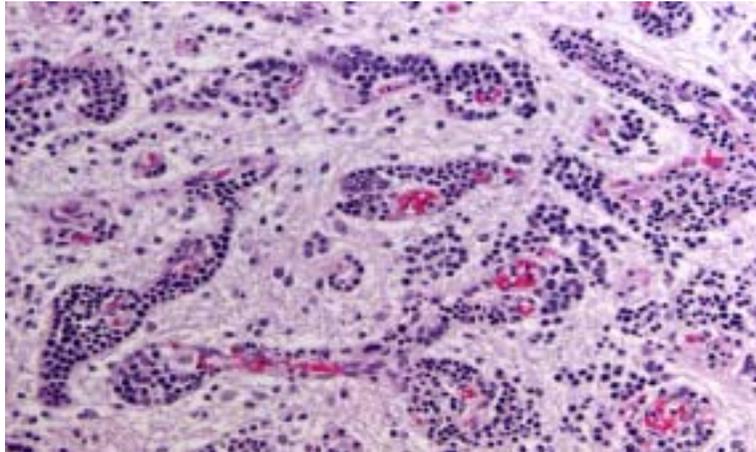


Fig. 8 Note severe perivascular cuffing of mixed mononuclear cells. H&E.



Fig. 9 Note severe thickening of the pericardium secondary to severe nonsuppurative inflammation. H&E

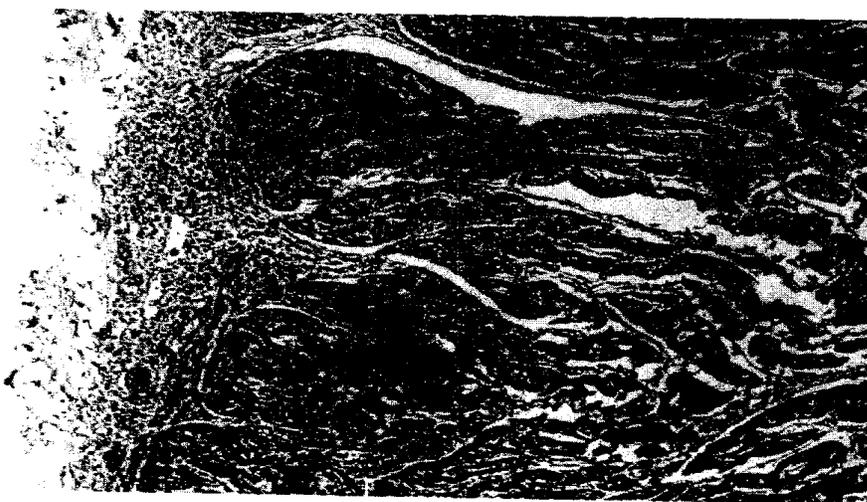


Fig. 10 Note severe nonsuppurative inflammation of the myocardium. H&E.

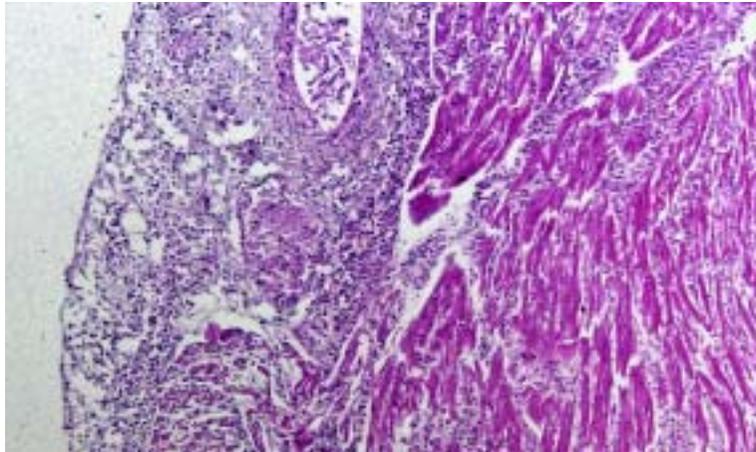


Fig. 9 Note severe thickening of the pericardium secondary to severe nonsuppurative inflammation. H&E

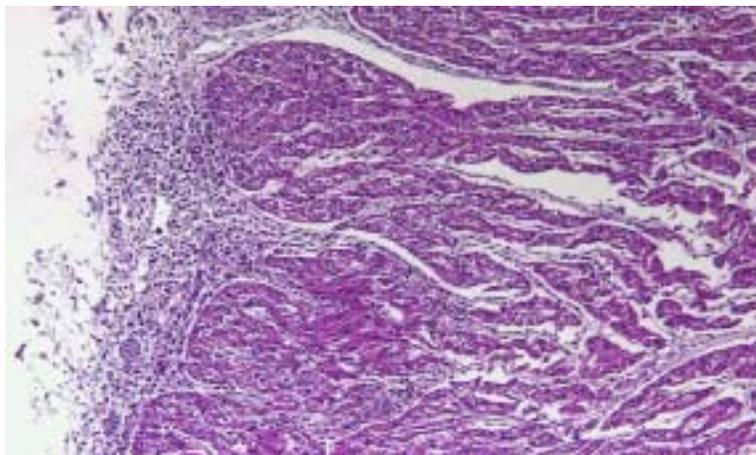


Fig. 10 Note severe nonsuppurative inflammation of the myocardium. H&E.

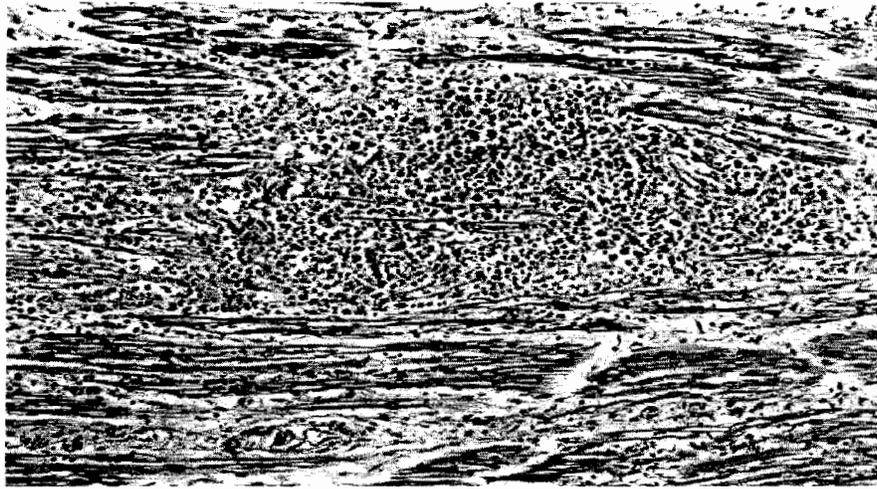


Fig. 11. Note severe nonsuppurative inflammation with myofibrillar necrosis of the skeletal muscle. H&E.

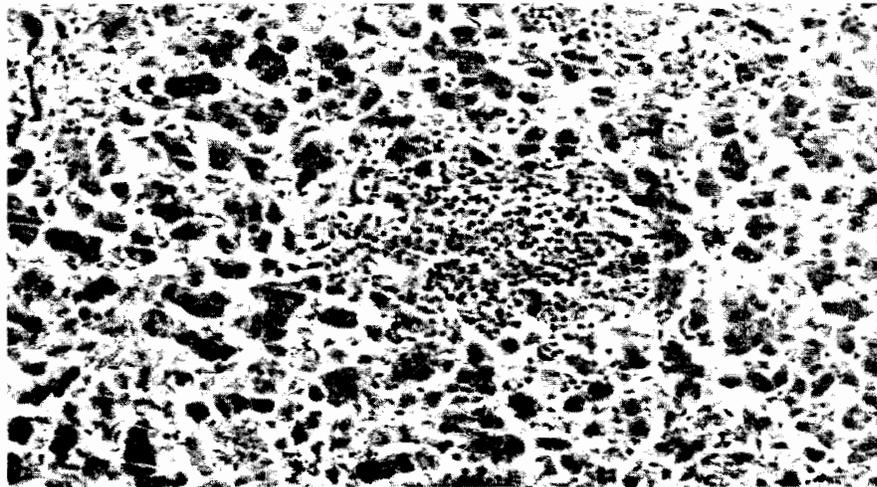


Fig. 12. Note focal nonsuppurative inflammation of the liver. H&E.

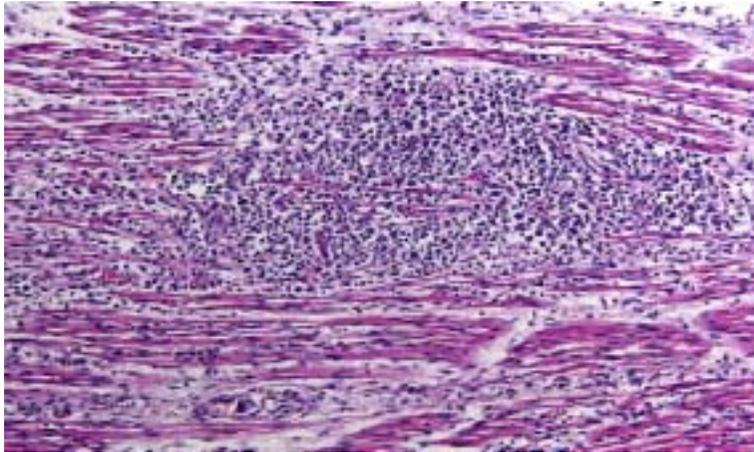


Fig. 11. Note severe nonsuppurative inflammation with myofibrillar necrosis of the skeletal muscle. H&E.

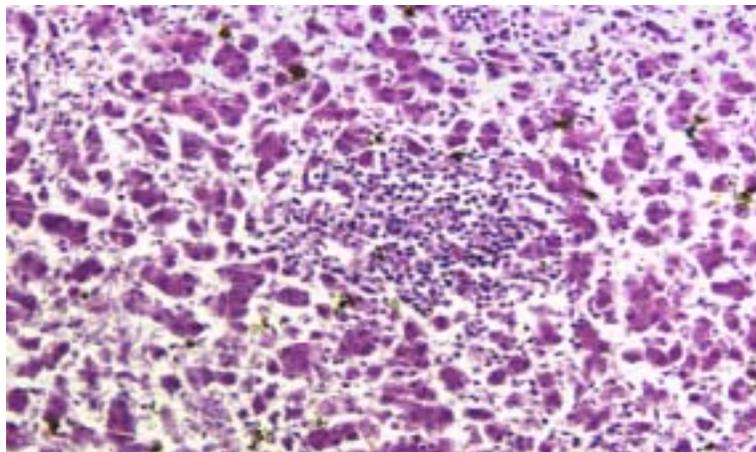


Fig. 12. Note focal nonsuppurative inflammation of the liver. H&E.

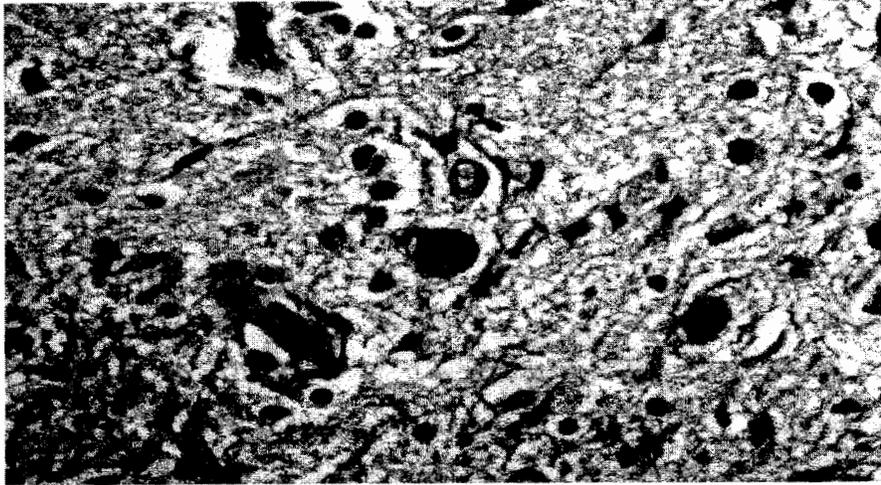


Fig. 13. Note tissue cyst in the neuropil. H&E.

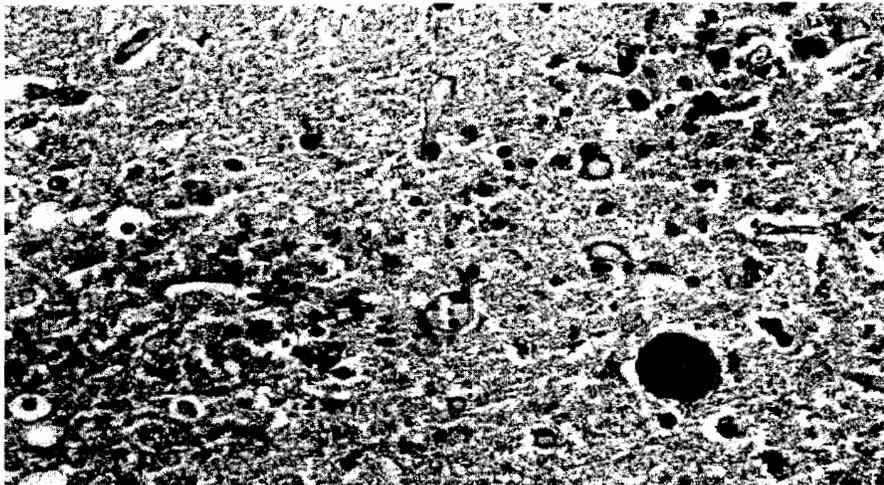


Fig. 14 Note tissue cyst and aggregates of tachyzoites in the neuropil. ABC.

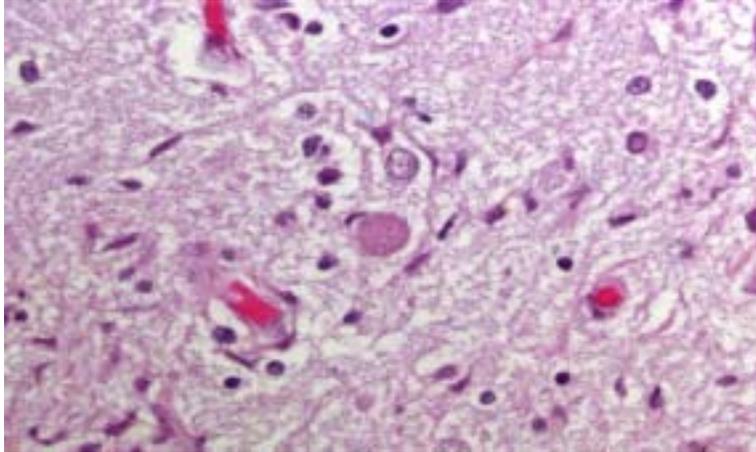


Fig. 13. Note tissue cyst in the neuropil. H&E.

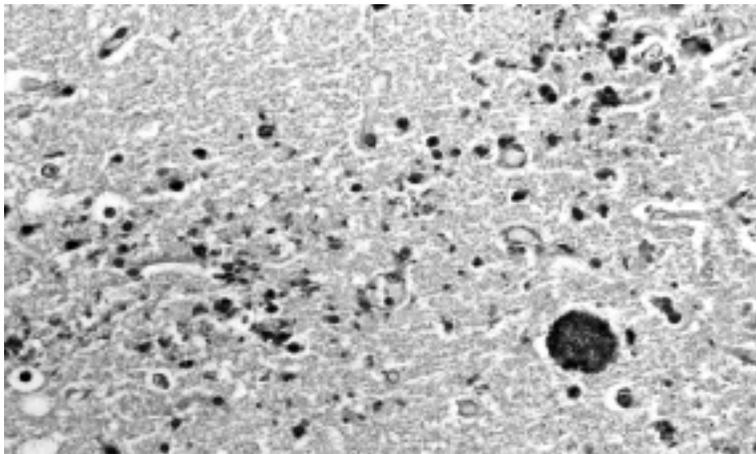


Fig. 14 Note tissue cyst and aggregates of tachyzoites in the neuropil. ABC.



Fig. 15 Note aggregates of *N. caninum* tachyzoites in the myocardium

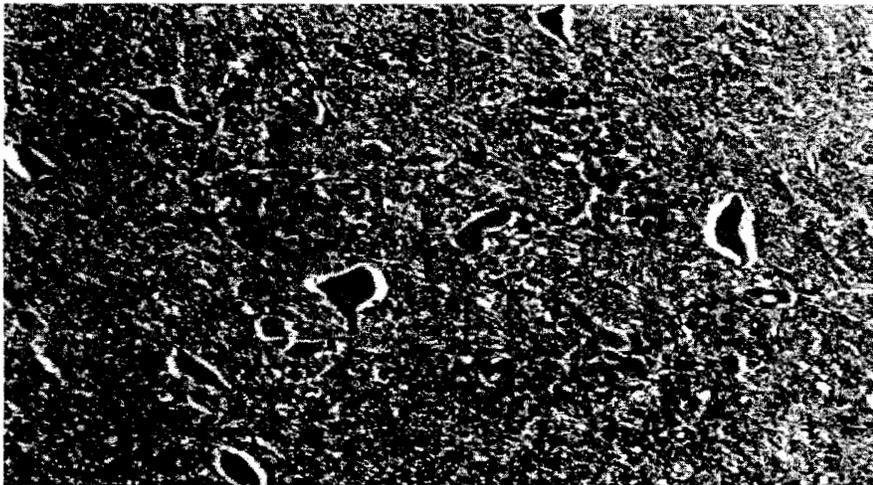


Fig. 16. Note multifocal nonsuppurative inflammation and gliosis. H&E.

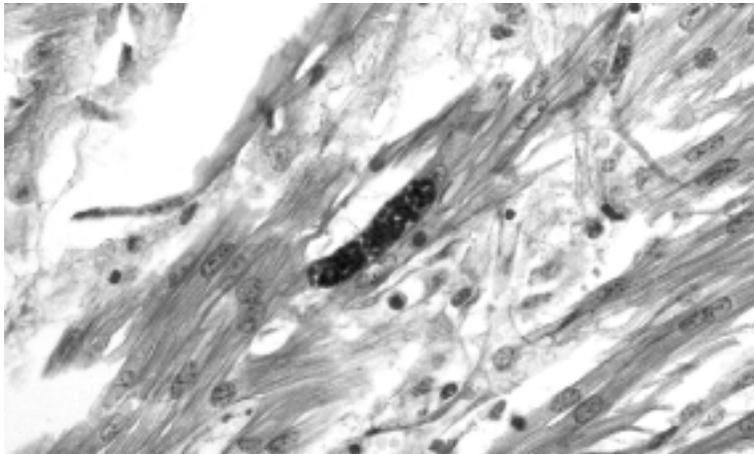


Fig. 15 Note aggregates of *N. caninum* tachyzoites in the myocardium

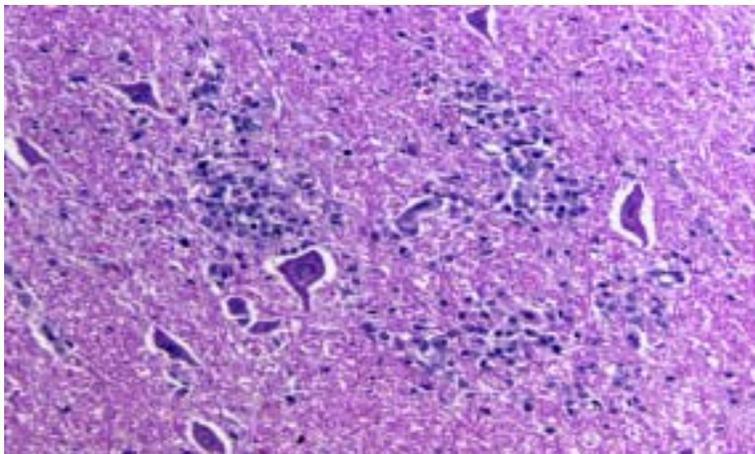


Fig. 16. Note multifocal nonsuppurative inflammation and gliosis. H&E.

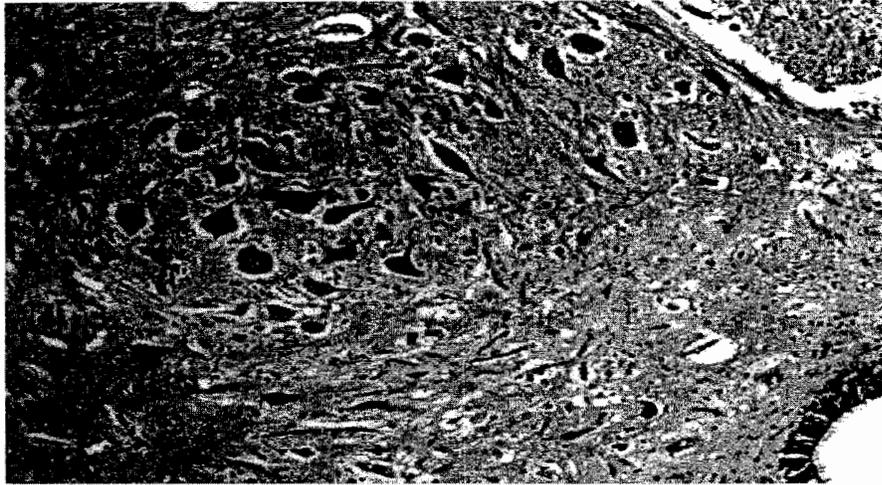


Fig. 17 Note histology of bovine fetal spinal cord. H&E.

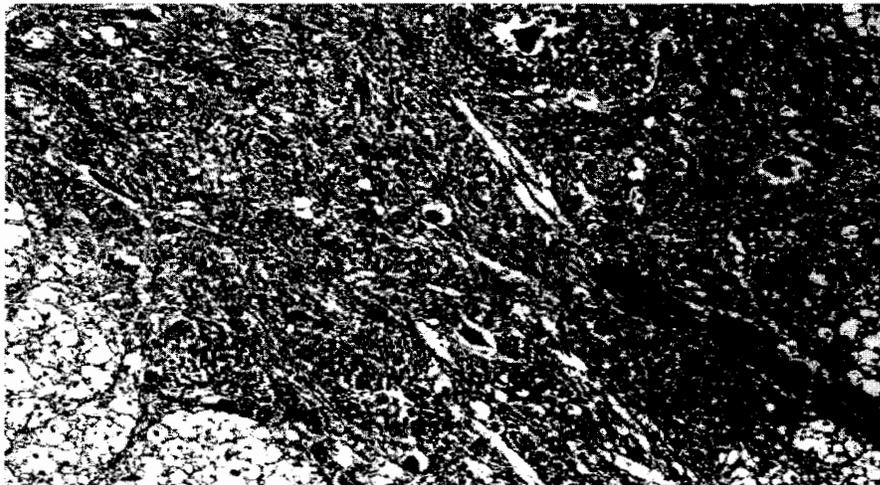


Fig. 18. Note nonsuppurative inflammation of the spinal cord of aborted fetus.
H&E.

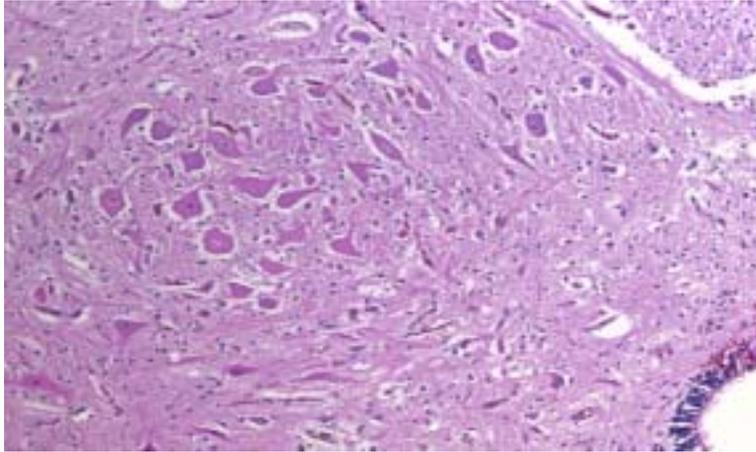


Fig. 17 Note histology of bovine fetal spinal cord. H&E.

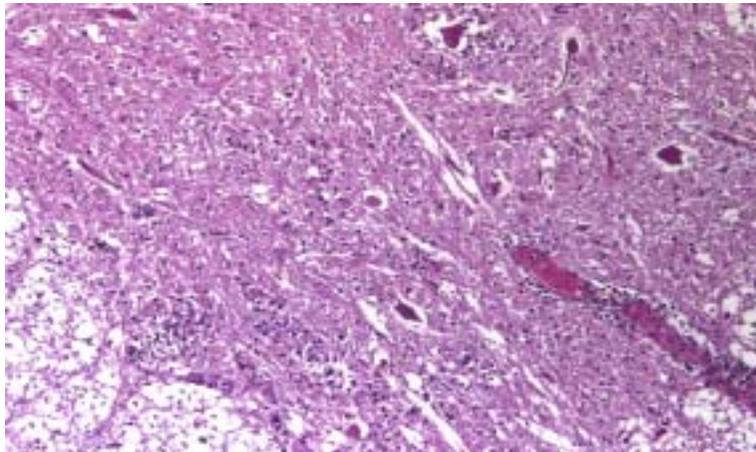


Fig. 18. Note nonsuppurative inflammation of the spinal cord of aborted fetus.
H&E.

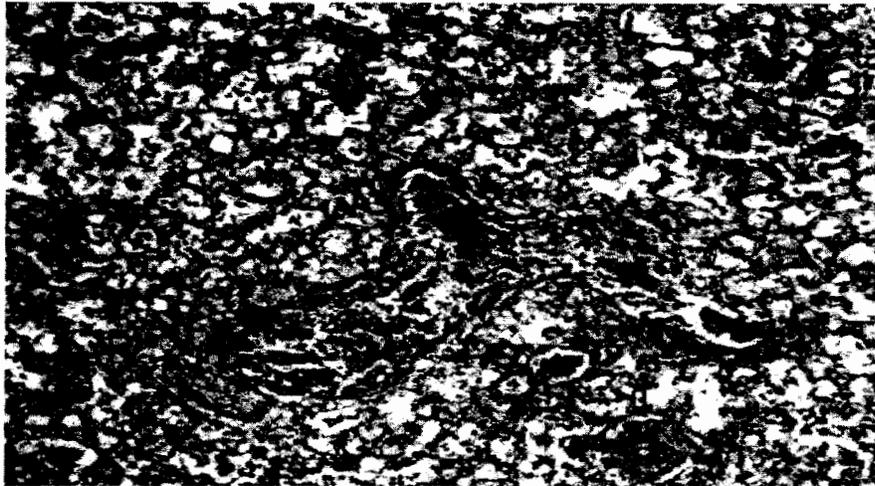


Fig. 19. Note suppurative bronchopneumonia of an aborted fetus. HE.

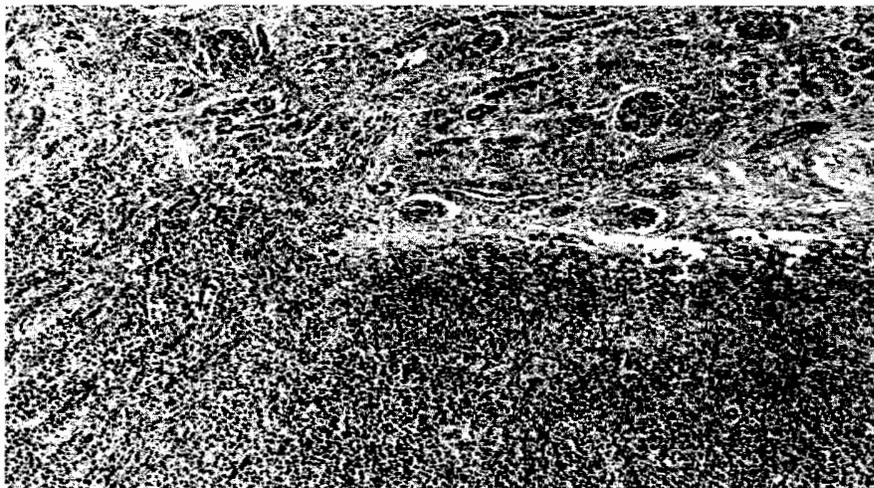


Fig. 20. Note replacement of renal medulla by infiltrated neoplastic lymphoid cells. HE.

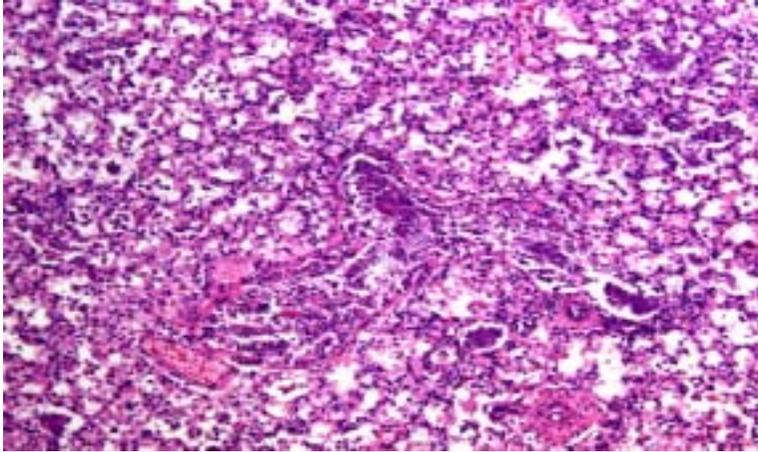


Fig. 19. Note suppurative bronchopneumonia of an aborted fetus. HE.

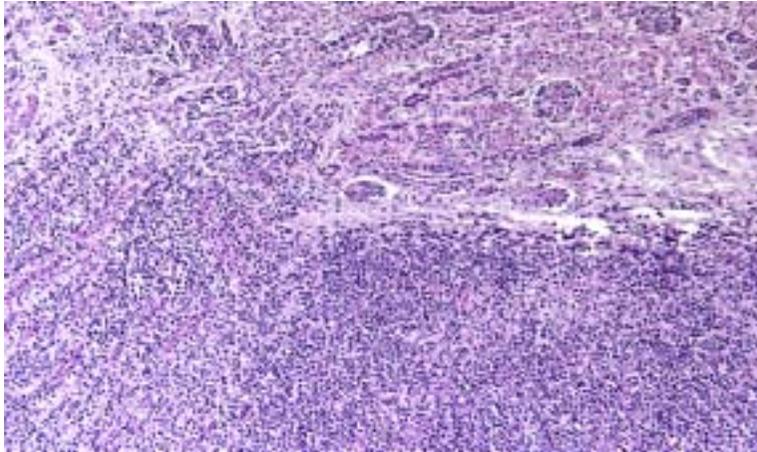


Fig. 20. Note replacement of renal medulla by infiltrated neoplastic lymphoid cells. HE.

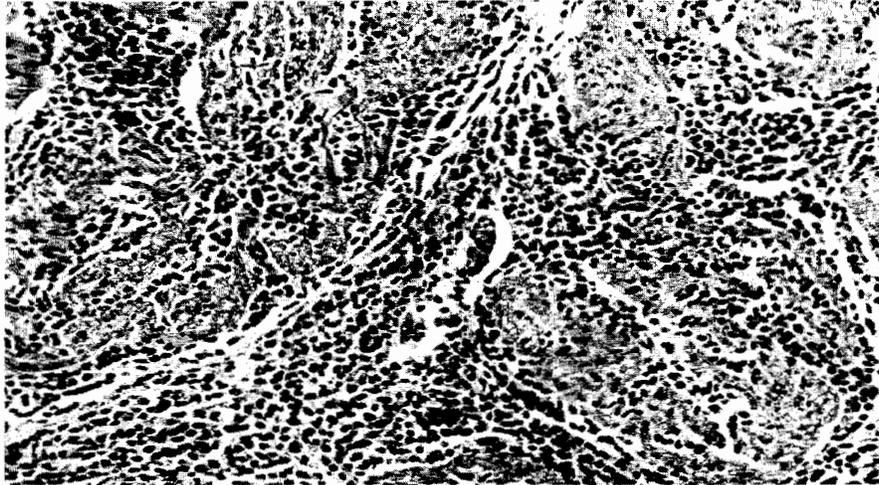


Fig. 21. Note infiltration neoplastic lymphoid cells in the myocardium. HE



Fig. 22. Note head tilt and abnormal articulation. calf

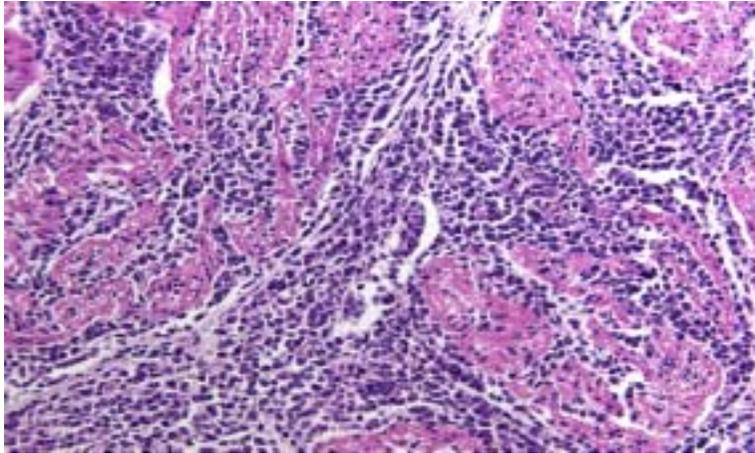


Fig. 21. Note infiltration neoplastic lymphoid cells in the myocardium. HE



Fig. 22. Note head tilt and abnormal articulation. calf

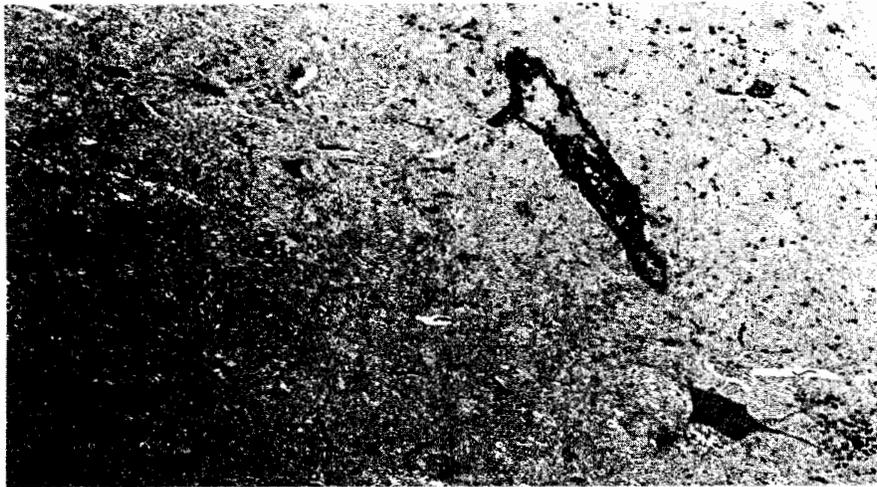


Fig. 23. Note nonsuppurative inflammation and perivascular cuffing of adult
COW.



Fig. 24. Note perivascular cuffing and gliosis of calf.



Fig. 23. Note nonsuppurative inflammation and perivascular cuffing of adult cow.

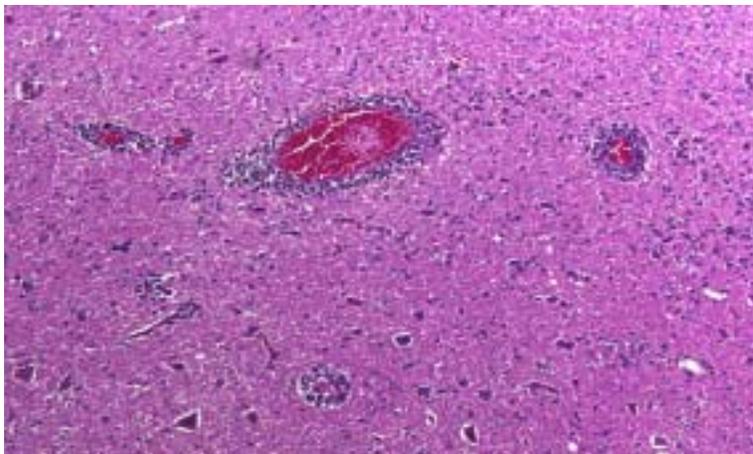


Fig. 24. Note perivascular cuffing and gliosis of calf.

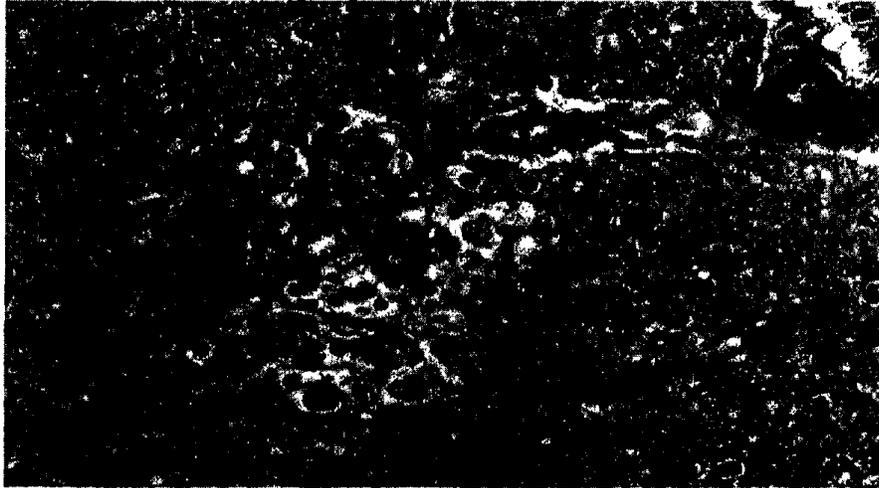


Fig. 25 Note neuronal necrosis

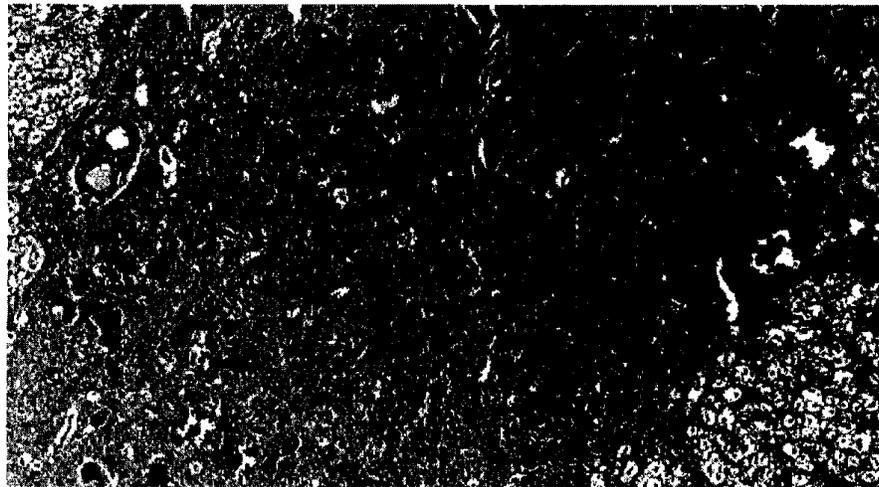


Fig. 26. Note nonsuppurative inflammation in the ventral gray horn of adult cow.

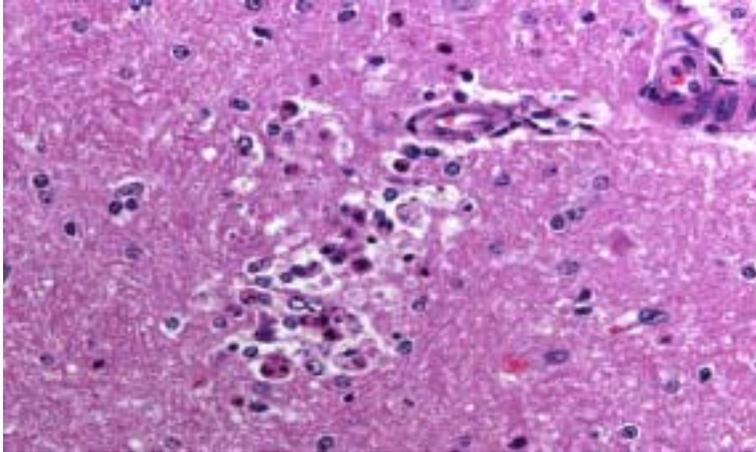


Fig. 25 Note neuronal necrosis

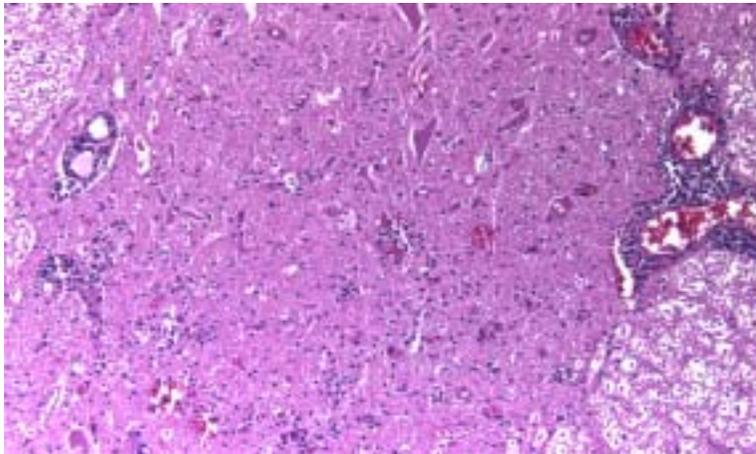


Fig. 26. Note nonsuppurative inflammation in the ventral gray horn of adult cow.

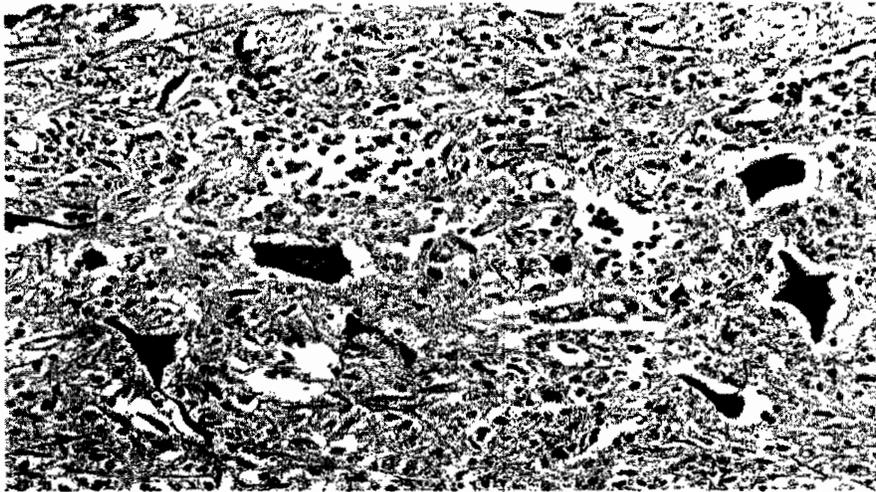


Fig. 27. Note Akabane viral antigens in the neurons. ABC.

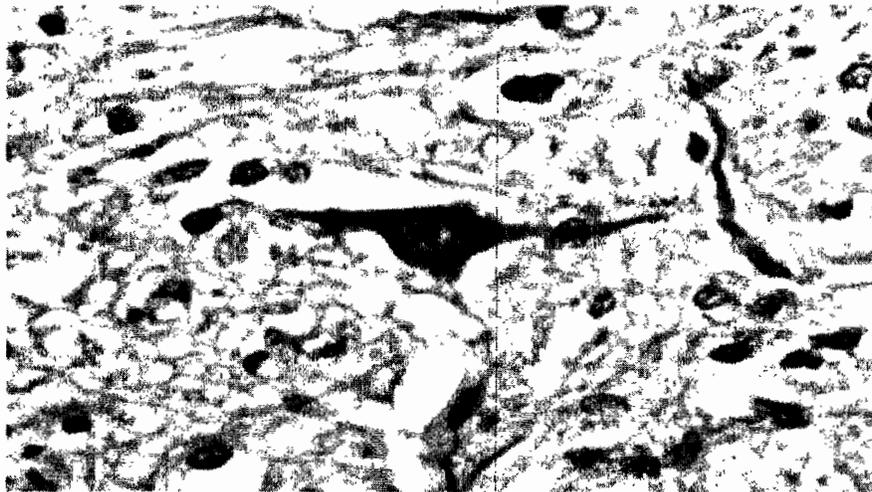


Fig. 28. High power magnification of Fig. 29. ABC.

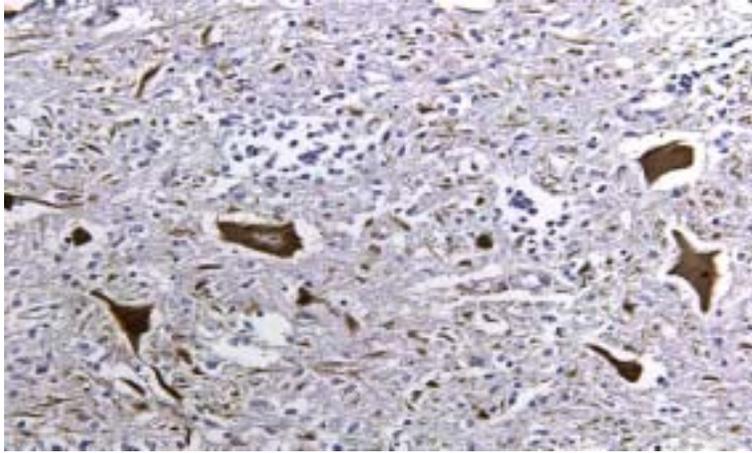


Fig. 27. Note Akabane viral antigens in the neurons. ABC.

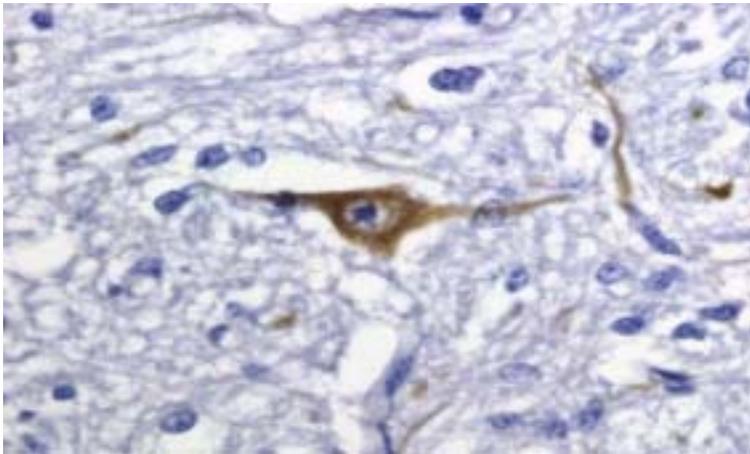


Fig. 28. High power magnification of Fig. 29. ABC.

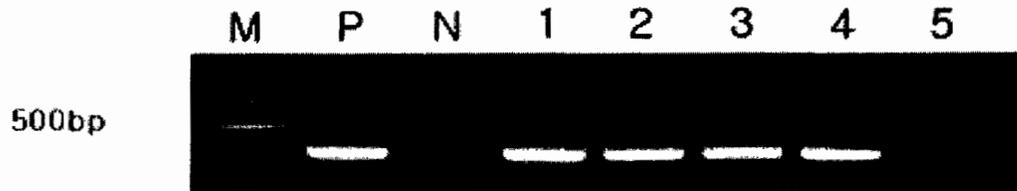


Fig 29. Detection of Akabane virus S gene by the RT-PCR method using the Akabane virus consensus primers. Lanes 1-4 show amplification of a 347-base pair (bp) Akabane virus DNA fragment. M = 100-bp scale molecular weight marker; P =positive control (OBE-1); N = negative control; Lane 1 = Case No. 1; Lane 2 = Case No. 2; Lane 3 = Case No. 3; Lane 4 = Case No. 4; Lane 5 = Case No. 5

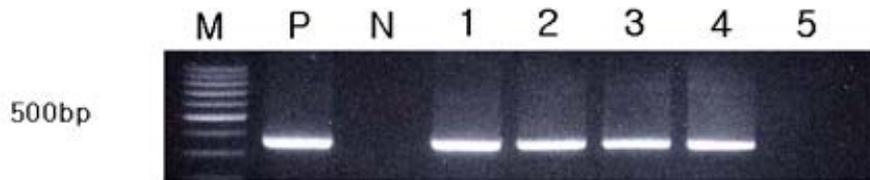


Fig 29. Detection of Akabane virus S gene by the RT-PCR method using the Akabane virus consensus primers. Lanes 1-4 show amplification of a 347-base pair (bp) Akabane virus DNA fragment. M = 100-bp scale molecular weight marker; P =positive control (OBE-1); N = negative control; Lane 1 = Case No. 1; Lane 2 = Case No. 2; Lane 3 = Case No. 3; Lane 4 = Case No. 4; Lane 5 = Case No. 5

제 3 장 소 유산의 임상학적 연구

제 1절 서설

축산 농가에서는 유사산증이 발생했을 경우 이에 관한 정확한 원인 규명하여 효율적인 예방 및 처치를 통해 피해를 줄이는 방법이 모색되어야 한다. 그러나 국내 한우 및 유우에서 발생하고 있는 유사산증의 원인들은 추정하고 있을 뿐 문헌상으로 뚜렷하게 제시한 자료가 없고, 특히 유산의 원인체 규명에 관한 연구가 미흡하며, 또한 이에 대한 근원적이고 체계적인 대책이 마련되지 않은 상태이다. 따라서 우리 축산농가의 유산에 대한 효율적인 대책을 위해서는 그 근본원인을 정확히 조사하고 적절한 치료대책을 수립하는 것이 무엇보다 시급한 실정이다.

소에서 유산이라함은 생존할 수 있는 태령에 도달하기 전에 살아있는 태아 또는 사태아가 자궁으로부터 배출되는 현상을 말한다. 넓은 의미에서 수정란의 조기 사멸에 의한 임신의 종결도 포함된다. 특히 태아 부산물이 배출되지 않고 흡수되어 외부에서 감지할 수 없는 초기의 유산은 현재까지의 기술로는 원인을 찾아내어 진단을 하기가 매우 어렵다.

유산의 원인을 규명하기 위해서는 각 임신시기에 따른 발생현황을 조사하여 이를 원인과 근접시키는 것이 필요하다. 그러나 임상에서 발생하는 유산 및 사산에 있어 물리화학적 요인, 유전적 또는 염색체적 요인, 및 호르몬적 요인에 의한 유산 등은 시기를 구분하기 어려울 수 있으나 조기발견 시 개체별 대책마련이 용이하기 때문에 이를 구별하여 진단하는 방법을 개발할 필요가 있다.

국내에서도 소 유산과 사산은 목장에서 발생하는 가장 해결하기 어려운 문제로서 발생시에 원인체의 진단은 아직 낮은 실정이며, 이에 대한 합리적 연구가 필요함이 제시되고 있다. 더욱이 유산이나 사산의 원인은 매우 다양하여 체계적인 접근 연구 방법이 중요하다. 그 동안 소 유산에 대한 연구

가 일부 있었으나 대부분 육안적으로 확연하게 원인이 규명되는 경우에 원인체에 관심이 집중되어 왔으며, 이러한 발견 또한 선진국에서 새로운 원인체의 분리한 방법이 보고된 경우 이를 국내상황에서 확인하는데 그친 경우가 많아 국내 소 유조사산 발생현황에 관해서도 임상학적 지식을 바탕으로 현장에서의 일차적인 원인 규명을 실시하고 이후 병리조직학적 및 미생물학적 검사를 의뢰하여 최종 유산의 원인의 진단 및 대책마련을 위해 본 연구를 실시하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 유산 발생의 실태 조사

전국의 대상목장을 선정하여 본 연구팀과 지역 수의사를 포함한 조사팀으로 축산현장의 유·조·사산 발생 monitoring system을 구축하여 시료의 채취 및 역학적 조사를 실시하였다. 유·조·사산이 발생시에 조사팀이 직접 방문하여 시료의 채취 및 모체의 임상학적 검사를 실시하였으며, 현장에서 유사산이 발생하면 인접한 개업수의사가 본 연구팀의 시료채취 및 검사방법에 의해 우선 시료채취와 유사산우의 임상학적 검진을 실시하였다.

목장별 및 지역별 발생 현황을 파악하여 분포 상황을 분석한다. 지역별 및 감염정도 및 원인을 분석하였으며, 산차, 나이 모체의 상태를 기록하고, 발생 양상 및 발생 시기를 명기하였다.

2. 시료의 채취

시료 채취를 위해 시료 채취용 컵, formalin 10% 액, 멸균 수술용 mass, 멸균 tissue, 10ml - 50ml 주사기 및 18G 주사침, saline 액 등을 준비하였으며, 시료의 운반을 위해 ice box와 얼음 그리고 필요시에는 dry ice를 준비해 가능하면 유산태아 및 부산물 전체의 임상학적 육안검사를 마친 후 병리조직학적 및 미생물학적 검사에 의뢰하였으며, 전체 시료를 운반하기 어려운 경

우에는 각 장기별로 조직을 채취하여 formalin 또는 냉장상태를 유지하여 의뢰하였다.

3. 유산우의 검진

유산산우의 검진을 실시하여 생식기 및 전신 적인 영향을 평가하였다. 모체 생식기의 검진은 본 연구팀의 소 생식기 평가 기준에 의하여 난소, 난관, 자궁각, 자궁경, 질 및 외부 생식기에의 영향을 평가하였다.

모체가 전신적 질환 및 감염에 의한 영향이 발견 시에는 이에 대한 대증적 처치법을 모색하였으며, 시료의 채취 후에 필요시에는 자궁 세척을 실시하였다.

4. 모체의 직장검사 및 초음파 검사

직장검사는 Arthur 등(1983) 방법에 준하여 실시하였다. 검사자는 왼손에 직장검사용 장갑을 착용하고 직장내에 삽입한 후 자궁경, 자궁체와 자궁각의 순으로 전진하며 조심스럽게 자궁의 상태를 확인하였다. 자궁의 상태를 확인한 후에는 양 자궁각 말단에 위치한 난소를 찾아 난소조직의 조직밀도에 의하여 난소실질, 황체 및 난포 등의 상태를 촉진하였다. 난소의 질병상태 따라 난소위축 및 기능부전, 저기능성 난포, 난포성 낭종, 황체성 낭종 및 기타 구조물의 존재 등으로 구분하였으며, 초음파 검사는 본 연구팀의 전 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 지역별 유산 조사 상황

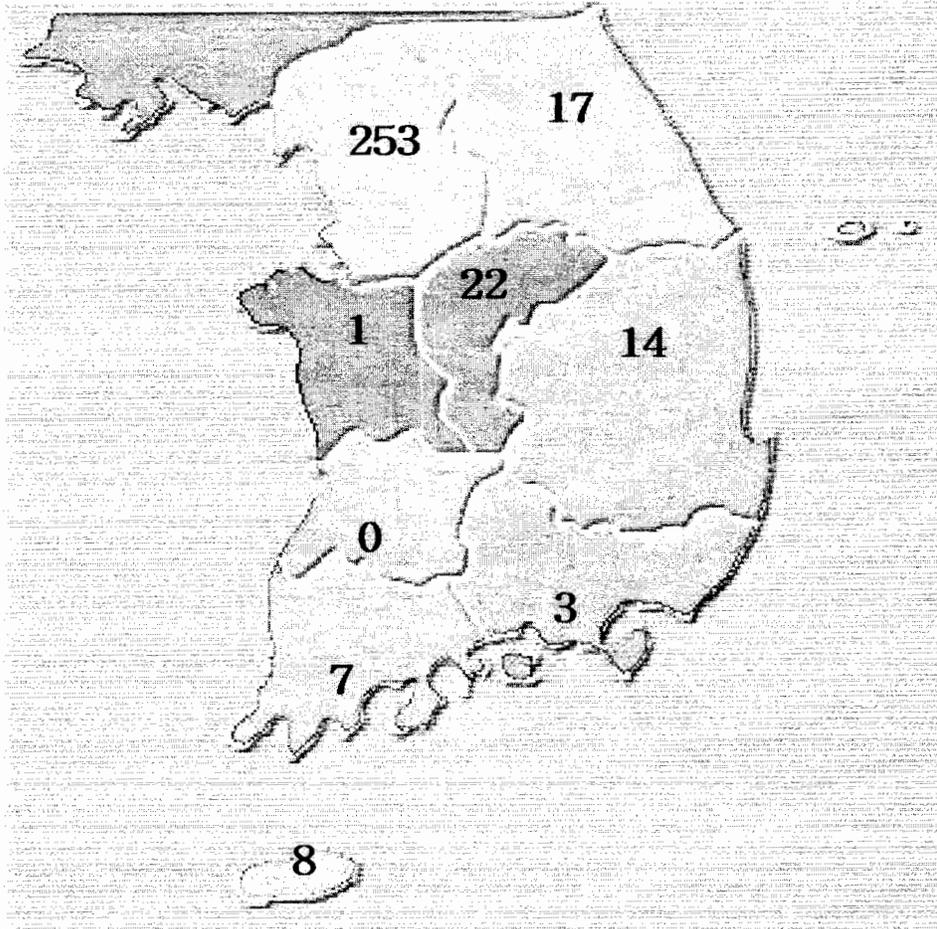


Fig.1 Distributions of bovine abortus specimen by different provincial in Korea.

총 338 예 유산의 지역적 조사두수는 경기도 253, 강원도 17, 충청남도 14, 충청북도 22, 전라남도 7, 경상북도 14, 경상남도 3 및 제주도 8 두었다. 시료의 운반 및 소 (특히 젖소) 사육 분포로 볼 때 경기도 지방에서 주로 연구가 집중된 경향으로 조사두수가 도 별로 균등하지는 못한 점을 감안할 때 지역별 발생두수를 비교하는 것은 큰 의미를 부여하기는 어렵다. 이를 보완하

제 3절 결과 및 고찰

1. 지역별 유산 조사 상황

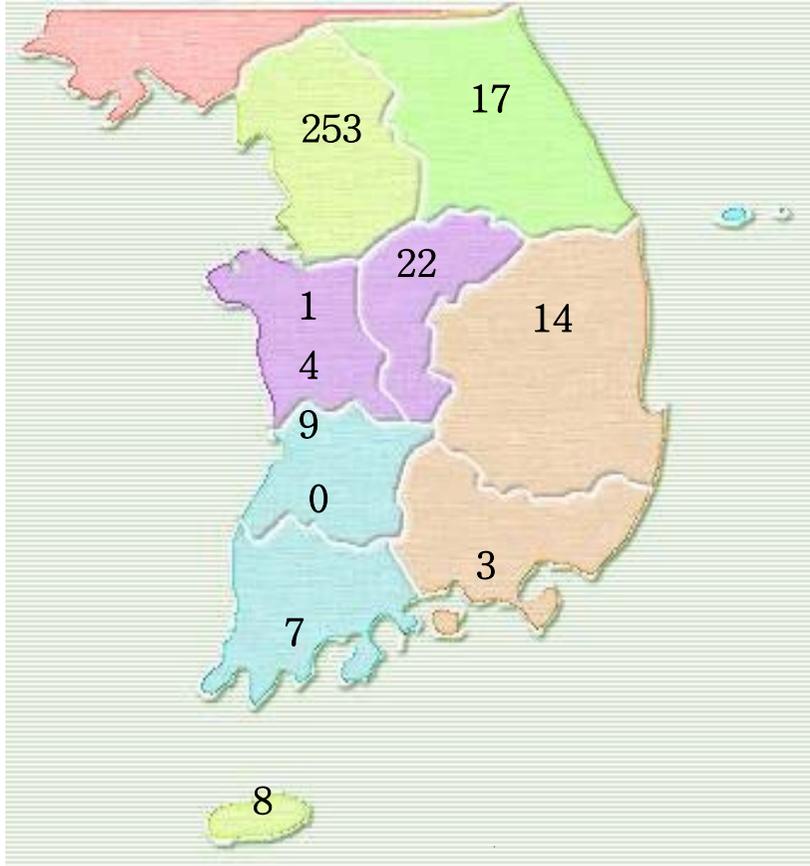


Fig.1 Distributions of bovine abortus specimen by different provincial in Korea.

총 338예 유산의 지역적 조사두수는 경기도 253, 강원도 17, 충청남도 14, 충청북도 22, 전라남도 7, 경상북도 14, 경상남도 3 및 제주도 8 두였다. 시료의 운반 및 소(특히 젖소) 사육 분포로 볼 때 경기도 지방에서 주로 연구가 집중된 경향으로 조사두수가 도별로 균등하지는 못한 점을 감안할 때 지역별 발생두수를 비교하는 것은 큰 의미를 부여하기는 어렵다. 이를 보완하

기 위해서 본 연구과제에서는 유산태아의 검사 두수가 적은 지역 (강원도, 충북, 충남, 전라남/북도, 경상북도/제주도)에 대해 목장을 연구원들이 직접 방문하여 목장에 대한 임상학적 조사를 실시한 후 유산 발생이 있었거나 발생이 의심되는 목장을 대상으로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 유산과 관련 있는 원인체에 대한 혈청학적 평가를 병행하였다.

2. 계절별 유산 발생 상황

Season	Incidence	Percentage
Spring	63	19
Summer	108	32
Fall	89	26
Winter	78	23
Total	338	100

본 연구는 1999년 6월부터 시작되었으며, 본 연구결과는 2002년 4 월말을 기준으로 작성하였다. 월별 및 계절별 발생분포를 조사한 결과 현재까지는 여름 (6월 - 8월) 에는 108 건 가을 (9 -11월) 에는 89 건으로 겨울 (12-2월) 78건, 봄 (3-5월) 63 건으로 조사되었다. 연구 최종 종료일 까지 봄/여름의 결과를 합산한다면 봄/여름에 유산의 발생이 많은 것을 알 수 있다. 이는 국내의 사육환경상 여름철의 고온 다습한 기후, 외부의 스트레스 (여름철의 천둥번개), 및 축산업과 겸업(농업)을 하고 있는 목장의 경우 여름철의 우군 관리의 집중도가 다른 계절에 비교해 부족한 요인도 작용했을 것으로 판명되며, Akabane가 2000년 가을에서 2001년 겨울에 집중적으로 발생한 것이 가을철과 겨울철의 높은 발생과 연관이 있는 것으로 판명된다.

3. 산차별 유산 발생 현황

Table Distribution of bovine abortions following parity between June, 1999 and April, 2002 in Korea

Parity	Number of abortions	Percentage
1	81	31
2	63	24
3	61	25
4	37	14
5	11	4
6	5	2
Total	258	100

산차가 확인된 258 두에서 유산의 발생현황은 산차가 낮을수록 높았으나 산차별 동일기간에 본 연구팀에 의해 조사된 유산의 두수는 1산에서 31% 2산 24%, 3산 25%, 4산 14% 5산 4% 및 6산 2%로 나타나 4산 이하에서 집중되었으며, 이는 산차별 사육분포와 관련되어 총 사육두수 중 산차가 낮은 소의 절대수가 우군에서 많기 때문인 것으로 사료된다.

4. 임신 일령별 유산 발생현황

Day of gestation	No. of incidence(%)
0-150	70(21)
151-250	128(41)
251 - term	121(38)

임신일령이 확인된 311 임신 일령을 150일 이전 150-250일 및 251일 이후로 구분하였을 때 임신 일령이 확인된 총 248두중 각각 70두(21%), 128두(51%) 및 51두(21%)로 151일에서 250일 사이에 유산되는 율이 높았으며, 이는 *N. caninum*에 의한 유산이 주로 임신 5-6개월령에 집중된다는 보고와 일치하는 경향을 보였으며, 임신말기 251 이후의 유산비율도 38%로 나타났으며, 이는 2000년 겨울에서 2001년 말기에 집중적으로 발생된 Akabane에 의한 유조사산에 기인된 것으로 사료된다.

5. 유사산 모체의 생식기 및 전신검사 항목

가. 난소 촉진소견

- ① 임신 3개월 이전의 유산의 경우 난소 촉진이 가능하였으며, 난소의 특징적 소견은 활성 난포가 존재하지 않고 임신황체가 소실중이거나 소실된 상태이었다.
- ② 임신 3개월 이후에 유산된 경우에는 자궁의 하강 및 자궁의 크기 증대로 인해 난소 촉진이 거의 불가능하였으며, 난소에 황체의 소실 이외에 특징적 소견은 발견되지 않음. 난소의 소견으로는 황체의 기능부전과 2차적인 원인에 의한 황체의 용해에 의한 태아의 배출을 구분할 수 없었다.
- ③ 촉진 및 초음파상으로 측정된 난소의 크기: 2-4cm X 3-5cm 범위였다.
- ④ 유산발생 시 임신되었던 자궁각에 임신 황체가 존재하였으며, 5% 미만에서 반대측 자궁각에 임신황체가 존재하였다.
- ⑤ 난소의 초음파상 및 촉진상으로 나타난 결과는 유산 발생 원인에 의한 2차적인 변화로 사료되며, 1차적 유산의 원인으로 감별은 임상적으로 어려웠다.

나. 자궁의 촉진소견

- ① 유산발생 시 자궁의 일부를 촉진할 수 있었으며, 자궁에는 다량의 fluid와 태막 잔존물이 부유되어 있었음.

② 유산발생 시 자궁에서 대부분 궁부를 촉진할 수 있었으며, 임상적 검사에서 궁부의 불규칙한 배열 및 파소한 궁부는 발견할 수 없었으며, 대부분 예에서 태반정체로 인해 궁부는 퇴축되지 않은 상태이었음.

③ 유산의 증세(지속적 노책, 식욕부진 및 arched back, 외음부의 부종)를 주인이 감지후 2일내에 태아가 배출시에는 자궁의 특별한 취약성을 발견할 수 없었으나 임신단계가 진행될 수록, 자궁에 사태아가 오래 잔존될수록, 부패정도에 따라 자궁의 취약성은 증가하였다.

④ 전체 예 중 2예에 있어 태아가 심하게 부패되어 분리된 태아를 자궁내에서 견인추출 하였으며, 아카바네등으로 인한 기형 및 기타 원인에 의한 기형예를 제외하고는 유산태아의 견인추출에는 문제가 없었음

⑤ 자궁염전 및 자궁탈은 발견되지 않았음

⑥ 수종성 임신으로 인한 유산으로 1예가 진단되었음

다. 자궁경

① 자궁경은 대부분 태아 배출로 인해 정상적 임신단계에 비해 비대 확장되었으며, 유산발생 후 연구팀이 목장에 도착하여 검사 시(12-24시간이내)에 자궁각은 퇴축단계에 있었음

② 유산으로 인한 자궁경의 손상은 아카바네 및 기타 기형태아를 제외하고는 발견할 수 없었음

③ 경산우의 경우 이전 분만 시 손상으로 인한 자궁경의 일부 기형을 발견할 수 있었으며, 자궁경의 기형으로 인해 유산태아가 배출되지 못하는 경우는 발견되지 않았음.

라. 질 삼출물 및 기타

① 유산발생 태막이 유산태아와 함께 배출시에는 질 삼출물이 거의 없었으나 태막이 배출되지 않고 노출되어 있는 경우에는 질 삼출물이 발견되었음. 질 삼출물의 채취하여 세균학적 검사를 의뢰하였음.

② 유산과 동반된 질탈, 방광탈, 자궁탈은 발견할 수 없었음.

③ 유산의 원인으로 작용한 질염은 없었음

④ 임신 후반기 유산에서 기질과 뇨질이 발견되었으나 유산의 직접적인 원인으로 진단되지는 않았음

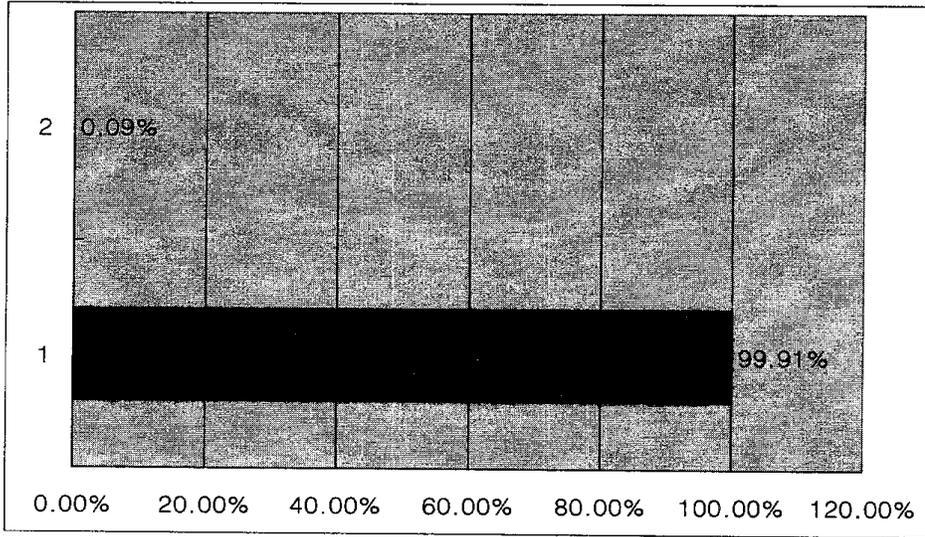
- ⑤ 유산 후 중자궁동맥의 fremitus를 감지 할 수 있었으며, 유산 개시 시점에 따라 퇴축 단계에 있었음.
- ⑥ 질 주위에 이상구조물의 존재로 인한 유산태아의 배출 장애 및 유산의 원인은 발견되지 않았음
- ⑦ 복강내의 장간막 임파절의 비대 등 복강 내 이상구조물이 유산의 원인으로 작용한 예는 없었음
- ⑧ 복강의 청진 및 타진 소견으로 유산의 원인으로 작용할 수 있는 심장의 장애 및 소화기 장애는 발견되지 않았으나 일부 예에서 유산발생 후 제 1위 운동의 저하 및 일시적 심박 변화가 발견되었음
- ⑨ 유산발생 후 자궁의 감염이 있는 경우를 제외하고는 체온은 정상범위였음.
- ⑩ 발굽질환이 직접적으로 유산의 원인으로 진단된 예는 없었음.
- ⑪ 착유우의 경우 유즙을 채취하여 세균학적 검사를 의뢰하였으나 유산의 원인으로 진단되는 감염체는 발견되지 않았음

6. 혈청검사결과

가. 세균성 질병

1) Brucellosis

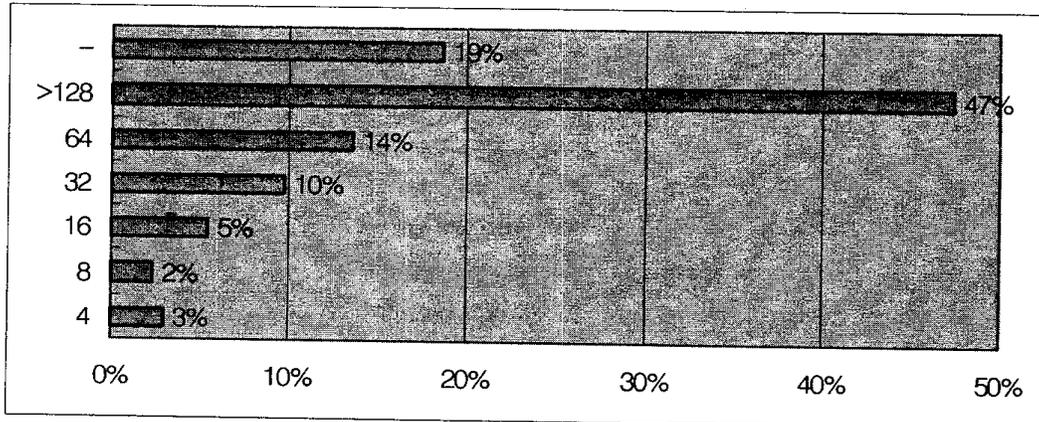
전국에서 채취한 유조사산우 2,246두의 혈청체서 브루셀라 항체를 검사한 결과 99.91%가 음성으로 판명되었으며, 양성우는 방역당국에 통보하여 적절한 조치를 취하도록 하였다. 전체의 99.9%가 음성으로 판명된 이유는 정부의 지속적인 검사 및 양성우 살처분 정책의 결과로 사료된다.



나. 바이러스성 질병

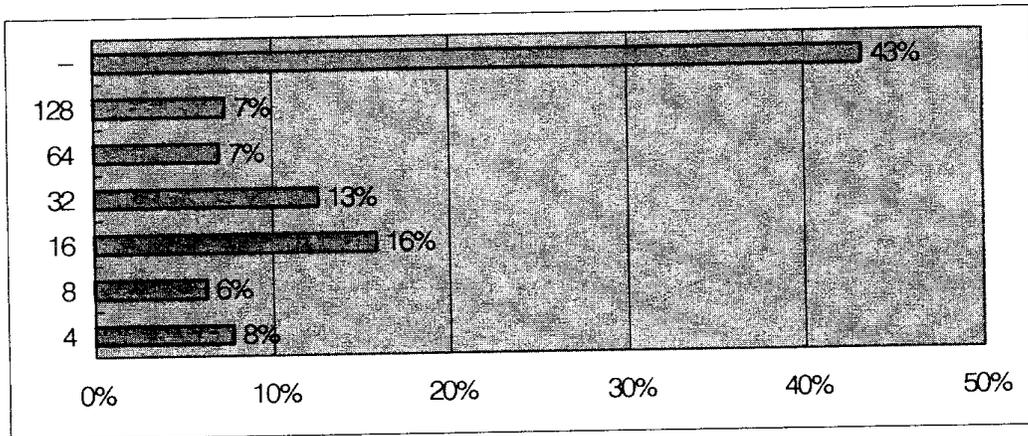
1) BVD

전국에서 조사한 유조사산우 1394두 BVDV의 혈청학적 항체가 검사에서 50% 이상의 조사우에서 혈청학적 항체가가 낮게 나타남을 알 수 있다.



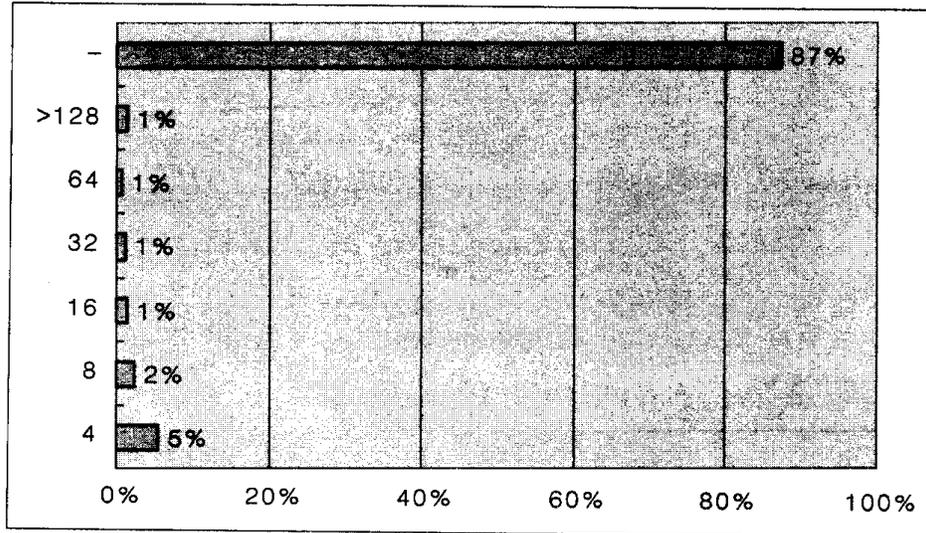
2) Akabane virus

전국의 유조사산우 1392두에 대한 Akabane 항체가 조사에서 음성이 43%로 조사되어 Akabane virus에 대한 면역이 없는 상태로 감염시에 유조사산우로 이어질 가능성이 높음을 연구 초기에서 제시한 바 있었으며, 이러한 원인이 2000년 겨울에서 2001년에 걸친 집단적 발생을 야기한 것으로 추정된다.



3) IBR

IBR에 대한 항체가 검사는 전국에서 채취한 1413두의 혈청에서 실시하였으며, 87%에서 혈청학적 음성을 보여, 향후 IBR virus 및 유사 virus가 감염되었을 때 문제가 발생할 수 있는 위험도가 매우 높을 것으로 추정된다.



라. 유산 발생한 농장에서의 vaccination

유산이 의뢰된 목장에서의 vaccination 여부를 조사하였다. 백신의 종류에 관계없이 전혀 하지 않는 목장이 전체의 75%를 차지하였고, Akabane 10%, FMD 7%, IBR 및 BVD 혼합백신 7%을 실시하는 것으로 조사되었다. 이러한 저조한 백신접종율은 향후 해당 원인체에 노출되었을 때 쉽게 감염될 수 있는 위험성이 있는 것으로 판명된다.

마. 동거가축과의 유산의 발생관계

유산태아를 검사할 수 있었던 180 목장의 동거가축(개, 고양이, 닭)이 사육되고 있는 경우는 36개 목장(20%)으로 조사되었고 대부분은 접촉(사료 및 음수) 할 수 있는 기회가 높은 것으로 조사되었으며, 1개 목장에서는 야생동물의 출현도 빈번한 것으로 조사되었다. 본 연구팀의 1 및 2 차년도 연구 결과에 따라 지속적인 목장주 교육을 통해 동거가축과의 접촉을 피할 수 있게 하였음에도 불구하고 국내 목장에서는 동거가축이 높은 비율로 있었다.

또한 유조사산이 *N. caninum*으로 진단된 22개 목장 중 6개 목장(27%)에서 개를 키우거나 방견들과의 접촉이 많은 것으로 조사되었다. 특히 개의와의

네오스포라 발생이 관련이 있다는 점에서 앞으로 좀 더 많은 목장 사육환경에 대하여 주목할 것으로 사료된다.

제 4 장 소 유산의 병리학적 조사 및 기생충성 곰팡이성 유산에 대한 분석

제 1 절 서설

Neospora caninum (*N. caninum*)은 분류학상 Apicomplexa 문, Coccidia 아강, Sarcocystidae 과에 속하는 원충으로서, 소와 개 등에서 유산과 신경 증상 등을 일으키는 것으로 알려져 있고, 이 외에도 염소, 양, 말, 사슴 등에서 자연 발생된 바 있으며, 고양이, 마우스, 돼지, 여우, 원숭이 등에서 실험 감염된 바 있다. 이 중 소의 neosporosis는 전세계적인 발생 분포를 나타내고 있으며, 국내에서는 김 등이 소 유산태아에서 *Neospora* 감염을 최초로 보고 하였으며, 김 등은 본 원충감염으로 인한 동일한 소의 반복 유산을 증명하기도 하였다. 또한 허 등은 국내 10개 시·도의 젖소에 대해 *N. caninum* 항체 보유 여부를 검사한 결과 약 21%의 양성율을 확인하였다. 그러한 결과를 근거로 한국의 경우에도 네오스포라에 의한 감염이 전국적으로 만연되어 있을 가능성이 높다. 네오스포라에 의한 유산은 처음 미국에서 그 발생이 확인된 이래 현재는 거의 전세계적인 발생분포를 보이고 있다. 특히 미국 캘리포니아 주의 경우에는 경제적으로 축산업에 큰 경제적 손실을 주고 있다.

*N. caninum*은 Bjerkås 등에 의해 부전마비를 보이다가 폐사한 개로부터 처음으로 발견되었으며, Dubey 등에 의해 *N. caninum*으로 명명되었고, 같은 해 Dubey 등은 후구마비를 보인 개에서 처음으로 분리되었다. 지금까지 미국과 영국에서 개로부터 원충을 분리해 내었으며, 미국, 스웨덴, 일본, 영국, 한국과 이태리 등에서 소로부터 원충을 분리해 내었다. 한편 Marsh 등은 말에서 원충을 분리, *N. caninum*와의 분자 생물학적 차이를 들어 *N. hughesi*라는 새로운 species로 보고한 바 있으나 현재까지는 *N. hughesi*가 진정한 의미에서의 *N. caninum*인지 논란이 많다.

감염된 소의 경우 임신 3개월부터 분만전까지 다양한 임신 일령에서 유산을 일으키나 임신 중기에서 가장 많이 발생하는 것으로 알려져 있다. 태아는 자궁속에서 죽거나 흡수되고, 미이라화나 사산되기도 하며 살아서 태어나

서 임상적으로 정상이라 할지라도 만성적인 감염을 보이기도 한다. 유산은 계절적으로 볼 때 연중 발생하며, 유산의 형태는 산발적인 양상을 보이기도 하고 때로는 집단적인 양상을 보이기도 한다. 현재까지는 육우보다는 젖소에서 감염이나 유산율이 높은 것으로 확인되었으며 이는 사육환경이나 조건과 밀접한 연관이 있을 것으로 추정되고 있다.

부검 시 일반적으로 특별한 육안소견은 관찰되지 않으나 병리조직 검사에서는 뇌, 심근 및 심외막과, 골격근, 그리고 때로는 간장 등에서 피사를 동반한 비화농성 염증소견이 관찰된다. 젖소의 경우는 *N. caninum*에 감염 시 유산은 아니지만 젖소의 경우에는 유우생산의 감소와 증체율의 감소에도 영향을 주는 것으로 확인되었다.

*N. caninum*의 감염 경로로서는 수직 감염에 관한 연구가 많이 보고되어 왔다. 소, 마우스, 원숭이등에서 모체로부터 태자로의 태반 감염이 보고된 바 있으며, 실험적으로 유즙에 의해 수직 감염될 수 있음이 보고된 바 있고, 송아지에서 tachyzoite를 첨가한 우유를 경구 투여한 송아지에서 *N. caninum*에 감염된 바 있다. 한편, Sawada 등은 *Neospora* 감염에 의해 유산한 경험이 있거나 혈청 검사 결과 *Neospora* 양성을 보인 적이 있는 젖소 목장의 개 48두와 도시 개 198두의 혈청 검사를 실시한 결과, 각각 31.3%와 7.1%의 항체 양성율을 확인함으로써 개와 소 사이에 수평감염 가능성을 제시한 바 있다. 최근, 개의 분변에서 oocyst를 확인함과 동시에 PCR법으로 개에서 원충을 증명함으로써 개가 *N. caninum*의 종숙주임이 밝혀졌다. 따라서 *N. caninum*에 감수성이 있는 숙주는 개의 분변에 오염된 음수나 사료의 섭취를 통해 수평 감염될 수 있다는 근거가 마련되었다.

현재까지 본 질병에 대한 효과적인 치료약이나 백신은 없다. 다만 개가 종숙주임이 밝혀짐에 따라서 목장에 사육중인 개나 기타 야생개과 동물의 분변의 오염을 최소화하는 것이 예방대책이다. 본 연구에서는 최근에 전세계적으로 *N. caninum*이 젖소 유산에 중요한 원인체로 작용하고 있음이 확인됨에 따라서, 국내에서 본 원충에 의한 유산정도를 조사하는 것이 그 첫번째 연구의 목표이다. 두 번째로는 분자생물학적 기법을 이용한 본 증의 진단법과 혈청검사법을 확립하는 것이다. 확립된 혈청진단법을 이용하여 젖소와 한우에서의 감염율을 조사하는 한편 감염원으로 작용할 수 있는 개, 한국너구리

및 마우스와 같은 이종동물에 대한 혈청검사를 실시하는 것이 그 세 번째 목적이다. 마지막으로 본 원충이 감염증을 차단할 수 있는 항원충성 약제의 탐색 및 불활화 백신의 개발 등이다.

제 2절 네오스포라 국내분리주의 성상분석

1. 재료 및 방법

가. 공시원충 및 tachyzoite 준비

*N. caninum*의 국내 분리주로서는 KBA-1과 KBA-2를 사용하였으며, 외국 분리주로서는 미국의 NC-1과 일본의 소에서 분리된 JPA-2, JPA-4를 사용하였다.

원충은 원숭이 신장 단층 세포 (Vero cell : CRL6318, ATCC, MD)에서 5일에서 7일 간격으로 계대 유지되었으며, 배지로는 Minimum Essential Medium (MEM:GIBCO BRL USA)에 10% 말 혈청 (GIBCO BRL), 4 mM L-glutamine MEM vitamin solution (GIBCO BRL), MEM essential amino acid solution (GIBCO BRL), MEM non-essential amino acid solution (GIBCO BRL), antibiotic-antimycotic (100unit/ml penicillin G, 100 μ l/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml amphotericin B: GIBCO BRL), 7.5% sodium bicarbonate를 첨가하여 사용하였다. 배양 조건은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂를 유지하였다.

마우스에 접종할 tachyzoite는 *N. caninum*이 약 75% 정도 감염되어 있는 vero cell을 cell scraper로 긁어 수확한 후 주사바늘 (22G, 26G)로 세포를 2,3회 붕괴시키고 5 μ m filter로 세포붕괴물을 제거한 후 차가운 0.01 M PBS에 2,000 rpm에서 5분간 원심, 세척하였다. 혈구 계산판을 이용하여 tachyzoite의 수를 측정하였으며, 감염력을 유지하기 위하여 접종은 1-2시간 내에 수행되었다.

나. 실험동물

대상 마우스는 생명공학 연구소에서 분양 받은 4~5주령의 20~25g되는 SCID (Severe Combined Immunodeficient disease) 마우스를 1주일 간 실험실에서 순화시킨 후 사용하였으며, 암수 격리시켜 대조군과 함께 동거 사육

시켰다. Positive rack (삼광, 한국)에서 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 $55\pm 10\%$ 로 유지시키고, 멸균 사료와 121°C 에서 20분간 고온 멸균 처리된 수돗물을 자유 급식 하도록 하였다. 모든 반입되는 cage, 깔짚 등도 역시 동일한 조건으로 고온 멸균 처리하였다.

다. 실험동물 접종

국내 분리주와 외국 분리주의 SCID 마우스에 대한 병원성을 비교 확인하고자 2×10^5 개/ml 의 KBA-1, KBA-2, NC-1 의 감염력있는 tachyzoite를 혈구계산판으로 세어 각각 8마리의 마우스에 복강 접종하였으며, 동량의 JPA-2와 JPA-4의 tachyzoite를 역시 마우스에 복강 접종하였다. 또한 2마리의 마우스는 HBSS (Hanks balanced salt solution, GIBCO BRL)만 복강 투여하여 대조군으로 삼았다. 접종 후 매일 임상 증상을 관찰하였으며, 폐사 일을 확인하였다.

라. 병리학적 검사

신선 조직을 얻기 위하여 혼수 상태의 폐사 직전 마우스를 안락사 시켜 장기를 채취하거나 폐사 후 최소의 시간이 경과된 후 장기를 채취하는 것을 원칙으로 하였다. 일반적인 부검 술식을 따라 부검하여 육안 병변을 관찰한 후, 뇌, 척수, 폐장, 심장, 횡격막, 간장, 비장, 췌장, 위, 장, 신장, 부신, 근육, 침샘, 눈, 피부, 난소, 자궁, 고환, 부고환, 전립샘 등의 전 장기를 채취하여 4% 중성 포르말린에 24시간 고정하였다. 일반적 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 $4\mu\text{m}$ 로 박절하여 hematoxylin 과 eosin(H&E) 으로 염색하였다.

마. 면역조직화학염색

위 장기들을 $4\mu\text{m}$ 로 박절한 후 탈파라핀시키고 3% H_2O_2 가 함유된 methanol에서 5분, 0.1% pronase로 37°C 에서 10분간 처리한 후 0.1% gelatin 에 희석한 5% 정상 토끼 혈청으로 37°C 습상에서 20분간 반응시켰다. 일차항체는 1: 3,000으로 희석한 *N. caninum* hyperimmune serum (VMRD, USA) 을 37°C 에서 30분간 처리한 다음 차가운 10% Triton-X 함유 Tris buffer (TTBS-HS/Tx)로 수세하였다. 이차항체는 biotinylated anti-goat IgG (Vector Lab., USA)를 1:200으로 희석하여 37°C 습상에서 20분간 반응시킨 뒤 avidin-biotin complex용액에 20분간 적용시키고, DAB(3,3'-

diaminobenzidine tetrachloride)(Vector Lab. Inc.)로 발색시켰다. 대조염색으로 Harrison's hematoxylin염색하여 광학현미경으로 검정하였다.

바. 원충 재분리

무균적으로 채취한 뇌를 멸균된 막자 사발에 갈아 유제액으로 만든 후 100% monolayer를 이루고 있는 vero cell에 감염시키고 2~5 시간 후에 새 배지로 교체하여 주었다. 감염시킨 vero cell은 계대하지 않고 3일 간격으로 배지를 교체해 주었으며, 매일 원충의 출현 유무를 확인하였다.

사. 다클론 항체 (Polyclonal antibody)의 생산

다클론 항체 생산을 위하여 2 kg이상의 Newzyland white rabbit 암컷 10마리 (연암축산)를 간접형광항체법(Indirect immunofluorescent antibody test : IFA) 검사를 통해 *N.caninum*과 *T. gondii*에 대하여 음성임을 확인한 후 사용하였다.

KBA-1, KBA-2, JPA-2, JPA-4, JPA-5의 whole tachyzoite를 각각 2마리의 토끼에 접종하였으며, 3주 간격으로 boosting을 실시하였다. 1, 2차 접종은 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 개/ml의 tachyzoite를 피하 피하 접종하였고, 3, 4차 접종은 10^6 개/ml의 tachyzoite를 근육 내 접종하였으며, 5차 이후의 접종은 10^6 개/ml의 tachyzoite을 정맥 주사하였다. 4~5일 간격으로 이정맥에서 혈액을 채취하여 IFA를 실시하였으며, 최종 항체가가 1:8,000~10,000인 혈청을 다클론항체로 사용하였다.

아. SDS-PAGE 및 Western blotting

SDS-PAGE를 위한 항원을 준비하기 위해 동일한 방법으로 tachyzoite를 수확한 후 5X sample buffer (60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 4:1의 비율로 첨가하여 5분간 끓였다. Separating gel로써 12%사용하였다. Transfer buffer(25 mM Tris, 190 mM Glycine, 20% MeOH)에 미리 적신 nitrocellulous membrane에 110V로 70분간 전사하였다. 전사를 마친 후 nitrocellulous membrane을 PBST (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.05% Triton-X.)로 씻어준 후 blocking solution (5% skim milk)으로 상온에서 2시간 혹은 4℃에서 overnight하여 blocking 하였다. PBST로 3회 세척한 후 *N. caninum* 각 항원에 대하여 형성된 rabbit-polyclonal anti-*Neospora* hyperimmune serum을

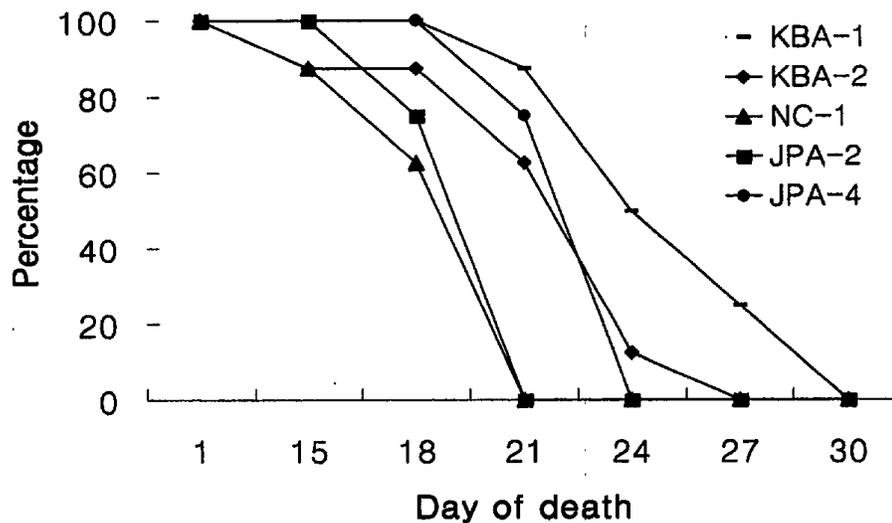
blocking solution에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 1 시간 동안 흔들면서 반응시켰다. PBST에 5분씩 5회 세척한 후 blocking solution에 1:30,000으로 희석된 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, USA)에 1시간 동안 상온에서 흔들면서 반응시켰다. 반응이 끝나면 PBST로 5분씩 5회 세척한 후 ECL solution (Amersham, UK)으로 발색시키고 필름에 노출시켜 밴드를 확인하였다.

2. 결과

가. 임상 증상 및 폐사율

국내 분리주 KBA-1과 KBA-2을 접종한 군은 각각 접종 후 21일에서 29일, 15일에서 25일 사이에 모두 폐사하였다. 또한 외국 분리주 NC-1, JPA-2와 JPA-4를 접종한 군은 각각 15일에서 21일, 20일에서 23일 그리고 21일에서 26일 사이에 모두 폐사되었다 (Fig. 1).

Fig 1. Diagram of viability of mice infected with each *Neospora* isolates



나. 병리 및 면역조직화학적 염색

접종한 마우스는 *N. caninum* strain에 상관없이 전신 장기에서 병변이 관찰되었으며, 병변의 분포와 양상이 서로 유사하였고, 특히 췌장과 뇌, 부신에서 병변이 심하게 관찰되었다 (Fig. 2).

췌장의 실질은 다발성으로 혹은 광범위하게 괴사되어 있었으며, 괴사부와 췌장 간질에 단핵구 및 혈장 세포가 심하게 침윤되어 있거나 대식구 침윤과 함께 섬유아세포가 증식되어 있었다. 일부 acinar cell의 세포질 내에 원충이 감염되어 분열 증식하고 있는 것이 관찰되었다.

뇌는 대뇌 회색질과 백색질, 소뇌의 백색질과 뇌줄기에 한계 명료한 비화농성 괴사소가 다수 존재하였으며, 일부의 소뇌 백색질은 해면화되어 있기도 하였다. 대체로 괴사소는 혈관 주변부에서 다수 관찰되었으며, 괴사부 주변의 신경 세포 세포질 내에서 집락을 형성하고 있는 원충을 확인할 수 있었으며 괴사부 실질에 다수의 tachyzoites가 침윤되어 있는 것이 면역조직화학 염색으로 확인되었다. 이 외에도 일부 개체에서는 위관성 원형세포침윤과 뇌 거미막하강의 비화농성 뇌막염 소견을 관찰할 수 있었다. 전형적인 두꺼운 벽으로 둘러싸여 있는 tissue cyst는 관찰되지 않았으나, 염증 세포의 동원 없이 원충이 분열 증식하면서 집락을 형성하고 있는 psuedocyst는 소수 관찰되기도 하였다. 한편, 척수에서도 비화농성의 괴사성 뇌염 소견을 관찰할 수 있었다.

부신은 피질과 수질에 걸쳐 국소적으로 한계 명료한 괴사소가 존재하였으며 괴사소 주변으로 경미한 임파구 침윤과 부신 세포의 세포질 내에서 분열 증식하는 원충의 집락이 다수 관찰되었다. 심근, 골격근, 횡격막에 중정도의 임파구, 형질 세포 등이 국소적으로 침윤되어 있었으며 근섬유의 위축 및 괴사도 관찰되었다. 또한 위장관의 근육층 및 고유층에 경미하게 임파구가 침윤되어 있었으며, 근육층 및 점막층의 장 상피 세포 세포질 내에 원충이 침윤, 분열 증식하고 있었다. 이 외에도 폐장의 폐포벽에 원충이 집락을 형성하여 폐포강 내로 돌출되어 있기도 하였으며, 또한 간장의 문맥삼각주 주변, 전립샘 외막 및 침샘에 경미하게 임파구 등이 침윤되어 있었으며, 신장과 피부에서는 병변이 관찰되지 않았다.

이들 병소에서 면역조직화학 염색을 통해 원충을 확인할 수 있었으며, 난

소와 자궁근, 비장 등이 원충이 감염되어 있는 것이 동일 방법을 통해 추가적으로 확인되었다. 그러나 경구 감염시켰던 군 및 동거 사육하였던 대조군은 병리조직학적으로 아무런 병변도 관찰할 수 없었다.

다. 원충의 재분리

12, 15, 18, 21일 제 안락사 시킨 마우스의 뇌 유제액을 접종한 vero cell에서 7일에서 10일만에 원충이 출현, 집락을 형성하는 것을 관찰할 수 있었다.

라. Western blotting

각 원충 분리주를 항원으로 하여 생산된 다클론 항체를 1차 항체로 하여, 각 항원을 western blotting으로 분석한 결과, 18에서 102kDa 사이의 다양한 크기의 항원을 확인할 수 있었다 (Fig 2). 가장 진하게 관찰되는 band는 rabbit anti-KBA-1을 1차 항체로 사용한 경우 90, 83, 43, 33, 31, 29 kDa의 주요 밴드가 확인되었으며, rabbit anti-KBA-2를 사용하였을 경우 102, 90, 83, 65, 50, 43, 40, 33, 29, 18kDa의 주요 밴드가 확인되었다. rabbit anti-JPA-2를 사용하였을 때는 90, 83, 65, 50, 43, 31, 18 kDa의 주요 밴드가 확인되었고, rabbit anti-JPA-4를 사용하였을 경우 90, 83, 50, 43, 38, 33, 29, 18 kDa의 주요 밴드를 확인할 수 있었다. Rabbit anti-JPA-5를 사용한 경우는 102, 90, 83, 65, 43, 18 kDa의 주요 band가 확인되었다. 각 분리주 간의 항원성의 차이는 없었으며, band의 강함과 약함만의 차이를 보였다. 한편 *T. gondii*와는 다섯 다클론 항체 모두 40, 61, 98 kDa에서 교차 반응이 있었다.

3. 고찰

본 실험을 통해 SCID 마우스에 대해 국내 분리주가 병원성을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 폐사 시기로 보았을 때, KBA-2가 KBA-1보다 병원성이 다소 높은 것으로 나타났으나 개 유래 분리주인 Nc-1에 비해서는 병원성이 약했다.

개나 소 유래 분리주간에 형태학적 분자 생물학적 차이가 없음이 보고된 바 있으나, Atkinson 등에 따르면 Balb/C 마우스에 대한 개 유래 분리주와 소 유래 분리주의 병원성을 비교해 본 결과 임상 증상 관찰 결과 체중 감소의 정도 및 증상의 발현 정도가 개 유래 분리주가 소 유래 분리주에 비하여 심

하게 나타났으며, 병리 조직학적으로도 개 유래 분리주가 소 유래 분리주에 비해 피사성 병변과 염증 반응이 더욱 심하게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, RADP PCR 분석을 통해 분자 생물학적으로 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 같은 개 유래 분리주인 NC-1과 NC-3의 병원성을 비교해 본 결과 같은 유래 분리주 사이에서 병원성이 차이 나는 것을 확인하였으며, Atkinson 등은 소유래 분리주인 NC-SweB1이 뇌 병변의 심한 정도로 보아 개 유래 분리주인 NC-3보다 병원성이 높을 것으로 추정하였으며, 따라서 병원성의 정도가 각 분리주간의 특성의 차이로 보아야지 동물 유래간의 차이라고 말하기에는 분리 보고된 분리주의 수가 아직 적은 실정이다.

각 분리주에 대한 polyclonal antibody를 생산하여 항원성을 비교하여 본 결과 국내 분리주 KBA-1과 KBA-2는 표준주인 NC-1과 동일한 전형적인 *N. caninum*의 band pattern을 보였으며, *T. gondii*에는 미약한 교차반응만이 관찰되었다. 따라서 국내 분리주가 *N. caninum*임을 확인할 수 있었다. 각 분리주간에 미약한 band의 차이가 나타나는 것은 tachyzoite 준비시 세포배양에서의 순응 단계에 따른 차이일 수도 있으며, antiserum을 생산하는 데 사용된 숙주가 항원을 인식하여 항체를 만들어 내는 데에 있어 개체차로 인해 생길 수도 있으며, 실제로 각 분리주간의 항원성의 차이가 있을 수 있다.

Barber 등은 NC-Liverpool (NC-Liv)과 NC-1에 대한 polyclonal antibody를 생산하여, 각 항원에 대한 항원성을 비교해 본 결과, 17, 18, 31, 39, 52, 61 그리고 80kDa에서 공히 동일한 항원 band를 관찰하였으며, 80kDa band의 경우 진하기에 있어 차이가 나는 것을 확인하였다. 그러나, NC-Liv에서 강하게 관찰되는 75, 86, 98 그리고 102kDa의 band는 NC-1에서는 관찰할 수 없었다. 또한 41과 54kDa의 band는 NC-1에서만 관찰되었다.

N. caninum tachyzoite의 표면 단백질인 Nc-p43과 Nc-p36은 원충이 숙주 세포의 외막에 접촉할 때 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이는 *T. gondii* tachyzoite의 SAG1(p30), SAG3(p43)과 유사하다. 한편 dense-granule 관련 단백질인 Nc-p33은 원충이 숙주 세포에 침입한 후 분비되며, intravacuolar network뿐만 아니라, PVM과 상호 작용하는 것이 밝혀졌다. 이는 *T. gondii*의 tachyzoite의 dense granule 단백질인 GRA3에서 기술된 바와 같다. 그 후 Nc-p43과 Nc-p33이 bradyzoite에서도 발현되는 것을 확인함으로

써, Nc-p43이 숙주 세포로 침윤할 때 ligand로 작용하는 것뿐만 아니라 cyst rupture와 bradyzoite의 재활성화키는 데에도 관여할 수 있음을 시사하였다.

결론적으로 국내분리주는 SCID 마우스에 대해 병원성을 보였으며, 임상 증상은 일반적으로 알려져 있는 neosporosis에서 관찰할 수 있는 임상 증상과 동일하였다. 또한 폐사 시기와 임상 증상의 발현 시기, 임상 증상의 발현 정도와 조직내 병변의 심한 정도를 고려하였을 때 KB-2가 KB-1에 비해 병원성이 높거나 유사한 것으로 밝혀졌다. 병리조직학적으로 췌장과 뇌, 부신에서 괴사성 병변이 가장 심하게 관찰되었으며, 그 이외의 전신 장기에서 원충이 분열 증식하고 있는 것이 관찰되었다. Polyclonal antibody를 생산하여 단백 항원을 비교하여 본 결과, *T. gondii*와는 구별되었으며, 분리주간의 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다.

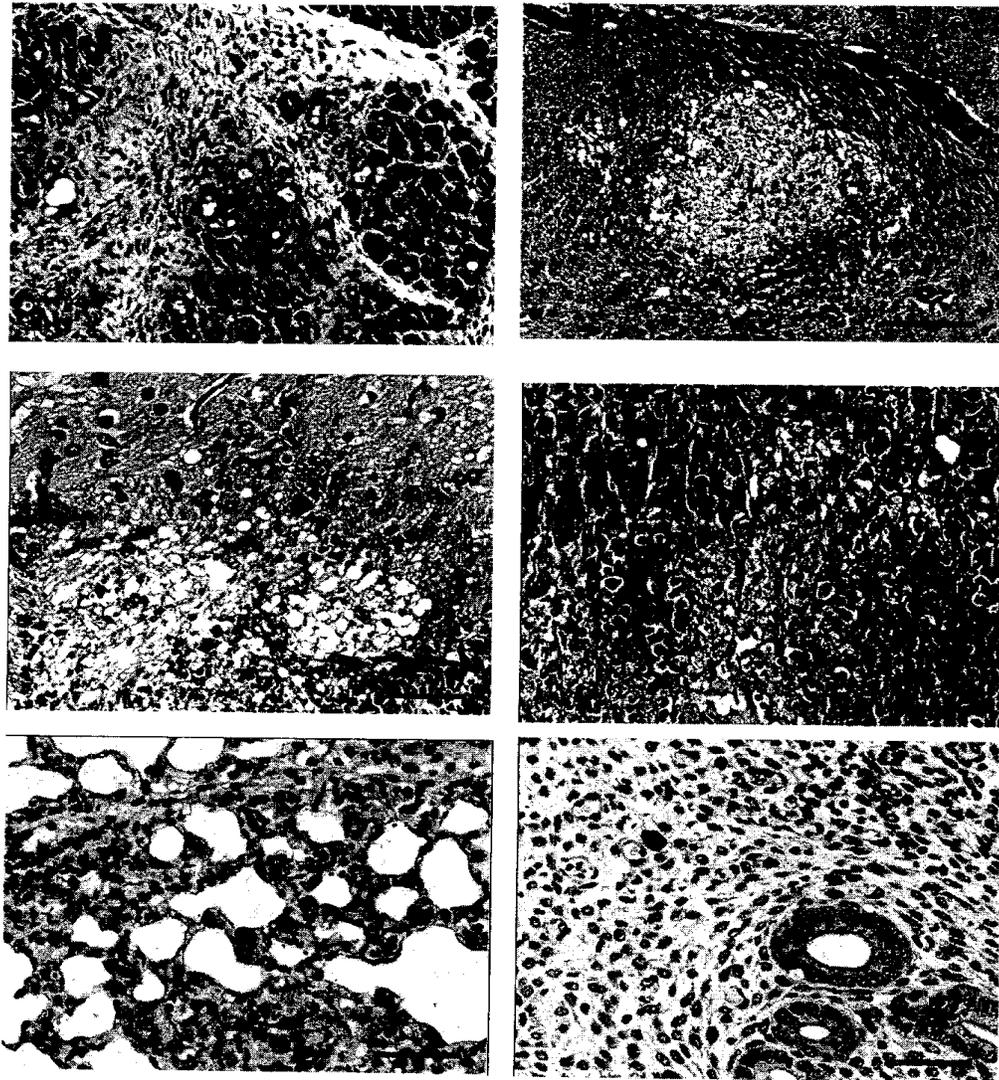


Fig. 2 Histopathology of pancreas, brain, adrenal gland, lung and uterus of mice experimentally infected with KBA-2

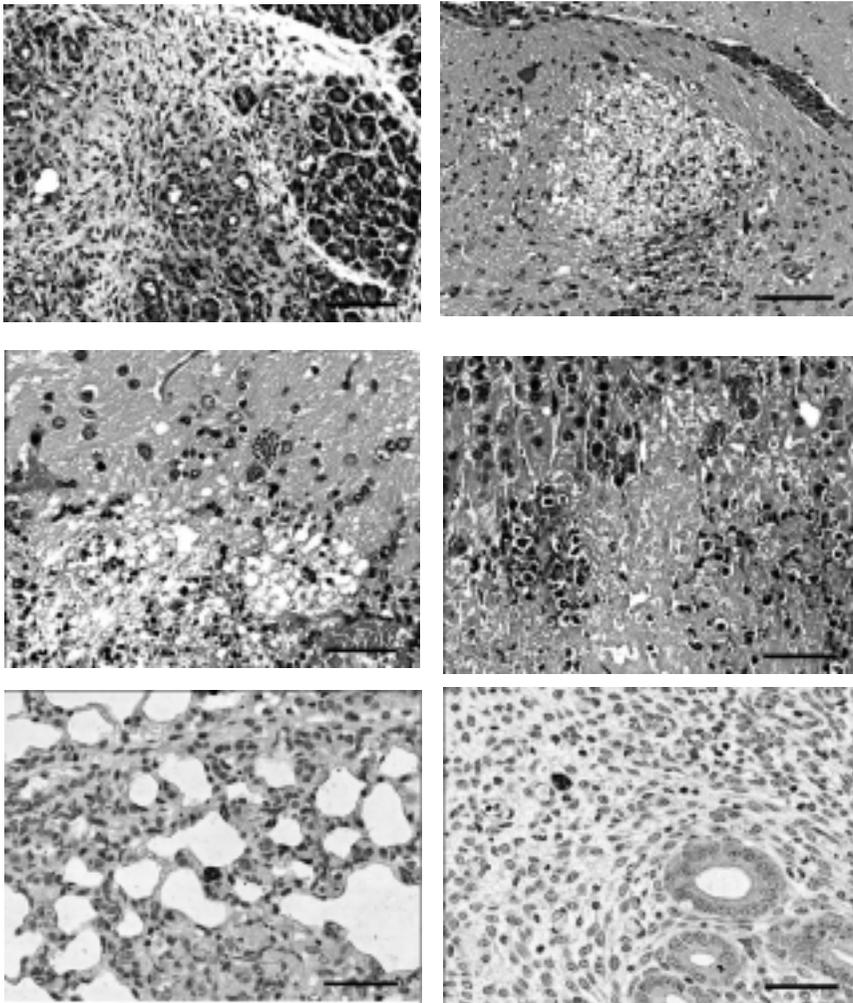


Fig. 2 Histopathology of pancreas, brain, adrenal gland, lung and uterus of mice experimentally infected with KBA-2

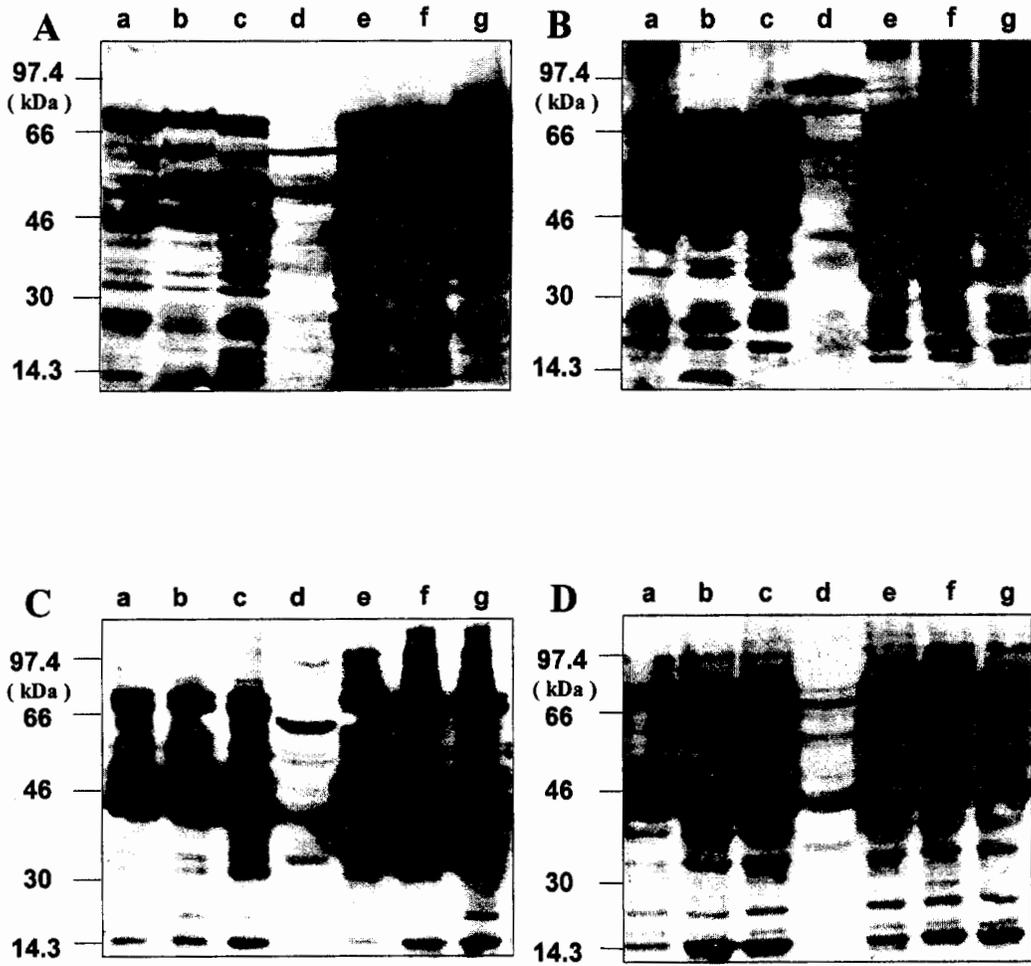


Fig. 3. Immunoblot analysis of *N. caninum* tachyzoites antigens, lane a : KBA-1, lane b : KBA-2 , lane c : NC-1, lane d : *T. gondii* , lane e : JPA-2, lane f : JPA-4, lane g : JPA-5. Each isolates was probed with rabbit hyperimmune serum against KBA-1 (Fig A.), KBA-2 (Fig B.), JPA-2 (Fig C.), JPA-4 (Fig D.)

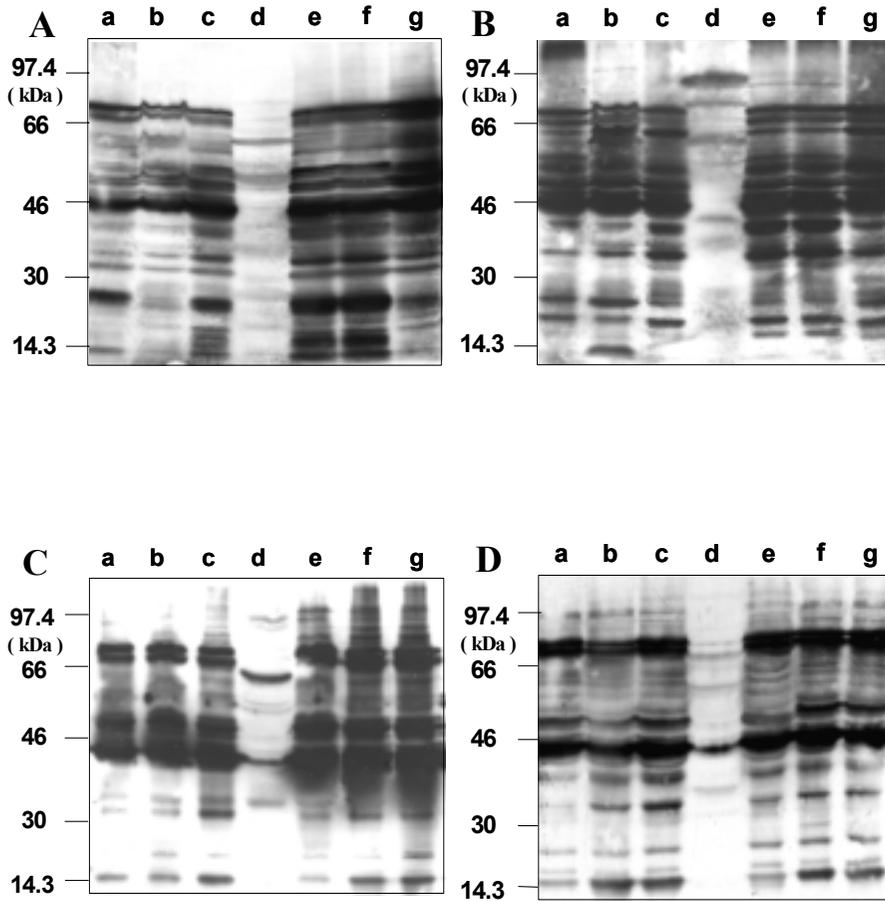


Fig. 3. Immunoblot analysis of *N. caninum* tachyzoites antigens, lane a : KBA-1, lane b : KBA-2 , lane c : NC-1, lane d : *T. gondii* , lane e : JPA-2, lane f : JPA-4, lane g : JPA-5. Each isolates was probed with rabbit hyperimmune serum against KBA-1 (Fig A.), KBA-2 (Fig B.), JPA-2 (Fig C.), JPA-4 (Fig D.)

제 3 절 네오스포라 진단법의 확립

1. 파라핀 블록 PCR을 이용한 네오스포라 진단법의 확립

가 재료 및 방법

1) 실험재료

면역염색과 PCR에 사용된 조직은 제2장에 기술된 것과 같이 연구기간 동안 의뢰된 71개체를 대상으로 하였다 (Table 1).

2) 면역조직화학 염색

조직을 4 μ m의 두께로 박절한 다음 3% H₂O₂가 함유된 무수 메탄올에서 5분간 처리하고 0.1% pronase로 37°C에서 10분간 처리한 후 0.1% gelatin에 희석된 5% 정상 토끼 혈청으로 37°C 습상에서 30분간 반응시켰다. 일차 항체는 1:3,000으로 희석한 *N. caninum* 고도면역혈청 (VMRD, USA)으로 반응시켰다. 이차 항체는 biotinylated anti-goat IgG (Vector Lab, USA)를 1:200으로 희석하여 37°C에서 20분간 반응시킨 뒤 avidin-biotin complex 용액에 20분간 적용시키고 DAB로 발색시켰다. 핵대조 염색으로는 Harris' hematoxylin 염색을 하여 광학현미경으로 검경하였다. 양성대조군으로는 실험적으로 KBA-2를 감염시킨 마우스 뇌조직을 이용하였다.

3) PCR

의뢰된 개체 중 병리조직학적으로 뇌와 심근 등에서 경도에서 심한 정도의 병변이 확인된 개체의 파라핀 블록을 대상으로 PCR을 수행하였다. 또한 같은 개체의 신선한 조직이 있을 경우 이를 대상으로도 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR을 위한 primer는 *N. caninum*에 특이적인 Np4 (5'CCTCCCAATGCGAACGAAA3')과 Np7 (5'GGGTGAACCGAGGGAGTTG3')를 사용하였다. PCR 혼합액의 조성은 50 μ l에 150 ng의 target DNA, 2 mM MgCl₂, 10X reaction buffer (40 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.1% Triton X-100, 1 ml당 1 mg의 gelatin, PCR primer를 각 10 pmol, 각각의 dNTP를 200 μ M, 2 unit Taq polymerase를 사용하였다. PCR은 Perkin-Elmer Thermocycler 9600을 이용

하여 수행하였으며, 반응조건은 94°C에서 2분간 pre-denaturation 하였으며, 95°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 3초간 annealing, 72°C에서 60초간 extension 하는 과정을 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 2분간 extension 하도록 하였다. 증폭산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였으며 ethidium bromide로 염색하여 자외선광으로 DNA 증폭산물을 확인하였다. 양성대조군으로는 실험적으로 *N. caninum* 국내분리주인 KBA-2를 감염시킨 마우스의 뇌조직의 파라핀블록을 이용하였으며, 음성대조군으로는 어떠한 병변도 확인되지 않은 정상소의 뇌조직을 이용하였다.

나 결과

1) 면역조직화학 염색

병리조직학적 검사 시 병변이 미약한 경우에는 2예(11%) 에서만 tachyzoite를 확인할 수 있었다. 하지만 병변이 중증도를 나타낸 경우에는 12(57%)에서 양성반응을 확인할 수 있었고 병변이 심한 경우에는 21(68%) 개체에서 양성반응을 확인할 수 있었다.

2) PCR

신선한 조직을 이용한 PCR 검사 결과 조직학적으로 병변이 확인된 개체 중에서 미약한 개체에서는 양성밴드가 2예에서 확인되지 않았으나 중증도의 병변에서는 10(48%) 개체에서 양성밴드가 확인되었고, 병변이 심한 개체에서는 18(58%)에서 양성 반응을 나타내었다. 파라핀 포매조직을 이용하여 PCR을 실시한 결과 병변이 미약한 19개체 중에서는 7개체(37%)에서 밴드를 확인할 수 있었다. 한편 조직학적으로 중증도 이상의 병변을 가진 52개체 모두에서 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

다. 고찰

현재 주로 실시하고 있는 네오스포라 감염증에 의한 소 유산 진단방법은 병리조직학적 검사 또는 면역조직화학염색이 보편적으로 사용되고 있지만 그 감수성과 특이성은 다소의 한계성이 있다. 병리조직학적 검사에서 의심되는

병변이 관찰되었다 하더라도 면역조직화학 염색 시 병변 내에 tachyzoite가 소수 존재하는 경우에는 항원을 검출하기 어려울 경우도 있으므로 진단상에 어려움이 있을 수도 있다. 하지만 병변이 있는 부위의 파라핀 블록을 대상으로 PCR을 수행할 경우 적은 양의 tachyzoite가 존재하더라도 항원의 검출이 더 용이하다. 또한 현재 주로 사용되는 모체의 혈청검사법은 혈청역가에 의해서 검사결과가 영향을 받으므로 'false negative'의 결과가 나올 수도 있다. 실제로 검사 결과, 혈청검사 당시 중중도 이상의 역가를 가진 경우는 회석배율에 문제가 되지 않으나 역가가 낮은 경우는 회석배율에 따라서 'false negative'가 나타날 수도 있다. 그리고 유산당시 유산태아 내에는 병변이 항체의 역가가 높지 않게 나타날 수가 있다.

그러한 목적으로 본 연구에서는 개별 개체 당 PCR을 이용하여 *N. caninum*에 의한 유산을 정확하고 민감하게 진단할 수 있는 진단법을 확립하였다. 같은 PCR이라 하더라도 신선한 조직을 이용한 경우 민감도 면에서는 병변이 확실하게 증명된 파라핀 블록을 이용한 경우보다 상대적으로 낮았다.

하지만 경도의 병변을 나타낸 19 예중 7예에서만 PCR 밴드를 확인할 수 있어서 PCR법 역시 진단상에 있어서 어느 정도의 한계성은 있다. Baszler등에 의하면 조직 20 mg당 최소 20에서 40개 정도의 tachyzoite가 있어야만 PCR 수행시 양성 결과를 확실하게 얻을 수 있다고 하였다. 따라서 경도의 예중에서 PCR 음성 결과를 보인 것은 원충의 수가 충분하지 않거나 그런 상태에서 아마도 조직의 사후변화가 겹쳐서 음성반응을 보였으리라 사료된다.

본 연구에서 확립된 진단법은 국내에서 소의 네오스포라 감염증을 연구하는데 있어서 폭넓게 활용될 수 있으리라 사료되며 또한 본 PCR법을 이용하여 파라핀 블록에 있는 원충에 대한 유전적인 측면에서의 연구에도 활용할 수 있으리라 사료된다.

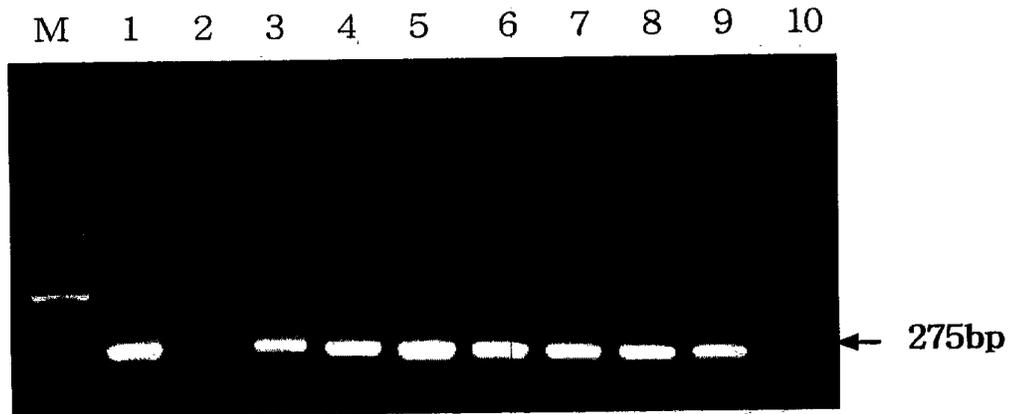


Fig. 1 lane 1, positive control (KBA-2 infected mouse brain)
 lane 2, negative control (normal bovine brain)
 lane 3, case #10 (+); lane 4, case #15 (+); lane 5, case #20 (++)
 lane 6, case #24 (++)
 lane 7, case #28 (+++); lane 8, case #34(+++);
 lane 9, positive control (*N. caninum* DNA only)
 lane 10, paraffin only, negative control.

Table 1. Summary of histopathology, immunohistochemistry and PCR

Group	Histopathology	IHC	PCR	
			Fresh tissue	Paraffin block
1*	19	2/19 (11%)**	2/19 (11%)	7/19 (37%)
2	21	12/21 (57%)	10/21 (48%)	21/21 (100%)
3	31	21/31(68%)	18/31(58%)	31/31 (100%)

* Group 1:+ ; group 2:++ ; group 3:+++

**Positive percentage

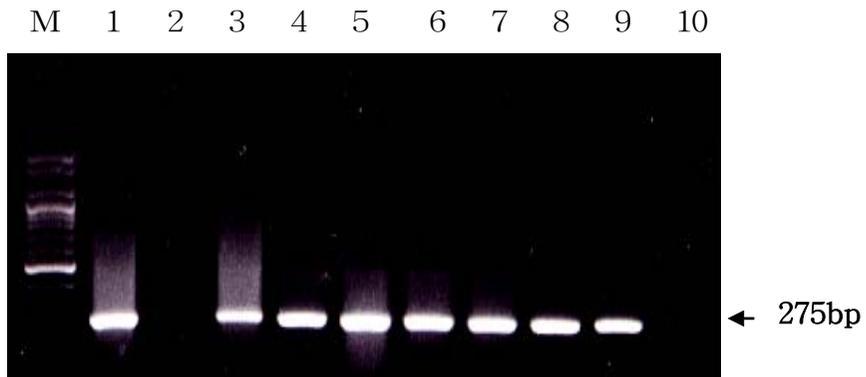


Fig. 1 lane 1, positive control (KBA-2 infected mouse brain)
 lane 2, negative control (normal bovine brain)
 lane 3, case #10 (+); lane 4, case #15 (+); lane 5, case #20 (++) ; lane 6,
 case #24 (++) ; lane 7, case #28 (+++) ; lane 8, case #34(+++) ;
 lane 9, positive control (*N. caninum* DNA only)
 lane 10, paraffin only, negative control.

Table 1. Summary of histopathology, immunohistochemistry and PCR

Group	Histopathology	IHC	PCR	
			Fresh tissue	Paraffin block
1*	19	2/19 (11%)**	2/19 (11%)	7/19 (37%)
2	21	12/21 (57%)	10/21 (48%)	21/21 (100%)
3	31	21/31(68%)	18/31(58%)	31/31 (100%)

* Group 1:+ ; group 2:++ ; group 3:+++

**Positive percentage

2. 재조합 Np43 단백질을 이용한 ELISA 진단법의 확립

가. 재료 및 방법

1) 항원의 준비

원충으로는 *N. caninum* 국내분리주인 KBA-2와 Nc-1 strain을 사용하였으며 원충은 10% FBS이 첨부된 Vero에서 계대하였다.

2) RT-PCR

통상적인 Tri reagent를 이용하여 원충의 total RNA를 추출 및 정제하여 template로 사용하였다. RT-PCR은 네오스포라 원충의 major surface membrane antigen (Nc-p43) (GeneBank accession number U93870)의 open reading frame의 여러 부위를 증폭하였으며 primer set과 증폭부위는 Figure 1과 Table 1에 각각 명시하였다. 증폭된 DNA의 산물들은 pGEM-TEasy vector (Promega, USA)에 clone 한 뒤 T7과 SP6 primer로 sequencing 하였다. 염기서열 분석을 위한 primer의 순서는 Table 1에 기술된 바와 같이 GeneBank accession number U93870을 이용하였다.

3) 재조합 plasmid의 construction과 단백질발현 및 분리

KBA-p43/P26 plasmid와 대조 항원으로 사용할 Nam등이 1996 확립한 특소포자충의 SAG1/A19 plasmid를 E coli BL21 pLysS (DE3)에 형질변형시켰으며, 발현을 위해 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG)로 30°C에서 3시간 처리하였다. 발현된 항원을 glutathione column으로 분리하여 ELISA 항원으로 사용하였으며, 이때 Western blot에서와는 달리, 많은 비특이 반응을 보였다. 따라서, 항원을 GST와의 융합단백질 보다는 비특이 반응을 최소화 할 수 있는 His-tagged 단백질로 발현시키는 것이 시도되었다. 단백질을 얻기 위하여 위의 plasmids를 pQE30 (Qiagen Co.)에 subcloning하였다. 네오스포라 원충의 p43/P26과 특소포자충의 SAG1/A19에 대한 DNA는 각각 732 bp와 516 bp로 pQE30에 삽입된 것을 확인하였으며, E coli M15 strain에 형질 변형시켰다. His-tagged 단백질의 발현을 위해서 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG)로 30°C에서 3시간 처리하였다. 발현

된 His-tagged 단백질은 Ni-NTA metal affinity column을 이용하여 분리하였으며, KBA-p43/P26은 26 kDa로, SAG1/A19는 19 kDa의 단일 밴드로 분리되었다.

4) Western blotting

통상적인 Towbin 방법에 준해서 실시하였다. 세포의 extract는 12% SDS-PAGE에서 전기영동한 후 nitrocellulose sheet (Schleicher and Shuell, USA)에 transfer 하였다. Fusion 단백질은 GST detection kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 검증하였다. Transfer 후 nitrocellulose sheet를 0.05% Tween-20이 포함된 PCS로 희석한 10% 정상 토끼 혈청으로 block을 실시하였다. 그 후 1:500으로 희석된 혈청과 반응시킨 다음 1:5,000으로 희석한 2차 항체로 반응시키고 ECL system을 이용하여 detection하였다.

5) ELISA

먼저 분리된 항원으로 checkerboard ELISA를 실시하였다. 1, 2, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 항원을 coating 하였을 때, 항원의 농도가 5 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 가장 좋은 특이성과 민감도를 얻을 수 있었으며, 이때 소 혈청은 1:100, 2차 항체는 1:10,000으로 희석 사용하였다. Cut-off 값은 특소포자충의 A19 항원과의 반응을 참조하면서 Nc-p43의 P26 항원에 대해 얻은 측정값에서 $\text{mean} + 3 \times \text{SD}$ 로 얻었으며, 0.32 ($0.11 + 3 \times 0.07$)로 결정하였다.

6) 혈청샘플

전국의 9개 도의 젓소에서 무작위로 수집한 혈청에 대해 ELISA를 실시하였다.

나. 결과

Nc-p43에 대한 sequencing을 실시한 결과 KBA-2는 Nc-1에 비해서 625번째 염기서열에 있어서 guanine이 cytosine로 바뀐 것 이외에는 동일하였다. 이로 인해서 glutamic acid가 glutamine로 바뀌었다. 이외 모든 부위는 두 분리주간에 있어서 동일하였다.

PCR 결과 S, A, P, X, Y 그리고 Z의 크기는 각각 1,104 bp, 738 bp, 732

bp, 372 bp, 366 bp, 366 bp 이었다. 그리고 발현된 각각의 단백질의 크기는 T, S, A, 및 P는 69, 66, 52, 53 kDa 이었고 X, Y, Z는 40kDa 이었다. Western blotting 결과 T, S 및 P는 소 혈청과 반응성을 나타내었으나 A, X, Y, Z는 반응성을 보이지 않았다.

네오스포라 원충의 p43/P26과 톡소포자충의 SAG1/A19에 대한 DNA는 각각 732 bp와 516 bp로 pQE30에 삽입된 것을 확인하였으며, 발현된 His-tagged 단백질은 Ni-NTA metal affinity column을 이용하여 분리하였으며, KBA-p43/P26은 26 kDa로, SAG1/A19는 19 kDa의 단일 밴드로 분리되었다.

전국의 소 사육 농장에서 수집된 764두의 소 혈청 중 114두에서 네오스포라 원충에 대한 항체 양성율을 얻었으며 (14.9%), 이때 톡소포자충에 대한 양성 혈청은 없었다. 도별로 보면, 경기도에서 122건 중 12건이 양성 (9.8%) 이었으며, 강원도에서 121건 중 16 건으로 13.2%, 충북에서 72건 중 10건으로 13.9%, 충남에서 120건 중 10건으로 8.3%, 경북에서 93건 중 15건으로 16.1%, 전북에서 86건 중 11건으로 12.8%, 전남에서 120건 중 20건으로 16.7%의 양성율을 보였다. 하지만 제주에서는 검사 34건 모두가 음성이었다.

다. 고찰

네오스포라 원충의 Nc-p43 주요막 항원의 항원결정기와 *Toxoplasma gondii*의 SAG1 (p30)에서 얻은 항원 결정기를 이용하여, 재조합 항원을 쉽게 준비할 뿐만 아니라 특이성이 높은 kit을 개발하고자 본 실험을 실시하였다. 네오스포라 원충의 진단에서 주요막 항원의 항원부위 (antigenic domain)만을 재조합 단백질로 대량 생산하여 ELISA 진단에 사용하였으며, 특히 네오스포라 원충과 유사한 톡소포자충과 같이 반응시킴으로써 특이성을 검토할 수 있었다.

또한 전국에서 수집된 젖소 혈청에 대하여 적용한 결과, 네오스포라 원충에 대한 항체 검출은 제주지역을 제외한 전 지역에서 통계학적 유의성 없이 8.3 - 16.7%의 양성율을 보이고 있었다. 이는 네오스포라 원충이 전국적으로 유행한다고 추정되며, 이후 치료제 응용 및 백신 개발등의 필요성을 시사한

다. 보고서의 다른 부분에서 제시된 *N. caninum*에 대한 혈청검사는 IFA법을 이용하여 수행되었고 약 20%정도의 양성율을 나타내어 여기서 확립된 재조합 단백질을 이용한 ELISA법에 의한 검사 결과와 차이를 보이고 있다.

ELISA법에 이용된 소 혈청은 무작위로 수집한 혈청인데 반하여 IFA법에 사용되었던 혈청은 실제로 유산이 문제시되는 목장 것도 다수 포함된 관계로 인하여 혈청양성율이 높았던 것으로 사료되며 아울러 검사법차제의 특이성에 의한 차이도 있다고 사료된다. 앞으로는 본 과제에서 개발된 특이성이 높은 ELISA법이 *N. caninum* 혈청검사에 유용하게 이용되리라 사료된다.

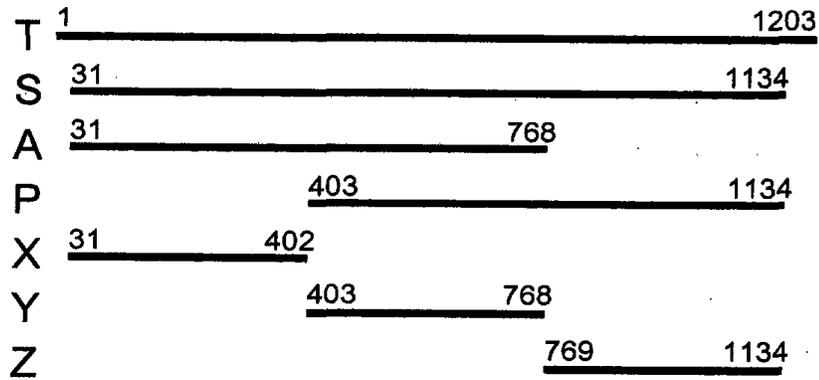


Fig. 1. Design of fragmentation of Nc-p43 gene into hydrophilic and hydrophobic moieties

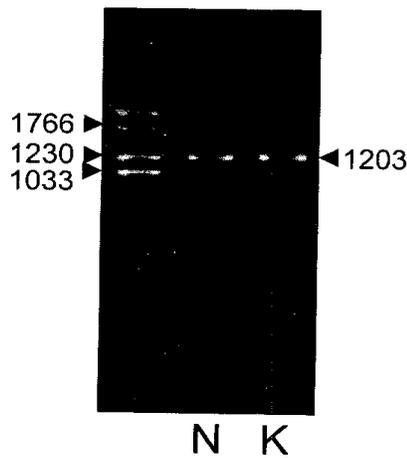


Fig. 2. PCR amplified Nc-p43 coding genes of Nc-1(N) and KBA-2 (K) strains. Numerals indicate bp.

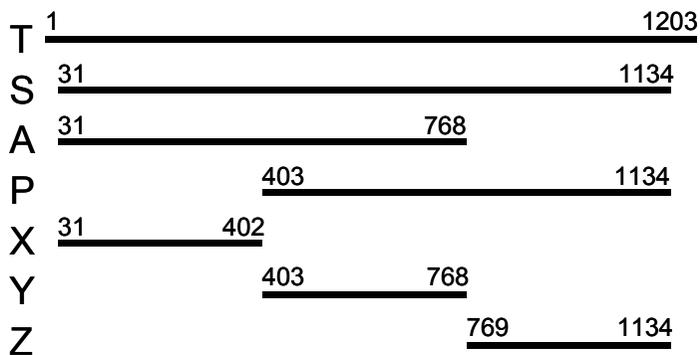


Fig. 1. Design of fragmentation of Nc-p43 gene into hydrophilic and hydrophobic moieties.

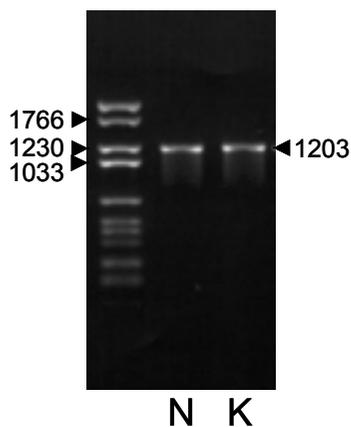


Fig. 2. PCR amplified Nc-p43 coding genes of Nc-1(N) and KBA-2 (K) strains. Numerals indicate bp.

	613	639
Nc-1	ACT GTG AAT CCA <i>GAA</i> AAC AAC GGA GTG	
KBA-2	ACT GTG AAT CCA <i>CAA</i> AAC AAC GGA GTG	

	205	213
Nc-1	T V N P <i>E</i> N N G V	
KBA-2	T V N P <i>Q</i> N N G V	

Fig. 3. Sequence variation in Nc-p43 gene and deduced amino acid of Nc-1 and KBA-2 strains. Point mutation in DNA sequence and deduced amino acid sequence are italicized.

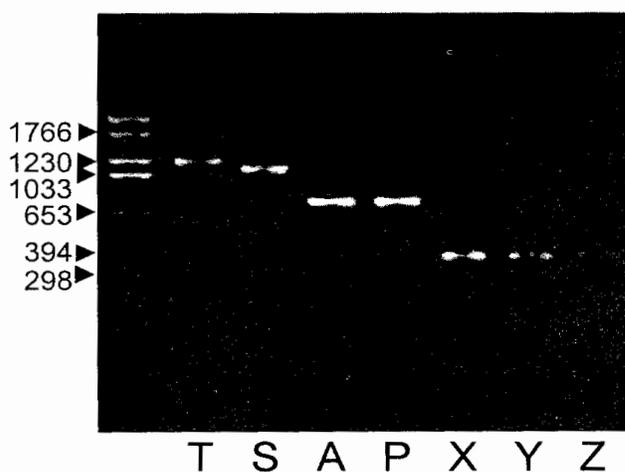


Fig. 4. PCR- amplified Nc-p43 coding gene fragments of KBA-2 strain separated in 1.2% agarose gel. Numerals indicate bp.

	613	639
Nc-1	ACT GTG AAT CCA GAA AAC AAC GGA GTG	
KBA-2	ACT GTG AAT CCA CAA AAC AAC GGA GTG	
	205	213
Nc-1	T V N P E N N G V	
KBA-2	T V N P Q N N G V	

Fig. 3. Sequence variation in Nc-p43 gene and deduced amino acid of Nc-1 and KBA-2 strains. Point mutation in DNA sequence and deduced amino acid sequence are italicized.

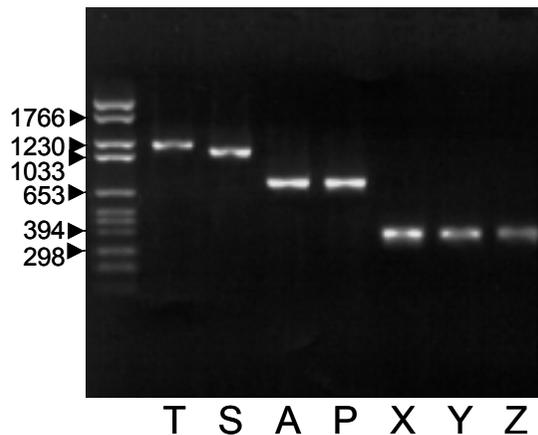


Fig. 4. PCR- amplified Nc-p43 coding gene fragments of KBA-2 strain separated in 1.2% agarose gel. Numerals indicate bp.

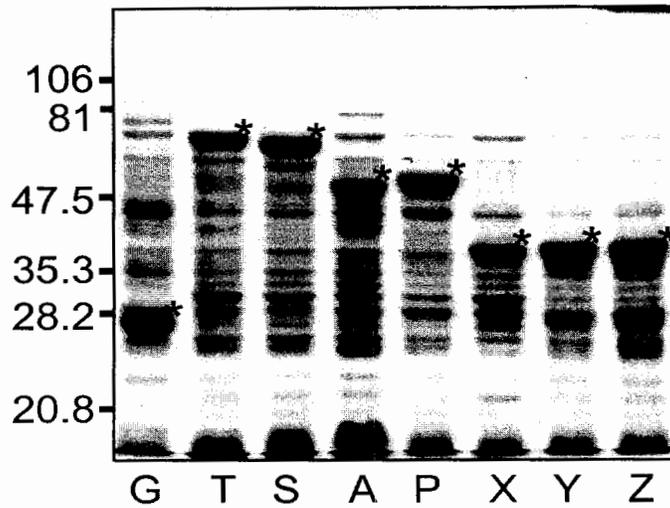


Fig. 5. SDS-PAGE of expressed GST-Nc-p43 fusion proteins. Expressed GST and GST fused proteins are indicated by asterisks(*).

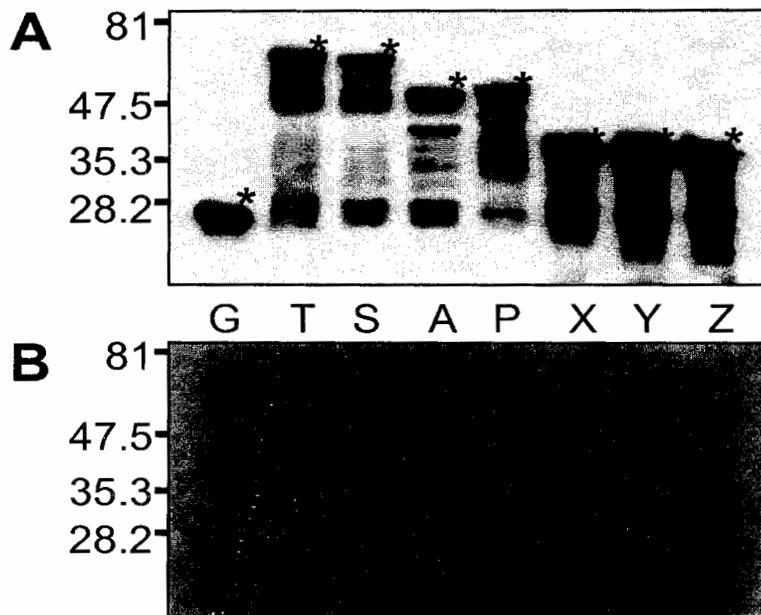


Fig. 6. Western blot detection of GST fusion proteins of Nc-p43 fragments (A) and with bovine serum confirmed to be infected with *Neospora caninum*. Asterisks (*) indicate GST and GST fused proteins as in Fig. 5.

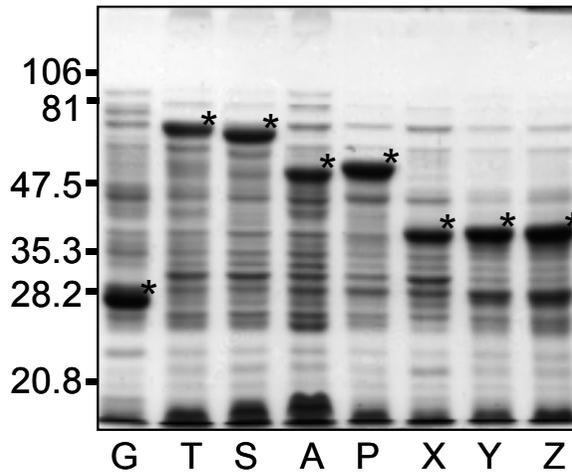


Fig. 5. SDS-PAGE of expressed GST-Nc-p43 fusion proteins. Expressed GST and GST fused proteins are indicated by asterisks(*).

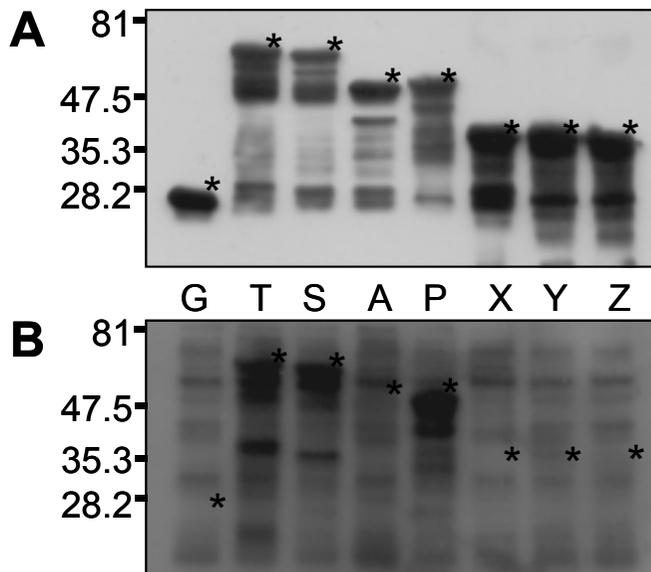


Fig. 6. Western blot detection of GST fusion proteins of Nc-p43 fragments (A) and with bovine serum confirmed to be infected with *Neospora caninum*. Asterisks (*) indicate GST and GST fused proteins as in Fig. 5.



Fig. 7 Gene cloning of SAG1/A19 and KBA-p43/P26 in pQE plasmid

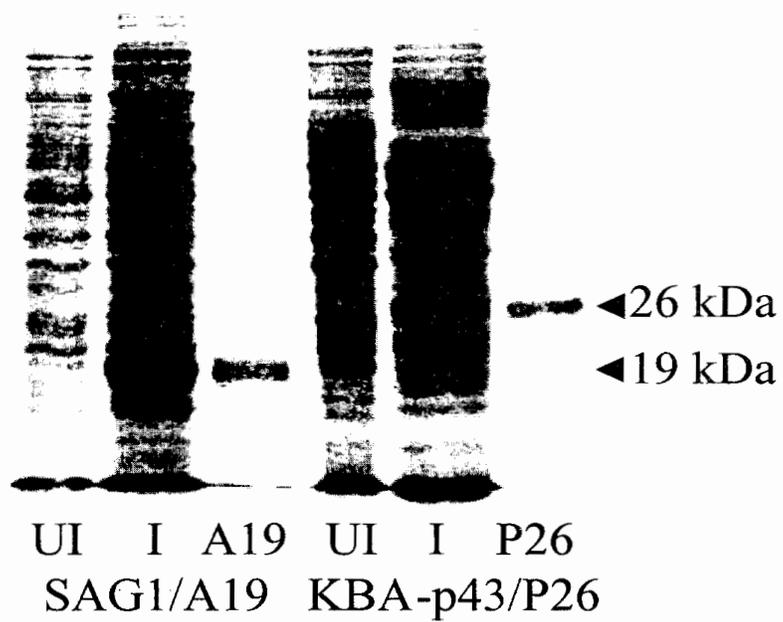


Fig. 8 Antigen expression and purification of SAG1/A19 and KBA-p43/P26 in pQE plasmid

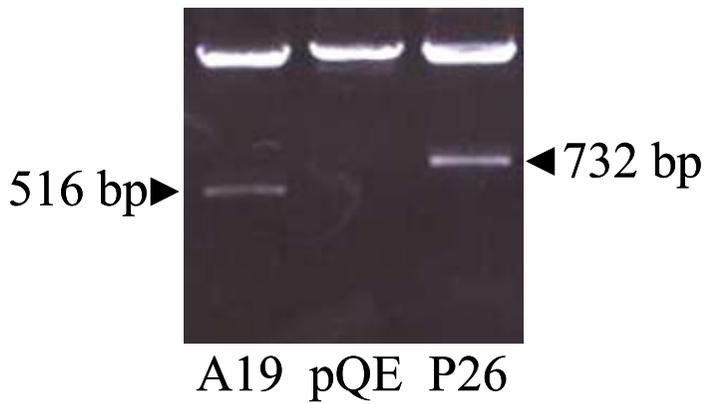


Fig. 7 Gene cloning of SAG1/A19 and KBA-p43/P26 in pQE plasmid

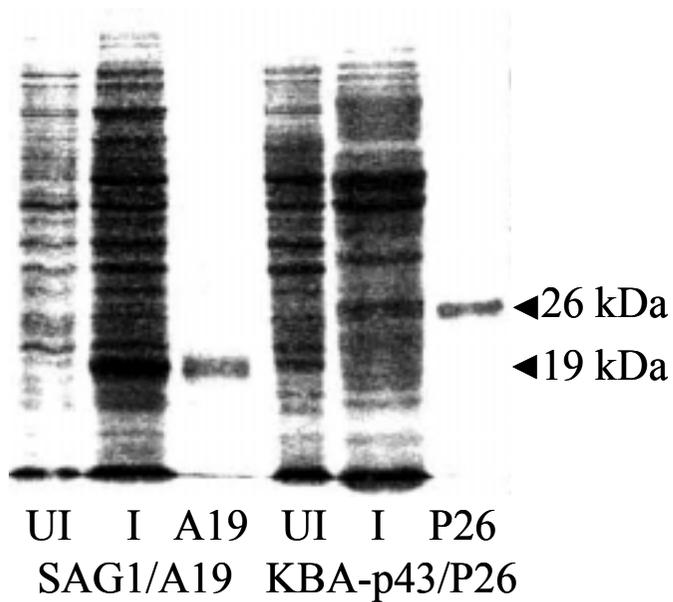


Fig. 8 Antigen expression and purification of SAG1/A19 and KBA-p43/P26 in pQE plasmid

Table 1 Results of serology by recombinant ELISA

도	양성/검사수	(%)
전남	20/120	16.7
충북	10/72	13.9
경기	12/122	9.8
제주	0/34	0
강원	16/121	13.2
충남	10/120	8.3
전북	11/86	12.8
경남	ND	
경북	15/93	16.1

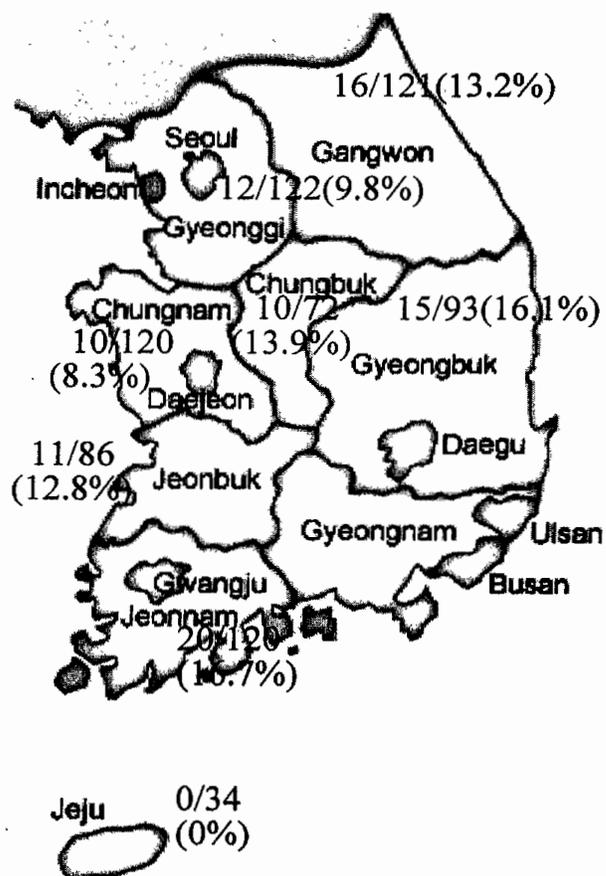
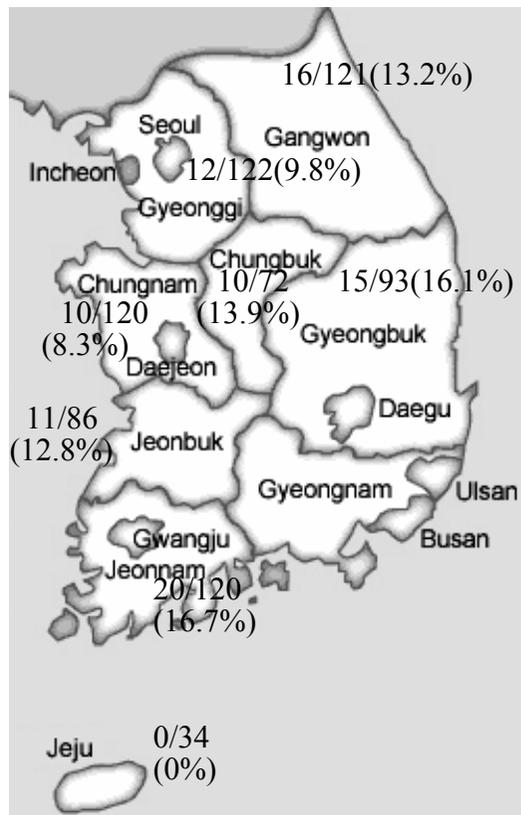


Table 1 Results of serology by ELISA using recombinant Np43

도	양성/검사수	(%)
전남	20/120	16.7
충북	10/72	13.9
경기	12/122	9.8
제주	0/34	0
강원	16/121	13.2
충남	10/120	8.3
전북	11/86	12.8
경남	ND	
경북	15/93	16.1



3. 응집반응을 이용한 네오스포라 혈청검사법의 확립

가. 재료 및 방법

1) 원충 및 항원의 준비

항원으로는 한국분리주 KBA-2를 사용하였으며 원충이 신장세포 (KBA-2)에 유지하였다. vero cell에 원충이 80%이상 감염되면 cell scraper로 수거 후 filtering한다. 수거된 원충은 formaldehyde에 6%로 희석하고 4°C에서 overnight 시켜 고정한다. 원충의 수가 $4 \times 10^4/\mu\text{l}$ 되게 alkaine buffer로 희석한다.

2) 응집반응

V-bottom 96 well plate에 혈청을 25 μl 씩 2단 희석한다. 다음에 0.2 M 2-mercaptoethanol을 25 μl 씩 분주한다. 다음 준비된 항원을 50 μl 씩 분주하고 잘 섞어준 뒤 37°C 5% CO₂에 overnight 시킨다. 결과는 넓게 퍼진 확장된 불투명한 물질이 관찰되면 양성으로 판정하고 불연속적인 물질이나 점으로 보이면 음성으로 판정한다. 양성과 음성 대조군으로는 VMRD사에서 구입한 개와 소 각각에 대한 *N. caninum* 양성 및 음성혈청과 *T. gondii* 감염혈청을 사용하였다.

나. 결과

cut off value를 1:512로 했을 경우 응집반응과 ELISA와의 전체일치도 (OPA: overall percent agreement가 28+39/74로 91%를 보였다. 1:512의 cut off value에서 소와 개의 양성혈청은 양성의 응집반응을 보였으나 개와 소의 음성혈청 및 특소 감염혈청은 음성이었다.

다 고찰

응집반응은 야생 반추류나 야생 개과동물 등 2차 항체를 쉽게 구할 수 없을 경우 *N. caninum*의 기존 진단법으로 혈청검사를 하기가 어려운 단점을 보완하고 아울러 여러 종류의 다양한 동물에 대한 혈청검사법을 확립하는 차원

에서 실시되었다. 이 반응법은 항원과 혈청중의 항체가 직접 응집하는 반응을 관찰하여 감염상태를 조사하거나 진단하게 된다.

다른 부분에서도 언급했듯이 개가 *N. caninum* 의 종숙주로 확인됨에 따라서 네오스포라 감염의 위험인자 및 감염원에 대한 목적의 연구에 있어서 이 용가치가 매우 높을것으로 사료된다.

Table 1 Result of control sera by cutoff titer as 512

control		NAT 결과
소	양성 control	+
	음성 control	-
개	양성 control	+
	음성 control	-
Toxoplasma gondii 감염 혈청		-

Table 2 Comparison of ELISA and NAT.

구분		ELISA 결과		계
		+	-	
NAT결과	+	28	4	32
	-	3	39	42
계		31	43	74

Cutoff 값이 1:512일 때 NAT와 ELISA의 전체일치도 (OPA:overall percent agreement)가 $(28+39)/74=90.5\%$ 로 가장 높게 나왔다.

제4절 개, 한국너구리 및 마우스에 대한 네오스포라 혈청검사 및 방역대책

1. 재료 및 방법

가. 혈청 샘플

실험에 사용된 개의 혈청은 도시지역과 네오스포라에 의한 유산경험이 있는 목장에서 사육중인 개 2개의 군으로 구성되었다. 도시지역의 개 혈청은 수의과대학 부속동물병원과 개인동물병원에서 무작위로 수집한 289개의 혈청을 실험에 사용하였고, 51개의 혈청을 목장에 사육중인 개로부터 채혈하여 사용하였다. 또한 광견병 조사의 일원으로 야생에서 포획한 32마리의 한국너구리 (*Raccoon dog* : *Nyctereutes procyonoides koreensis*)로부터 채혈한 혈청을 검사에 사용하였다. 들쥐의 경우는 역시 목장지역의 인근 야생에서 포획하여 혈청검사에 사용하였다.

나. 혈청 검사

개와 마우스의 경우에는 형광항체법 (immunofluorescent antibody test; IFAT)을 이용하여 혈청검사를 실시하였다. 항원으로는 국내분리주 KBA-2를 사용하여 항원플레이트를 제작하여 사용하였다. 형광현미경하에서 완전하게 변연부로 원충이 형광을 바라는 것만을 양성으로 판정하였다. 양성 대조군으로는 개와 마우스에 실험접종 한 후 채혈한 혈청을 사용하였다. 한국너구리의 경우에는 위에서 언급된 응집반응을 이용하여 혈청검사를 실시하였다.

2. 결과

가. 혈청검사

혈청검사 결과는 Table 1과 2에 요약하여 표시되어 있다. 도시지역에서 채집한 개의 경우는 검사대상 289두중 8.3%인 24마리에서 양성반응을 확인할 수 있었다. 항체가는 1:50, 1:100, 1:200 및 1:400에서 각각 15, 5, 3, 1마리가 양성반응을 보였다. 그에 반해서 네오스포라 유산경험이 있는 목장에서 채혈한 51마리의 경우에는 11마리가 양성반응을 보여 21.6%로 도시 지역에 비해서 상대적으로 매우 높은 양성율을 확인할 수 있었다. 35마리의 양성 중 16

마리는 숫컷이었고 10마리는 암컷이었으며 나머지는 성이 확인되지 않았다.

서른 두 마리의 한국 너구리 중에는 7마리가 응집반응결과 양성으로 확인되어 21%의 양성을 관찰할 수 있었다. 하지만 혈청검사를 실시한 들쥐의 경우는 모두 음성이었다.

나. 방역대책

○ 수직전파에 대한 예방

- 혈청학적으로나 병리학적으로 감염이 확인된 동물은 도태시킨다
- 혈청음성인 동물로 대체시킨다

○ 수평전파에 대한 예방책

- 종속주와 소와의 접촉을 최소화 한다
- 목장에서 사육중인 개를 잘 관리한다
- 확실한 증거는 없으나 개가 종속주로 확인됨에 따라서 가능한 너구리와 같은 야생개과 동물의 접근을 방지한다
- 개의 분변으로부터 소의 접촉을 피한다
- 사료와 기타 시설을 잘 보호해서 오염을 최대한 방지한다
- 소로부터 종속주로의 감염을 최소화한다
- 유산 가검물과 태반을 적절하게 폐기 처분한다
- 축사를 정기적으로 소독한다

○ 그 외 유산태아에 대한 검사나 herd level에서 유산이 증가될 경우 혈청 검사 등을 실시한다

○ 축주 및 수의사에 대한 교육을 한다

○ 네오스포라의 백신개발과 같은 기초연구를 지속적으로 한다

3. 고찰

도시지역 개의 혈청양성을 8.3%는 일본과 미국의 평균양성을 7%와 유사하다. 그러나 *N. caninum* 감염에 의한 유산경험이 있는 목장에서 수집한 51두

의 개혈청을 대상으로 혈청검사를 실시한 결과 도시지역 보다 통계적으로 현저히 높은 21%의 양성율을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 검사두수의 수가 적은 관계로 정확한 결론을 이끌어내기에는 미흡하지만 감염된 개를 통한 수평감염이 이루어지고 있는 것으로 해석할 수 있다. 최근 미국과 네덜란드의 조사에서도 본 조사와 유사한 결과가 보고된 바 있다.

본 조사에서 주목해야 할 사실은 비록 야생동물의 혈청을 적절하게 수집하기 어려운 애로점이 있는 관계로 인하여 검사 두수 자체는 작으나 야생의 한국너구리를 대상으로 응집반응을 이용한 혈청검사를 실시한 결과 21%의 양성율을 보였다는 점이다. 최근 Lindsay의 조사에 의하면 미국의 몇주를 대상으로 *N. caninum*에 대한 너구리의 혈청검사를 실시한 결과 검사 두수 99마리중 10%인 10마리가 응집반응에서 양성으로 확인되었다.

최근에 개가 *N. caninum*의 종숙주로 판명되었다. 따라서 개과동물에 속하는 한국너구리도 원충의 감염원으로 작용할 가능성이 있다고 본다. 특히 수의과학검역원의 조사에 의하면 한국너구리는 개나 소의 광견병의 주요한 전파체의 하나이다. 최근에 일부지역의 소에서 광견병의 발생이 증가하고 있다는 사실을 주목해야할 필요성이 있다. 즉 야생의 한국너구리는 야밤에 목장으로의 접근이 자유롭기 때문에 만약 한국너구리가 광견병처럼 *N. caninum*에 대한 전염원 으로서의 역할을 할 수 있다면 이는 예방 상 매우 중요한 의미를 내포하고있다고 볼 수 있다. 따라서 앞으로도 지속적으로 한국너구리와 같은 야생개과 동물에 대한 혈청검사 및 병리검사를 수행해야할 필요성이 있다고 판단된다.

유산태아를 검사할 수 있었던 180 목장의 동거가축(개, 고양이, 닭)이 사육되고 있는 경우는 36개 목장(20%)으로 조사되었고 대부분은 접촉(사료 및 음수) 할 수 있는 기회가 높은 것으로 조사되었으며, 1개 목장에서는 야생동물의 출현도 빈번한 것으로 조사되었다. 본 연구팀의 1 및 2 차 년도 연구 결과에 따라 지속적인 목장주 교육을 통해 동거가축과의 접촉을 피할 수 있게 하였음에도 불구하고 국내 목장에서는 동거가축이 높은 비율로 있었다.

또한 유조사산이 *N. caninum*으로 진단된 22개 목장 중 6개 목장(27%)에서 개를 키우거나 방견들과의 접촉이 많은 것으로 조사되었다. 특히 개와의 네오스포라 발생이 관련이 있다는 점에서 앞으로 좀 더 많은 목장 사육환경

에 대하여 주목할 것으로 사료된다.

Province	Number of dogs tested anti- <i>Neospora</i> antibody							Total(%)
	Negative			Positive				
			50	100	200	400	800	
Urban dogs	289	265	15	5	3	1	0	24(8.3)
Dogs from Dairy Farms	51	40	6	2	2	1	0	11(21.6)
Total	340	305	21	7	5	2	0	35(10.3)

Table 1. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs by IFA test

제5절 네오스포라 감염병의 치료 및 예방에 관한 연구

1. 불활화 원충의 마우스 실험

가. 재료 및 방법

- 1) 공시 원충 및 *Neospora caninum* 항원 준비 : 서울대학교 수의과대학 병리학교실에서 분양 받은 한국 분리주 KB2를 원숭이 신장 세포(vero cell)에서 5일-7일 간격으로 세포배양하여 항원으로 사용하였다. *N caninum*의 면역항원으로 사용하기 위하여 원충을 다음과 같이 불활화 처리하였다. 원충의 함량은 $3.3 \times 10^7/ml$ 으로 하였으며, 첫째, 0.4% formalin(Sigma)으로 24시간 처리하여 불활화하였고, 둘째, 0.1% saponin(Sigma)으로 24시간 처리하였으며, 셋째, 초음파 분쇄(Ultra-sonication)하여 불활화하였다.
- 2) 실험 동물로는 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받은 3주령 ICR 마우스 150마리를 사용하였으며, 물과 사료는 무제한 급여하였고 공조시설이 갖추어진 온도(약 20℃)와 습도(약 70%)가 인공적으로 조절된 마우스 전용 사육장에서 사육하면서 실험에 공시하였다.
- 3) *Neospora caninum* 항원의 동물접종 : 불활화하여 만들어진 *N caninum* 항원을 마우스에 면역 접종하여 실험하였다. 즉 Table 1에서 보는 group 1은 아무 처리를 하지 않은 live tachyzoites를 30 마리의 마우스에 마리당 1×10^5 tachyzoites를, group 2는 0.4% formalin(Sigma)으로 24시간 처리하여 불활화한 항원을 마우스 마리당 0.1ml을, group 3은 0.1% saponin(Sigma)으로 24시간 처리하여 불활화한 항원을 0.1ml씩, 그리고 group 4는 초음파 분쇄(Ultra-sonication)한 항원 0.1ml씩 면역 접종하였다.
- 4) Challenge : 면역접종을 한 4주일 후에 각각의 시험군별로 20마리씩을 공격접종하였다. 공격접종은 *N caninum* 원충을 마우스 마리당 1×10^7 개 정도의 tachyzoites를 접종하였다.
- 5) IFA 및 ELISA용 항원 제조 : *N caninum* 항원을 Vero cells에 대량 배양하여 불활화시킨 후 12 wells multi spot slide glass와 ELISA용 96 wells plate에 dir 1×10^6 개 정도의 항원을 코팅하여 IFA용과 ELISA용 항원을 제조하였다. ELISA를 위한 항원은 soluble antigen을 제조하여 코

팅하였다.

- 6) IFA (Indirect fluorescent antibody test) : ① 검사혈청을 50x2ⁿ배 단계 희석하여 준비된 항원에 적용하여 일반 간접형광항체 검사법으로 검사하였다. ② 37℃ 습상에서 1시간 반응시키고 0.05% triton X-100이 함유된 PBS(pH 7.4)로 5분씩 3회 세척하였다. ③ 슬라이드상의 습기를 완전히 제거한 후 이차항체로는 1:200으로 희석된 FITC(fluorecsein isothiocyanate) conjugated goat anti-bovine antiserum (Cappel Durham, NC, USA)을 각 well당 10 μ l씩 분주한 다음 37℃ 습상에서 역시 1시간 동안 반응시켰다. ④ 반응이 끝난 슬라이드를 PBS로 5분씩 3회 세척한 후 25% glycerol 함유 PBS로 봉입하여 형광현미경(Nikon Optiphot, Japan)으로 관찰하였다. ⑤ 양성반응은 슬라이드에 부착된 tachyzoite의 표면 전체에서 형광을 발하는 것을 기준으로 판단하였다.
- 7) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) : ① 검사동물의 혈액을 원심분리하여 혈청을 분리한 다음 PBS(pH 7.4)로 200, 400, 800 및 1,600 배 희석하여 tachyzoite의 soluble antigen이 부착된 96 wells plate에 적용시켰다. ② 37℃ Incubator에서 1시간 반응시키고 PBS(pH 7.4)로 5분씩 3회 세척하였다. ③ 96 wells plate의 습기를 완전히 제거한 후 이차항체로는 1:200으로 희석된 peroxidase conjugated goat anti-mouse antiserum (Cappel Durham, NC, USA)을 각 well당 10 μ l씩 분주한 다음 37℃ 습상에서 역시 1시간 동안 반응시켰다. ④ 반응이 끝난 96 wells plate를 PBS로 5분씩 3회 세척한 후 ELISA reader로 관찰하였다. ⑤ 이후 ELISA 법이 확립되면 ELISA법과 기존의 IFA의 일치율을 확인한 다음 ELISA에 근거하여 진단을 실시하였다.
- 8) 중화시험 : In vitro 상에서 vaccine 접종 마우스의 혈청에 의한 tachyzoite의 host cell 내로의 invasion 억제 시험으로, ① 생원충 항원, formalin 처리, saponin 처리 및 호모게나이저로 처리한 항원은 접종한 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20주 간격으로 10마리씩 chloroform으로 마취하여 복강 절개 후 복대동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하여 냉장 보관하여 -70℃ 냉동 보관된 항혈청을 이용하여 중화시험을 실시하였다.

②우선 96 wells plate에 vero cells를 세포 배양하여 계대되어 온 *N. caninum* 원충을 접종하여 24시간 인공 배양한 후 각각의 혈청을 세포배양용 MEM199 배지로 원액, x10, x20, x40, x80, x160, x320, x640, x1280, x2560, x5120 배로 희석하여 *N. caninum* 원충이 배양된 96 wells plate에 0.5ml 씩 분주하여 감작시키면서 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24시간 및 2, 3, 4, 5일 간격으로 현미경 검경하면서 원충의 생존여부를 관찰하였다. 중화시험 값은 Inhibition assay = [Infected cell at control(%) - Infected cells at serum treatment(%)]/Infected cells at control(%)

- 9) 백신에 대한 임신 동물의 방어시험 : 백신에 대한 임신 동물의 방어효능을 시험하기 위하여 암수의 마우스를 같은 수로 동거시키며 면역접종을 하여 정상적인 임신과 분만이 이루어지는가를 실험하였다.

나. 결과

- 1) *Neospora caninum* 생원충 및 불활화 원충의 마우스에서의 면역 효능평가
N. caninum 생원충 및 불활화 원충의 면역 효능을 평가하기 위하여 150마리의 마우스를 5군으로 나누어 면역접종을 하고 공격접종을 한 결과 *N. caninum* 항원 감염대조군에서 감염 2주 후부터 2마리의 마우스에서 머리가 오른쪽으로 굽고 피모가 거칠어지며 활동성이 둔해지는 증상을 보이다가 감염 18일, 24일 후에 폐사하였으며, formalin 불활화시킨 원충 감염 시험군에서 3마리, saponin 불활화시킨 원충 감염 시험군에서 5마리 그리고 sonication으로 불활화시킨 원충 감염 시험군에서 2마리의 마우스에서 *N. caninum* 항원 접종 부위에 피모가 빠지고 염증 반응을 보였다(Table 1).

Table 1. The results of immunization or infection with *Neospora caninum* tachyzoite antigens

	No of dead mice/total no of mice	No of dead mice/total no challenged	No of mice with injection site reaction /total no of mice	clinical outcome
Group 1	0/30	0/20	3/30	No
Group 2	0/30	0/20	5/30	No
Group 3	0/30	0/20	2/30	No
Group 4	0/30	0/20	-	No
Group 5	2/30	-	0/30	2 mice: head tilting , hear rough weight loss, depression

Group 2, 3, 4, and 5; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 1; control

2) Serologic titers

가) IFA : IFA 시험에서 살아있는 *N caninum* tachyzoite, formalin, saponin, ultra-sonicator로 처리한 tachyzoite를 접종한 시험군의 경우 *N caninum* 에 대한 특이 IgG 항체를 조사한 결과 접종 5, 7, 4와 4주에 각각 1:6,400, 1:3,200, 1:1,600와 1:1,600으로 나타났다(Table 2, Fig 1).

Table 2. Time course of the serum antibody response of mice experimentally infected with cultured-derived *Neospora caninum* tachyzoites and mice immunized with a killed whole *N caninum* tachyzoite preparation formulated with different methods

Group*	No of mouse	Weeks post-inoculation											
		0	1	2	3	4	5	7	9	11	13	15	
Group 1	30	Ne**	1:50	1:1,600	1:1,600	1:3,200	1:6,400	1:3,200	1:1,600	1:1,600	1:800	1:800	
Group 2	30	Ne	1:50	1:400	1:800	1:1,600	1:1,600	1:3,200	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:800	
Group 3	30	Ne	1:50	1:200	1:800	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:800	1:800	
Group 4	30	Ne	1:50	1:200	1:400	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:1,600	1:800	
Group 5	30	Ne	Ne	-	Ne	-	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	

Group* 1, 2, 3, and 4; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 5; Control, Ne** : negative

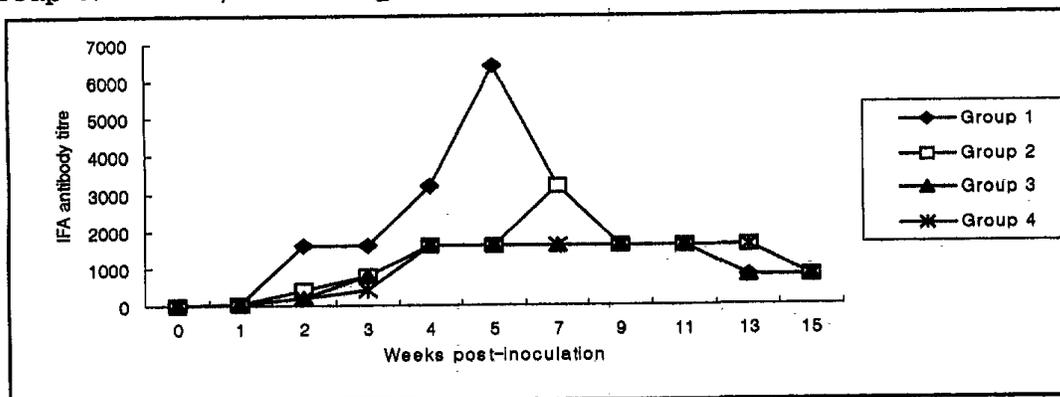


Fig 1. Time course of the serum antibody response of mice experimentally infected with cultured-derived *Neospora caninum* tachyzoites and mice immunized with a killed *N caninum* tachyzoites preparation formulated with different methods. Group 1, 2, 3, and 4; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication.

나) ELISA : ELISA 시험 결과 희석 배수 200, 400, 800과 1,600배에서 *N caninum* 항원을 접종하지 않은 시험군 5의 음성혈청내의 *N caninum* IgG 항체는 0.088에서 0.109이었으며 살아있는 *N caninum* tachyzoites, formalin, saponin, ultra-sonicator로 처리한 tachyzoite를 접종한 시험군의 경우 접종 5 또는 7주 후에 각각 0.261에서 0.329, 0.182에서 0.308, 0.130에서 0.236, 그리고 0.140와 0.244이었다(Table 3, 4, 5, 6).

Table 3. Serum IgG antibody levels in mouse sera diluted 1:200 by ELISA

	No of mouse	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)							
		1	3	5	7	9	11	13	15
Group 1	30	0.117	0.273	0.316	0.311	0.301	0.294	0.248	0.247
Group 2	30	0.118	0.205	0.285	0.308	0.308	0.247	0.207	0.134
Group 3	30	0.108	0.186	0.236	0.212	0.230	0.242	0.235	0.213
Group 4	30	0.129	0.140	0.196	0.196	0.244	0.234	0.201	0.208
Group 5	30	0.098	0.101	0.097	0.099	0.092	0.095	0.101	0.102

Group 1, 2, 3, and 4; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 5; control

Table 4. Serum IgG antibody levels in mouse sera diluted 1:400 by ELISA

	No of mouse	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)							
		1	3	5	7	9	11	13	15
Group 1	30	0.139	0.201	0.329	0.256	0.243	0.292	0.198	0.207
Group 2	30	0.101	0.152	0.185	0.226	0.237	0.179	0.134	0.129
Group 3	30	0.091	0.138	0.147	0.170	0.182	0.165	0.143	0.121
Group 4	30	0.098	0.114	0.159	0.153	0.202	0.176	0.133	0.111
Group 5	30	0.099	0.107	0.106	0.108	0.100	0.096	0.092	0.100

Group 1, 2, 3, and 4; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 5; control

Table 5. Serum IgG antibody levels in mouse sera diluted 1:800 by ELISA

	No of mouse	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)							
		1	3	5	7	9	11	13	15
Group 1	30	0.121	0.198	0.283	0.291	0.271	0.246	0.200	0.203
Group 2	30	0.101	0.126	0.190	0.204	0.258	0.206	0.165	0.121
Group 3	30	0.089	0.113	0.147	0.147	0.149	0.135	0.133	0.117
Group 4	30	0.095	0.098	0.153	0.156	0.220	0.176	0.145	0.134
Group 5	30	0.101	0.092	0.093	0.089	0.091	0.091	0.102	0.090

Group 1, 2, 3, and 4; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 5; control

Table 6. Serum IgG antibody levels in mouse sera diluted 1:1,600 by ELISA

	No of mouse	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)							
		1	3	5	7	9	11	13	15
Group 1	30	0.085	0.185	0.261	0.234	0.230	0.198	0.202	0.162
Group 2	30	0.108	0.126	0.182	0.213	0.277	0.194	0.198	0.129
Group 3	30	0.084	0.115	0.148	0.130	0.176	0.165	0.123	0.127
Group 4	30	0.094	0.093	0.170	0.182	0.236	0.175	0.135	0.116
Group 5	30	0.106	0.097	0.093	0.089	0.088	0.091	0.103	0.109

Group 1, 2, 3, and 4; mice immunized with live tachyzoite, of *N caninum* inactivated with live, 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 5; control

다) 중화시험 : *N caninum* 항원을 접종한 마우스에서 접종 1주, 3주, 5주 그리고 7주 후에 얻은 혈청을 이용하여 1:50부터 2-fold로 희석하여 *N caninum*을 90분간 반응시킨 후 vero cell에 접종하여 host cell내로의 invasion 억제율을 측정 한 결과 0.4% formalin으로 처리한 *N caninum* 항원을 접종한 마우스에서 2차 접종에 의한 boosting효과로 인하여 접종 5주 후와 7주 후의 inhibition rate가 접종 1주와 접종 3주에 비하여 급격히 증가하였으며, 0.1% saponin으로 처리한 *N caninum* 항원을 접종한 마우스에서 2차 접종에 의한 boosting효과로 인하여 접종 5주 후와 7주 후의 inhibition rate가 접종 1주와 접종 3주에 비하여 급격히 증가하였고, ultra-sonicator를 이용하여 잘게 부순 *N caninum* 항원을 접종한 마우스에서 2차 접종에 의한 boosting 효과로 인하여 접종 5주 후와 7주 후의 inhibition rate가 접종 1주와 접종 3주에 비하여 급격히 증가하였다(Fig 2, 3, 4).

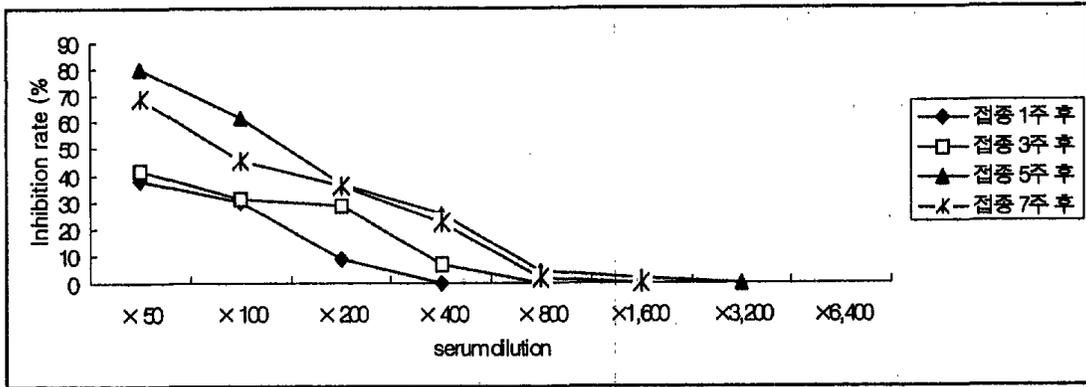


Fig 2. Inhibition effect of treatment of *N caninum* tachyzoites with sera of mice immunized with a killed *N caninum* tachyzoites treated with 0.4% formalin.

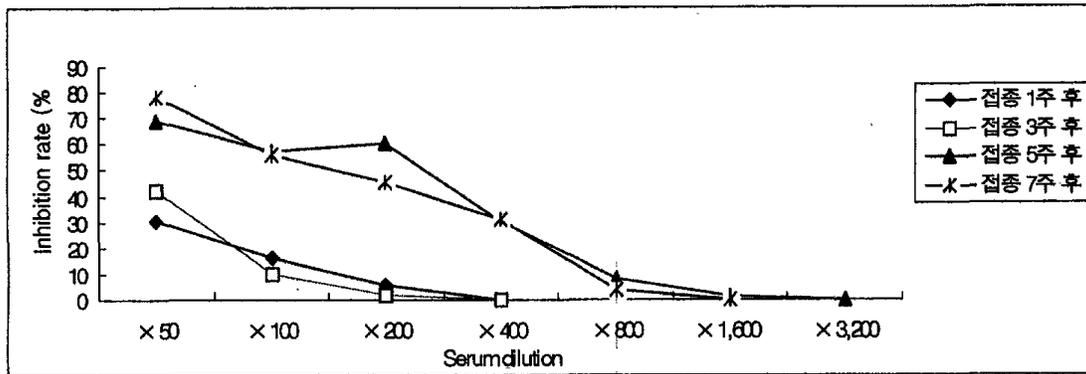


Fig 3. Inhibition effect of treatment of *N caninum* tachyzoites with sera of mice immunized with a killed *N caninum* tachyzoites treated with 0.1% saponin.

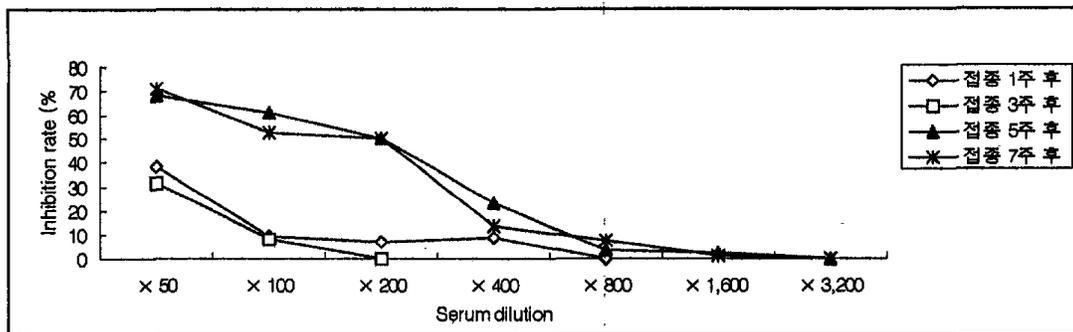


Fig 4. Inhibition effect of treatment of *N caninum* tachyzoites with sera of mice immunized with a killed and sonicated *N caninum* tachyzoites .

라) 임신 동물의 방어시험

임신 동물에 *N. caninum*의 각종 항원으로 면역접종을 한 후에 방어효능을 알아보기 위하여 실험한 결과 임신상태의 유지 및 분만 등을 효율적으로 관리하지 못하여 성공적으로 실험을 마칠 수가 없었다.

다. 결론 및 고찰

*N. caninum*은 1988년 이후에 알려진 원충성 질병의 병인체로써 소와 개에서 유사산을 주요 증상으로 하는 질병을 야기 시킨다. 국내에서도 젓소 유사산의 약 20% 정도가 이 질병으로 진단되었다. 이러한 질병의 예방법을 찾기 위하여 생원충 및 불활화 원충의 면역 효능을 평가 한 결과 *N. caninum* 항원 감염대조군에서 감염 2주 후부터 2마리의 마우스에서 머리가 오른쪽으로 굽고 피모가 거칠어지며 활동성이 둔해지는 증상을 보이다가 감염 18일, 24일 후에 폐사하였으며, formalin 불활화시킨 원충 감염 시험군에서 3마리, saponin 불활화시킨 원충 감염 시험군에서 5마리 그리고 sonication으로 불활화시킨 원충 감염 시험군에서 2마리의 마우스에서 *N. caninum* 항원 접종 부위에 피모가 빠지고 염증 반응을 보였다. Nishikawa 등은 Neosporosis 백신의 개발에 의하여 전파, 감염, 질병의 진행을 경감시킬 수 있다고 보고하였다.

IFA 시험에서 살아있는 *N. caninum* tachyzoite, formalin, saponin, ultra-sonicator로 처리한 tachyzoite를 접종한 시험군의 경우 *N. caninum*에 대한 특이 IgG 항체가를 조사한 결과 접종 5, 7, 4와 4주에 각각 1:6,400, 1:3,200, 1:1,600와 1:1,600으로 나타났다. 또한 ELISA 시험 결과 희석 배수 200, 400, 800과 1,600배에서 *N. caninum* 항원을 접종하지 않은 시험군 5의 음성혈청내의 *N. caninum* IgG 항체가는 0.088에서 0.109이었으며 살아있는 *N. caninum* tachyzoites, formalin, saponin, ultra-sonicator로 처리한 tachyzoite를 접종한 시험군의 경우 접종 5 또는 7주 후에 각각 0.261에서 0.329, 0.182에서 0.308, 0.130에서 0.236, 그리고 0.140와 0.244이었다. 그리고 *N. caninum* 항원을 접종한 마우스에서 접종 1주, 3주, 5주 그리고 7주 후에 얻은 혈청을 이용하여 1:50부터 2-fold로 희석하여 *N. caninum*을 90분간 반응시킨 후 vero cell에 접종하여 host cell내로의 invasion 억제율을 측정한 결과 0.4%

formalin으로 처리한 *N. caninum* 항원을 접종한 마우스에서 2차 접종에 의한 boosting효과로 인하여 접종 5주 후와 7주 후의 inhibition rate가 접종 1주와 접종 3주에 비하여 급격히 증가하였으며, 0.1% saponin으로 처리한 *N. caninum* 항원을 접종한 마우스에서 2차 접종에 의한 boosting효과로 인하여 접종 5주 후와 7주 후의 inhibition rate가 접종 1주와 접종 3주에 비하여 급격히 증가하였고, ultra-sonicator를 이용하여 잘게 부순 *N. caninum* 항원을 접종한 마우스에서 2차 접종에 의한 boosting 효과로 인하여 접종 5주 후와 7주 후의 inhibition rate가 접종 1주와 접종 3주에 비하여 급격히 증가하였다. 이는 Choromanski and Block이 불활화 *Neospora vaccines*을 접종하여 IFA 검사에서 접종 전 40-160의 혈청 항체가가 접종 2주일 후 80-5,120으로 그리고 재 접종을 하고 2주일 후 320-40,960의 항체가가 형성됨을 얻은 결과와 유사한 범주에 속함을 볼 수가 있다. 또한 Andrianarivo 등은 adjuvants을 달린 killed whole tachyzoite preparation로 소에 면역접종을 한 결과 Havlogen, Polygen, Havlogen과 Bay R-1005, 그리고 Montanide ISA 773 등 adjuvants를 사용한 면역접종군의 IFA 항체가가 현저하게 높아짐을 보고하였다.

그리고 임신 동물에서 성공적으로 실험을 마칠 수가 없었지만, Liddell 등은 *Neospora caninum* tachyzoites의 crude lysate 항원으로 마우스를 면역시켜 새끼 마우스에서 완전하게 방어함을 보고하였다.

이상의 결과로 미루어 *Neospora caninum*의 불활화 백신은 마우스에서 방어에 필요한 혈청 항체가를 형성함을 알 수가 있었다.

2. 불활화 원충의 산양 및 소 야외적용시험

가. 재료 및 방법

- 1) 불활화 항원을 접종한 산양 및 소의 혈청 항체가 조사 : 마우스에서와 같은 방법으로 제조된 항원을 30마리의 재래 산양과 90마리의 젓소에 마리당 0.5ml과 1.0ml을 면역 접종한 후 채혈하여 ELISA와 중화시험을 이용하여 ELISA 항체와 중화시험 항체를 검사하였다. 또한 90마리의 젓소를 대상으로 반복 실험을 하였다.
- 2) IFA와 ELISA : 마우스 실험에서와 동일한 방법으로 실시하였다.
- 3) 중화시험 : 마우스 실험에서와 동일한 방법으로 실시하였다.

나. 결과

1) 산양에서의 *Neospora caninum* tachyzoites 불활화 항원의 면역원성

가) IFA : 산양에서 사독화 백신의 적용성을 조사하기 위해 각각 8 마리의 산양에 각각 ml당 1×10^7 의 원충을 0.4% formalin으로 24시간 처리한 항원과 0.1% saponin으로 24시간 처리하고, 그리고 ultra-sonication 처리하여 사멸시킨 항원을 접종하고 3주 후 다시 재접종한 후 IFA를 실시한 결과 각각 접종 1주, 3주, 5주, 7주 및 9주 후에 1:50, 1:200, 1:800, 1:800, 및 1:400와 1:50, 1:200, 1:1,600, 1:800 및 1:400로 나타났다. 그리고 6 마리의 산양은 음성대조군으로 사용하여 IFA를 실시한 결과 음성 대조군은 항체가 형성되지 않았다(Table 1).

Table 1. Serum antibody titers of Korean native goats immunized with a killed whole *N. caninum* tachyzoite preparation formulated with different methods

Group*	No of mous e	Weeks post-inoculation							
		0	1	3	5	7	9	12	16
Group 1	8	-ve	1:50	1:200	1:800	1:800	1:400	1:400	1:400
Group 2	8	-ve	1:50	1:200	1:1,600	1:800	1:400	1:400	1:400
Group 3	8	-ve	1:50	1:200	1:1,600	1:800	1:400	1:400	1:400
Group 4	6	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N. caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

나) ELISA : ELISA 시험 결과 희석 배수 100, 200과 400배에서 *N caninum* 항원을 접종하지 않은 시험군의 음성혈청내의 *N caninum* IgG 항체는 0.095에서 0.099이었으며 formalin, saponin, ultra-sonicator로 처리한 tachyzoite를 접종한 시험군의 경우 접종 5 또는 7주 후에 각각 0.327에서 0.301, 0.283에서 0.301, 0.234에서 0.242이었다(Table 2, 3, 4).

Table 2. Serum IgG antibody levels in Korean native goats sera diluted 1:100 by ELISA

	No of mou se	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)						
		1	3	5	7	9	12	16
Group 1	8	0.135	0.263	0.327	0.301	0.291	0.291	0.243
Group 2	8	0.113	0.225	0.283	0.301	0.298	0.242	0.137
Group 3	8	0.103	0.196	0.234	0.242	0.238	0.241	0.212
Group 4	6	0.099	0.102	0.095	0.099	0.092	0.095	0.102

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

Table 3. Serum IgG antibody levels in Korean native goats sera diluted 1:200 by ELISA

	No of mouse	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)						
		1	3	5	7	9	12	16
Group 1	8	0.118	0.211	0.302	0.293	0.276	0.295	0.203
Group 2	8	0.111	0.154	0.189	0.229	0.255	0.208	0.127
Group 3	8	0.097	0.141	0.145	0.173	0.181	0.168	0.125
Group 4	6	0.097	0.105	0.103	0.111	0.102	0.099	0.101

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

Table 4. Serum IgG antibody levels in Korean native goats sera diluted 1:400 by ELISA

	No of mouse	Absorbance per post-inoculation days(Weeks)						
		1	3	5	7	9	12	16
Group 1	8	0.112	0.197	0.287	0.254	0.242	0.249	0.207
Group 2	8	0.103	0.124	0.193	0.207	0.236	0.177	0.129
Group 3	8	0.087	0.112	0.144	0.144	0.146	0.137	0.114
Group 4	6	0.103	0.093	0.095	0.087	0.094	0.092	0.087

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

다) 중화시험 : 각각의 면역접종 군별로 4개의 혈청을 선별하여 중화시험 결과 항원접종 4, 8 그리고 12주일 후에는 회석 배수 5배에서 65-71%, 67-72%, 그리고 49-55%의 원충 중화효과를 가져왔으며, 10배에서 45-51%, 43-52%, 그리고 31-37%의 원충 중화를 가져왔다. 20배 이상의 회석배수에서는 급격히 줄어 80배 회석배수에서는 원충이 거의 중화되지 않았다(Table 5, 6, 7).

Table 5. Serum neutralization titers (Average reduction rate of tachyzoites) in Korean native goat sera at 4 weeks after infection with *Neospora caninum* tachyzoites.

Group	No of sera	Result (%)							
		x5	x10	x20	x40	x80	x160	x320	x640
Group 1	4	65	47	21	11	5	0	0	1
Group 2	4	68	51	17	12	4	0	3	0
Group 3	4	71	46	23	15	2	2	0	3
Group 4	4	0	0	0	0	0	0	0	0

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N. caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

Table 6. Serum neutralization titers (Average reduction rate of tachyzoites) in Korean native goat sera at 8 weeks after infection with *Neospora caninum* tachyzoites.

Group	No of sera	Result (%)							
		x5	x10	x20	x40	x80	x160	x320	x640
Group 1	4	72	43	19	10	1	0	1	0
Group 2	4	67	52	15	8	0	2	0	0
Group 3	4	69	49	17	11	3	0	2	0
Group 4	4	0	0	0	0	0	0	0	0

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

Table 7. Serum neutralization titers (Average reduction rate of tachyzoites) in Korean native goat sera at 12 weeks after infection with *Neospora caninum* tachyzoites.

Group	No of sera	Result (%)							
		x5	x10	x20	x40	x80	x160	x320	x640
Group 1	4	55	33	12	7	2	0	2	0
Group 2	4	52	31	15	10	4	0	1	0
Group 3	4	49	37	13	9	3	0	2	0
Group 4	4	0	0	0	0	0	0	0	0

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

2) 소에서의 *Neospora caninum* tachyzoites 불활화 항원의 면역원성

가) 한우에서의 *Neospora caninum* tachyzoites 불활화 항원의 면역원성

100배 희석 배수에서는 접종 후 1, 2, 3, 4, 5주 사이에 대조군 0.177-0.254에 비하여 formalin 처리군이 0.229-0.515였으며, saponin 처리군은 0.307-0.471이었다. Ultra-sonication 처리군은 0.238-0.461로 높았다. 그러나 일관성 있는 성적을 얻지는 못하였다(Table 8).

Group	No of Cattle	ELISA(1:100, 490nm)				
		1	2	3	4	5
1	8	0.352+0.089	0.515+0.164	0.229+0.013	0.257+0.006	0.270+0.048
2	8	ND	0.307+0.037	0.386+0.030	0.411+0.018	0.471+0.012
3	8	0.298+0.028	0.238+0.045	0.350+0.015	0.273+0.040	0.461+0.092
4	6	0.233+0.045	0.191+0.039	0.177+0.019	0.254+0.084	0.193+0.012

Table 8. Serum IgG antibody levels in Korean cattle sera diluted 1:100 by ELISA.

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

200배 희석 배수에서는 접종 후 1, 2, 3, 4, 5주 사이에 대조군 0.156-0.211에 비하여 formalin 처리군이 0.182-0.368였으며, saponin 처리군은 0.250-0.374이었다. Ultra-sonication 처리군은 0.240-0.391로 높았다. 그러나 일관성 있는 성적을 얻지는 못하였다(Table 9).

Group	No of Cattle	ELISA(1:200, 490nm)				
		1	2	3	4	5
1	8	0.247+0.030	0.368+0.115	0.182+0.017	0.208+0.009	0.210+0.030
2	8	ND	0.250+0.027	0.331+0.007	0.347+0.031	0.374+0.040
3	8	0.242+0.022	0.240+0.046	0.255+0.048	0.249+0.043	0.391+0.072
4	6	0.211+0.034	0.184+0.015	0.156+0.031	0.201+0.045	0.174+0.035

Table 9. Serum IgG antibody levels in Korean cattle sera diluted 1:200 by

ELISA.

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N. caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

400배 희석 배수에서는 접종 후 1, 2, 3, 4, 5주 사이에 대조군 0.137-0.182에 비하여 formalin 처리군이 0.147-0.289였으며, saponin 처리군은 0.191-0.337이었다. Ultra-sonication 처리군은 0.170-0.231로 높았다. 그러나 일관성 있는 성적을 얻지는 못하였다(Table 10).

Group	No of Cattle	ELISA(1:400, 490nm)				
		1	2	3	4	5
1	8	0.185+0.025	0.289+0.080	0.147+0.010	0.174+0.013	0.179+0.025
2	8		0.191+0.045	0.262+0.045	0.248+0.026	0.337+0.015
3	8	0.187+0.033	0.209+0.041	0.231+0.027	0.170+0.010	0.287+0.072
4	6	0.182+0.007	0.181+0.026	0.137+0.037	0.161+0.19	0.164+0.024

Table 10. Serum IgG antibody levels in Korean cattle sera diluted 1:400 by ELISA.

Group* 1, 2, and 3; mice immunized with *N. caninum* tachyzoites inactivated 0.4% formalin, 0.1% saponin, and ultra-sonication, Group 4; control, -ve** : negative

나) ELISA : 젖소에서 사독화 백신의 적용성을 조사하기 위해 각각 30 마리의 젖소에 각각의 항원을 접종한 후 ELISA를 실시한 결과 각각 접종 0주, 4주 및 8주 후에 100배 희석농도에서 0.138-0.156에서 0.225-0.255와 0.239-0.260으로 각각 증가하였다. 200배 희석농도에서는 0.159-0.165, 0.200-0.209 그리고 0.186-0.222로 나타났다. 400배 희석농도에서는 0.121-0.131, 0.143-0.146 그리고 0.157-0.192로 나타났다(Table 11, 12, 13).

Table 11. Serum IgG antibody levels in dairy cow sera diluted 1:100 by ELISA.

Group	No of cow	ELISA(1:100, 490nm)			Rate of increase	
		0 week	4 week	8 week	4wk/0wk	8wk/0wk
1	30	0.156±0.024	0.225±0.041	0.260±0.036	1.46±0.31	1.68±0.35
2	30	0.138±0.028	0.255±0.046	0.257±0.043	1.93±0.58	1.93±0.55
3	30	0.147±0.020	0.228±0.030	0.239±0.036	1.58±0.33	1.66±0.40

Group 1, 2 and 3; cattle immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated with 0.4% formalin, 0.1% saponin and ultra sonination

Table 12. Serum IgG antibody levels in dairy cow sera diluted 1:200 by ELISA.

Group	No of cow	ELISA(1:200, 490nm)			Rate of increase	
		0 week	4 week	8 week	4wk/0wk	8wk/0wk
1	30	0.164±0.03 0	0.209±0.050	0.222±0.052	1.28±0.21	1.42±0.42
2	30	0.165±0.03 5	0.209±0.042	0.222±0.048	1.28±0.34	1.33±0.37
3	30	0.159±0.01 7	0.200±0.028	0.186±0.043	1.26±0.16	1.19±0.31

Group 1, 2 and 3; cattle immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated with 0.4% formalin, 0.1% saponin and ultra sonination

Table 13. Serum IgG antibody levels in dairy cow sera diluted 1:400 by ELISA.

Group	No of cow	ELISA(1:400, 490nm)			Rate of increase	
		0 week	4 week	8 week	4wk/0wk	8wk/0wk
F	30	0.121±0.018	0.143±0.030	0.179±0.044	1.17±0.17	1.51±0.54
S	30	0.131±0.030	0.145±0.033	0.192±0.044	1.13±0.23	1.57±0.57
H	30	0.124±0.026	0.146±0.026	0.157±0.024	1.20±0.20	1.36±0.51

Group 1, 2 and 3; cattle immunized with *N caninum* tachyzoites inactivated with 0.4% formalin, 0.1% saponin and ultra sonination

다. 결론 및 고찰

산양에서 *Neospora caninum* 사독화 백신의 효능을 평가한 결과 IFA에서 접종 1주 후에서 9주 후까지 50 - 1,600 항체가를 보였다. ELISA 시험 결과 희석 배수 100, 200과 400배에서 *N. caninum* 항원을 접종하지 않은 시험군의 음성혈청내의 *N. caninum* IgG 항체가는 0.095에서 0.099이었으며 formalin, saponin, ultra-sonicator로 처리한 tachyzoite를 접종한 시험군의 경우 접종 5 또는 7주 후에 각각 0.327에서 0.301, 0.283에서 0.301, 0.234에서 0.242이었다. 그리고 중화시험 결과 항원접종 4, 8 그리고 12주일 후에는 희석 배수 5배에서 65-71%, 67-72%, 그리고 49-55%의 원충 중화효과를 가져왔으며, 10배에서 45-51%, 43-52%, 그리고 31-37%의 원충 중화를 가져왔다. 20배 이상의 희석배수에서는 급격히 줄어 80배 희석배수에서는 원충이 거의 중화되지 않았다. 한우에서 항원을 접종한 후 ELISA로 혈청검사를 한 결과 100배, 200배 및 400배 희석 배수에서는 접종 후 1에서 5주 사이에 대조군 0.177-0.254, 0.156-0.211, 0.137-0.182에 비하여 formalin 처리군이 0.229-0.515, 0.182-0.368, 0.147-0.289였으며, saponin 처리군은 0.307-0.471, 0.250-0.374, 0.191-0.337이었다. Ultra-sonication 처리군은 0.238-0.461, 0.240-0.391, 0.170-0.231로 높았다. 그러나 일관성 있는 성적을 얻지는 못하였다. 젖소에서는 각각의 항원을 접종한 후 ELISA를 실시한 결과 각각 접종 0주, 4주 및 8주 후에 100배 희석농도에서 0.138-0.156에서 0.225-0.255와 0.239-0.260으로 각각 증가하였다. 100배 희석농도에서 0.138-0.156에서 0.225-0.255와 0.239-0.260으로 각각 증가하였다. 200배 희석농도에서는 0.159-0.165, 0.200-0.209 그리고 0.186-0.222로 나타났다. 400배 희석농도에서는 0.121-0.131, 0.143-0.146 그리고 0.157-0.192로 나타났다. Maley 등(2001)은 IFA (Indirect Fluorescent Antibody test)와 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법을 이용하여 1년간 실험적으로 *Neospora caninum*이 감염된 송아지의 혈청을 검사한 결과나, Choromanski and Block은 불활화 *Neospora vaccines*를 접종하여 접종 전 40-160의 혈청 항체가가 접종 2주일 후 80-5,120으로 그리고 재 접종을 하고 2주일 후 320-40,960의 항체가가 형성됨을 보고한 내용과 유사함을 나타내었다. 또한 Liddell 등은 *Neospora caninum* tachyzoites의 crude lysate 항원으로 마우스를 면역시켜

새끼 마우스에서 완전하게 방어함을 보고하였다. Andrianarivo 등은 adjuvants을 달리한 killed whole tachyzoite preparation로 소에 면역접종을 한 결과 Havlogen, Polygen, Havlogen과 Bay R-1005, 그리고 Montanide ISA 773 등 adjuvants를 사용한 면역접종군의 IFA 항체가가 현저하게 높아졌다고 보고하였다. 또한 본 연구에서 임신동물에 대한 방어효능 시험을 성공적으로 이루어지지 않았지만 Nishikawa 등은 Neosporosis 백신의 개발에 의하여 전파, 감염, 질병의 진행을 경감시킬 수 있다고 하는 보고 등과 IFA 및 ELISA 등의 성적으로 미루어 어느 정도는 방어 효과를 보일 수 있을 것으로 추정된다.

소에서의 중화시험은 현재 진행 중으로 조만간 좋은 결과가 나올 것으로 기대된다.

3. 면역 억제 마우스에서 급성 네오스포라증 (Neosporosis)에 대한 몇 가지 생약제제의 감수성 분석 : artemisinin in vitro 및 한약제 in vivo 실험

가. 재료 및 방법

- 1) 공시 원충 및 *Neospora caninum* 항원 준비 : 서울대학교 수의과대학 병리학교실에서 분양 받은 한국 분리주 KB2를 원숭이 신장 세포(vero cell)에서 5일-7일 간격으로 세포배양하여 항원으로 사용하였다.
- 2) 실험 동물로는 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받은 3주령 ICR 마우스 150마리를 사용하였으며, 물과 사료는 무제한 급여하였고 공조시설이 갖추어진 온도와 습도가 인공적으로 조절된 마우스 전용 사육장에서 사육하면서 실험에 공시하였다.
- 3) 생약 제제는 Youn and Noh(2001)의 보고와 같이 닭 맹장 콕시듐병에 어느 정도 효능을 보인 *Sophora(S) flavescens*(고삼), *Sinomenium(S) acutum*(방기), *Ulmus(U) macrocarpa*(무이), *Torilis(T) japonica*(사상자) 등을 사용하였다. 이들 약제의 사용은 약탕기에 물 1000ml을 넣고 각각의 약제를 30gm 씩 넣어 약 3시간 가량 증탕하여 잔량의 약물이 500ml 정도 되게 한 다음 마우스에 각각 자유롭게 먹을 수 있도록 공급하였다.
- 4) 실험 설계 : 1단계 약제의 효능을 screening하기 위하여 상기의 약제를 물에 달여서 마우스에 음수 대신으로 공급하면서 실험에 공시하였다.
- 5) 실험 약제의 효능 평가 : 약물의 공급과 동시에 *N caninum* 원충을 인공 감염시켜 폐사, 임상증상, 뇌의 병변 등을 관찰하여 약제의 효능을 평가하였다.
- 6) 뇌병변도 분석(Brain tissue lesion analysis)은 Lindsay 등(1995)의 방법에 따라 1) 병변 수, 병변 없음= 1, 1-5개= 2, 6-10개= 3, >11개= 4, 2) 병변 평균 크기, 병변 없음= 1, $\leq 300\mu\text{m}$ = 2, $300-600\mu\text{m}$ = 3, $>600\mu\text{m}$ = 4, 그리고 3) 병변 정도, 병변 없음= 1, slight= 2, mild= 3, moderate= 4, marked= 5의 등급으로 나누어 평가하였다.

나. 결과

- 1) 생존율 및 임상증상 : 면역 억제 마우스에서 급성 *Neospora* 감염에 대한 *S flavescens*(고삼), *S acutum*(방기), *U macrocarpa*(무이), *T japonica*(사상자)의 감수성은 생존율, 평균 생존일 수, 생존 마우스의 상태, 뇌 병변도를 조사하여 분석하여 감염-무투약군의 5마리 중 4마리의 마우스가 원충 접종 후 12-14 일경부터 피모가 거칠어지고 운동성이 둔화되고 침울, 균으로부터 이탈, 혼수 상태 등의 증상을 보이다 18-32일 사이에 폐사하였으며(생존율 = 20%) 1마리가 실험 종료일까지 생존하였으나 폐사한 마우스와 동일한 임상증상을 보였다. 반면, *S flavescens*(고삼), *S acutum*(방기), *U macrocarpa*(무이), *T japonica*(사상자)를 투약한 군은 각각 40%, 75%, 75% 및 60%의 생존율을 보였으며 약제 투약군의 폐사한 마우스 역시 12 일경부터 피모가 거칠어지고 운동성이 둔화되고 침울, 균으로부터 이탈, 혼수 상태 등의 증상을 나타내다 17~32일 사이에 폐사하였다. 생존율에서 *S acutum*(방기) 및 *U macrocarpa*(무이) 투약군이 감염-무투약 대조군에 비하여 매우 높았으며 폐사한 마우스도 *U macrocarpa*(무이, 평균 생존일=원충 접종 후 32.0일) 및 *S acutum*(방기, 평균 생존일=원충 접종 후 25.0일) 투약군이 감염 대조군(평균 생존일=원충 접종 후 22.5일) 및 다른 투약군에 비하여 오랫동안 생존하였다. 또한 시험 종료일까지 생존한 마우스 중 *U macrocarpa*(무이) 및 *S acutum*(방기) 투약군이 감염 대조군 및 다른 투약군의 생존 마우스보다 건강하였으며 뇌 병변에서도 낮은 병변도를 보였다(Table 1).

Table 9. Effects of treatment with herb extracts in drinking water in mice infected *Neospora caninum*

Groups	No of mice	No. died	Day of death (day after challenge)	Survival rates(%)	Health degrees of survival mice**
<i>S flavescens</i>	5	3	17,18,19 (18*)	40	+/-
<i>S acutum</i>	4	1	25 (25)	75	++
<i>U macrocarpa</i>	4	1	32 (32)	75	++
<i>T japonica</i>	5	2	17,27 (22)	60	+
NIC	5	4	18,19,21,32 (22.5)	20	-
NNC	4	0	-	100	+++

* Mean day of death, ** Health degrees of survival mice were examined by rough hair, depression and activity, +++, not rough hair and normal activity; ++, rough hair and slight depression; +, rough hair and moderate depression; -, rough hair severe depression

실험 마우스의 뇌를 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 H&E 염색을 하고 병변을 관찰한, 결과 폐사한 마우스의 대뇌 회백질과 소뇌의 회백질 및 드물게는 뇌 줄기에 비화농성 괴사소가 관찰되었으며 해면화된 병소도 다수 관찰되었다. 감염 대조군 및 약제 투약군에서 폐사한 마우스에서 괴사부 주변의 신경 세포 세포질 내에 집락을 형성하고 있는 원충을 확인 할 수 있었으나 무감염 대조군의 마우스는 임상증상을 보이지 않았으며 뇌에서 아무런 병변을 관찰할 수 없었다(뇌 병변도 = 3). 감염 대조군의 폐사한 마우스의 평균 뇌 병변도는 8.03으로 실험군중 가장 심한 병변을 나타내었고 실험 종료일까지 생존한 마우스의 뇌에서도 중증도에서 심한 정도의 병변이 관찰되었다. *U macrocarpa*(무이)을 투약한 마우스 중 폐사한 2마리의 평균 뇌 병변도는 5.00으로 모든 실험군 중 가장 낮은 병변도를 보였으며 *S acutum*(방기)을 투약한 마우스 중 폐사한 2마리의 평균 뇌 병변도는 5.25로 *U macrocarpa*(무이) 투약군보다는 높으나 낮은 병변도를 보였다. 반면 *S flavescens*(고삼)을 투약한 마우스 중 폐사한 3마리의 평균 뇌 병변도는 6.04, *T japonica*(사상자)을 투약한 마우스 중 폐사한 3마리의 마우스의 평균 뇌 병변도는 5.88로

S acutum(방기) 투약군 또는 *U macrocarpa*(무이) 투약군보다는 높으나, 감염 대조군보다는 낮은 병변도를 나타내었다. 뇌 병변도에서도 *U macrocarpa*(무이) 투약군과 *S acutum*(방기) 투약군이 감염 대조군에 비하여 상대적으로 낮은 수치를 나타내었다(Table 2, Fig 1).

Table 2. The results of brain lesion scores of mice from all groups.

Groups	<i>S flavescens</i>	<i>S acutum</i>	<i>U macrocarpa</i>	<i>T japonica</i>	NIC	NNC
Brain lesion scores (mean ± SD)	6.04 ± 2.82	5.25 ± 2.60	5.00 ± 2.31	5.88 ± 2.96	8.03 ± 1.52	3.00 ± 0.00

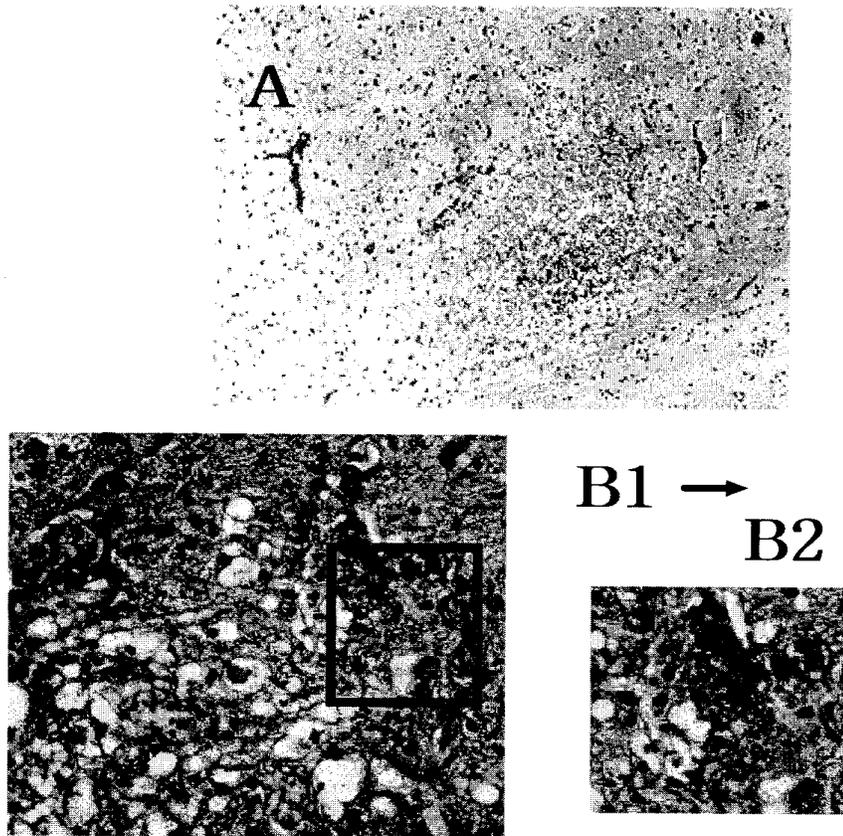


Fig. 1. A. Brain of mouse infected with *N caninum* showing focal nonsuppurative necrotizing encephalitis. H & E, ×200. B1 and 2. Note cluster of *N caninum* within necrotizing lesion of brain, H & E, ×200, ×400.

S acutum(방기) 투약군 또는 *U macrocarpa*(무이) 투약군보다는 높으나 감염 대조군보다는 낮은 병변도를 나타내었다. 뇌 병변도에서도 *U macrocarpa*(무이) 투약군과 *S acutum*(방기) 투약군이 감염 대조군에 비하여 상대적으로 낮은 수치를 나타내었다(Table 2, Fig 1).

Table 2. The results of brain lesion scores of mice from all groups.

Groups	<i>S flavescens</i>	<i>S acutum</i>	<i>U macrocarpa</i>	<i>T japonica</i>	NIC	NNC
Brain lesion scores (mean±SD)	6.04±2.82	5.25±2.60	5.00±2.31	5.88±2.96	8.03±1.52	3.00±0.00

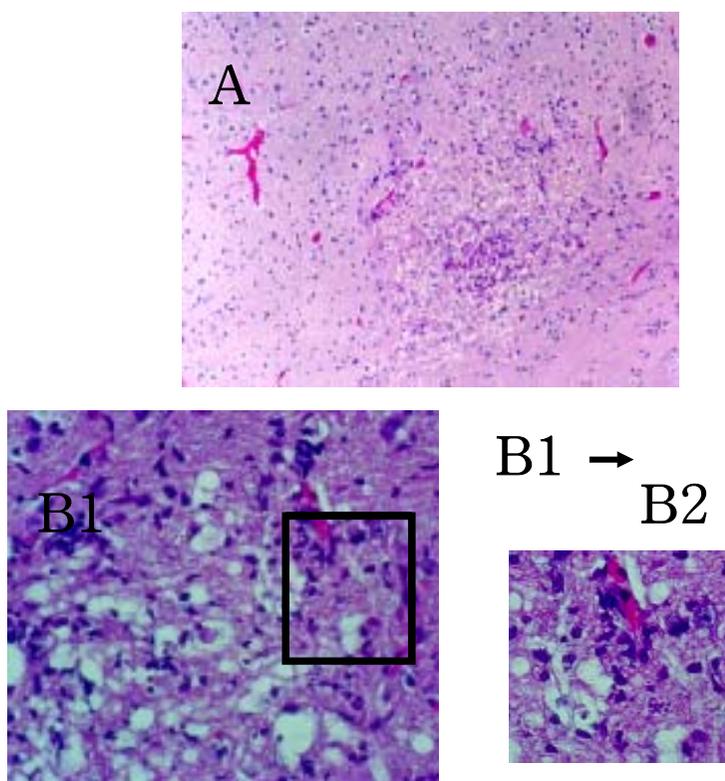


Fig. 1. **A.** Brain of mouse infected with *N caninum* showing focal nonsuppurative necrotizing encephalitis. H & E, ×200. **B1 and 2.** Note cluster of *N caninum* within necrotizing lesion of brain, H & E, ×200, ×400.

다. 결론 및 고찰

면역 억제 마우스에서 급성 *Neospora caninum* 감염에 대하여 Youn and Noh 등의 보고에서와 같이 닭 맹장콕시듦증에 효능이 있는 것으로 보고된 *S flavescens*(고삼), *S acutum*(방기), *U macrocarpa*(무이), *T japonica*(사상자)의 감수성은 생존율, 평균 생존일 수, 마우스의 상태, 뇌 병변도를 조사하여 분석하여 감염-무투약군의 5마리 중 4마리의 마우스가 원충 접종 후 12-14 일경부터 피모가 거칠어지고 운동성이 둔화되고 침울, 균으로부터 이탈, 혼수 상태 등의 증상을 보이다 18-32일 사이에 폐사하였으며(생존율 = 20%) 1마리가 실험 종료일까지 생존하였으나 폐사한 마우스와 동일한 임상 증상을 보였다. 반면, 고삼, 방기, 무이, 및 사상자를 투약한 군은 각각 40%, 75%, 75% 및 60%의 생존율을 보였으며 약제 투약군의 폐사한 마우스 역시 12 일경부터 피모가 거칠어지고 운동성이 둔화되고 침울, 균으로부터 이탈, 혼수 상태 등의 증상을 나타내다 17~32일 사이에 폐사하였다. 생존율에서 방기 및 무이 투약군이 감염-무투약 대조군에 비하여 매우 높았으며 폐사한 마우스도 무이(평균 생존일=원충 접종 후 32.0일) 및 방기(평균 생존일=원충 접종 후 25.0일) 투약군이 감염 대조군(평균 생존일=원충 접종 후 22.5일) 및 다른 투약군에 비하여 오랫동안 생존하였다. 또한 시험 종료일까지 생존한 마우스 중 무이 및 방기 투약군이 감염 대조군 및 다른 투약군의 생존 마우스보다 건강하였으며 뇌 병변에서도 낮은 병변도를 보였다. 즉 실험 마우스의 뇌를 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 H&E 염색을 하고 병변을 관찰한, 결과 폐사한 마우스의 대뇌 회백질과 소뇌의 회백질 및 드물게는 뇌 줄기에 비화농성 피사소가 관찰되었으며 해면화된 병소도 다수 관찰되었다. 감염 대조군 및 약제 투약군에서 폐사한 마우스에서 피사부 주변의 신경 세포 세포질 내에 집락을 형성하고 있는 원충을 확인 할 수 있었으나 무감염 대조군의 마우스는 임상증상을 보이지 않았으며 뇌에서 아무런 병변을 관찰할 수 없었다. 감염 대조군의 폐사한 마우스의 평균 뇌 병변도는 8.03으로 실험군중 가장 심한 병변을 나타내었고 실험 종료일까지 생존한 마우스의 뇌에서도 중증도에서 심한 정도의 병변이 관찰되었다. 무이를 투약한 마우스 중 폐사한 2마리의 평균 뇌 병변도는 5.00으로 모든 실험군 중 가장 낮은 병변도를 보였으며 방기를 투약한 마우스 중 폐사한 2마리의 평균 뇌 병변도는 5.25로 무

이 투약군보다는 높으나 낮은 병변도를 보였다. 반면 고삼을 투약한 마우스 중 폐사한 3마리의 평균 뇌 병변도는 6.04, 사상자를 투약한 마우스 중 폐사한 3마리의 마우스의 평균 뇌 병변도는 5.88로 방기 투약군 또는 무이 투약군보다는 높으나 감염 대조군보다는 낮은 병변도를 나타내었다. 뇌 병변도에 서도 무이 투약군과 방기 투약군이 감염 대조군에 비하여 상대적으로 낮은 수치를 나타내었다.

4. 배양세포에서 *Neospora caninum* 원충에 대한 몇 가지 생약제제의 감수성 검사

가. 재료 및 방법

- 1) Parasites : *N caninum* 항원은 미국 미주리 주립대학교 수의과대학에서 계대 배양중인 미국 분리주를 equine dermal(ED) cells에서 5일-7일 간격으로 계속 계대 배양하면서 항원으로 사용하였다.
- 2) ED cells : *N caninum*을 계대 배양하는데 ED cells을 이용하였다.
- 3) 생약 제제는 Youn and Noh(2001)의 보고와 같이 닭 맹장 콕시듐병에 어느 정도 효능을 보인 *Sophora(S) flavescens*(고삼), *Sinomenium(S) acutum*(방기), *Ulmus(U) macrocarpa*(무이), *Pulsatilla(P) koreana*(백두옹), *Torilis(T) japonica*(사상자) 등을 사용하였다. 이들 약제의 사용은 약탕기에서 80% EtOH 200ml를 넣고 75℃에서 3시간 동안 중탕하여 동결건조기로 건조하였다. 이 건조물을 미국으로 DHL 수송하여 미국 미주리 주립대학교 수의과대학에서 실험에 공시하였다. 시험에 공시할 때는 이 건조 추출물을 10ml의 80% EtOH에 용해시켜 원액으로 사용하였다.
- 4) Isotope : *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis* spp 등 원충은 Dr Marsh 등(2001)의 보고와 같이 그들이 대사과정에 방사성 동위원소인 ³H를 이용하는 경향이 있어 이를 이용하여 실험을 하였다. 이 방사성 동위원소의 역가 측정은 MicroBeta를 이용하여 측정하였다.
- 5) 실험 설계 : Equine dermal (American Type Culture Collection, Rockville, MD; ED cells)을 10% fetal bovine serum, 100 U penicillin G/ml, 그리고 100mg streptomycin/ml를 첨가한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)으로 96 well 조직 배양용 micro-plate에 well 당 5x10⁴개의 세포가 들어가도록 하여 5시간 정도 배양하였다. 배양 5시간 후 *N caninum* merozoites를 well 당 1x10⁵개 정도가 50ul의 RPMI 1640 배지에 들어가도록 하여 넣어주고 여기에 각각의 한약제 추출액을 100ul의 RPMI 1640 배지에 1/2ⁿ 단계 희석하여 각 wells에 100ul 씩 넣어주었다. 즉 첫 번째 wells에는 각각 well 당 1.25ul의 *S flavescens*(고삼), 2.5ul의 *S acutum*(방기), 5.0ul의 *U macrocarpa*(무이), 2.5ul의 *P koreana*(백두옹), 그리고 1.25ul의 *T japonica*(사상자)를 넣고 두 번째

wells부터는 1/2ⁿ 단계 희석하였다. 이렇게 원충과 한약제를 넣은 다음 1주일간 37℃ CO₂ Incubator에서 배양하였다. 1주일 후 각각의 wells에 5.0ul의 Isotope (Uracil; ³H, 1.0mCi/ml)를 넣은 후 1일간 다시 37℃ CO₂ Incubator에서 배양하였다. 1일간 배양 후 cell harvester를 이용하여 96wells 여과지에 수확한 후 Isotope syncilation counter인 MicroBeta (beta counter)로 측정하였다.

나. 결과

- 1) In vitro 내에서 한약제의 *Neospora caninum*에 대한 항원충 효능 : *Torilis japonica*와 *Sophora flavescens*가 16배 희석 농도에서도 우수한 원충 성장억제 효과를 나타내었고 *Pulsatilla koreana*는 8배 희석 농도에서 원충의 성장억제 효과를 보였으며, *Ulmus macrocarpa*와 *Sinomenium acutum*은 거의 원충의 성장억제 효과를 보이지 않았다 (Table 1).

Table 1. Screening test of the drug efficacy of herb extracts against *Neospora caninum* in the 96 wells micro-plate.

Drugs	Dilution					
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
Parasite -ve	512	410	681	488	717	561
Parasite +ve	10759	21109	38543	27420	30125	28395
<i>Torillis japonica</i>	127*	181*	573	536	3828	13978
<i>Sinomenium acutum</i>	211*	13493	31657	20498	20731	21037
<i>Pulsatila koreana</i>	127*	181*	639	5655	10448	16032
<i>Ulmus macrocarpa</i>	235*	416*	19658	20160	21780	28097
<i>Sophora flavescens</i>	283*	253*	374	789	7941	22421
Sulfadiazine	10683	23491	28860	42285	47137	42622

ED cells : 5.0×10^4 cells/well (9.6×10^6 cells), Parasites (*Neospora caninum*) : 1.0×10^5 tachyzoites/well (2.56×10^7 tachyzoites), Isotope (³H) : 5ul/well of Uracil (1,600ul)

1차 약제 효능 평가에서 우수한 효능을 나타낸 *Torilis japonica*와 *Sophora flavescens*를 가지고 원충의 숫자를 10³, 10⁴, 10⁵, 및 10⁶으로 달리하

여 32배까지의 희석 농도에서도 효능을 평가한 결과 두 약제 모두 well 당 1.25ul와 그 1/2의 약물을 투여한 wells에서는 ED 세포에 독성을 나타내 세포가 모두 사멸되었고 1/4와 1/8배의 희석 농도에서 항원층 억제 효과를 나타냈다(Table 2).

Table 2. Screening test of the drug efficacy of herb extracts against *Neospora caninum* in the 96 wells micro-plate.

Group		No of <i>Neospora caninum</i>			
		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³
Parasite +ve		20,868	22,730	14,314	2743
Parasite -ve		512	410	681	488
<i>Sophora flavescens</i>	1.25ul	66	72	42	24
	1/2	253	211	235	265
	1/4	603	187	187	229
	1/8	17651	5945	850	350
	1/16	24615	17700	2345	416
<i>Torillis japonica</i>	1.25ul	60	102	78	42
	1/2	295	283	127	211
	1/4	1229	446	319	319
	1/8	12964	10543	2375	350
	1/16	14286	23509	6517	1501

다. 결론 및 고찰

한약제의 항원층 효능을 평가하는데 있어서 Isotope를 이용한 방법은 처음으로 도입되는 방법으로 매우 유용한 방법이 되었다. 또한 이는 원층이 beta 선을 내는 Isotope의 일종인 ³H를 잘 흡수하여 이용하는 성질을 가지고 있어 이 방법이 유용하게 쓰일 수 있었다. 물론 이 방법은 지금까지 알려진 항원층 제제인 Sulfadiazine이나 Pyrimethamine 등의 항원층 효능을 평가하기 위하여 도입된 바가 있다. 이를 참고로 하여 한약제에 적용시킨 결과 좋은 결과를 얻었다. 그리하여 *Torilis japonica*와 *Sophora flavescens*의 추출물을 HPLC를 이용하여 분획중에 있으며 앞으로 계속하여 이 분획들에 대한 항원층 효능이 평가될 것이다.

5. 효소면역흡착법(ELISA)을 이용한 쇠세모편모충(*Tritrichomonas foetus*)
감염진단

가. 재료 및 방법 :

- 1) 공시원충 : 한양대학교 의과대학 기생충학교실에서 분양받은 *T foetus* KV1 strain (Univ. of Wales, Professor David Lloyd : origin은 District Veterinary Laboratory, Karlovy Vary, Czechoslovakia)을 사용하였다.
- 2) 실험동물 및 항혈청 : 4주령 BALB/c 마우스에 항원을 접종하여 채혈한 후 혈청을 분리하여 검사재료로 사용하였다.
- 3) 검사 혈청 : 야외의 목적동물은 소 580두의 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 검사재료로 사용하였다.
- 4) TYM 배지 : *T foetus* KV1 strain의 항원을 생산하기 위하여 인공배지에서 배양하여 항원을 증식시킨 후 항원으로 사용하였다(Table 1).

Table 1. Composition of TYM medium for the growth of *T foetus*

Trypticase	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Maltose	2.5 g
L-cystein, monohydrochloride	0.5 g
Ascorbic acid(vitamine C)	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄ (potassium phosphate, monobasic)	0.05 g
K ₂ HPO ₄ (potassium phosphate, dibasic)	0.5 g
Penicillin	0.5 g
Gentamycine	0.5 ml
MEM	0.246 g
Horse serum	50 ml
D.W.	448.5 ml

- 5) ELISA를 위한 soluble antigen의 제조 : 인공배지에서 배양된 항원을 ml 당 1×10^7 개의 merozoites가 함유되도록 하여 Ultra-sonicator로 분쇄하여 soluble antigen을 준비하였다. 준비된 항원을 ELISA용 96 wells plate에 도포시켜 진단항원으로 사용하였다.

- 6) ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) : ELISA 방법은 위의 *N caninum*에 대한 혈청검사에서 사용한 방법과 같은 방법으로 실시하였다.
- 7) Western blotting : 일반적인 western blot 방법을 이용하여 검사하였다.

나. 결과

- 1) ELISA를 이용한 쇠세모편모충(*T foetus*) 접종 마우스의 혈청내 IgG 항체가 : 효소면역흡착법(ELISA)을 이용한 쇠세모편모충(*T foetus*) 감염진단법을 확립하기 위하여 마우스에 쇠세모편모충(*T foetus*) 항원을 접종한 후 채혈하여 양성혈청으로 사용하였다. 음성혈청은 항원을 접종하지 않은 마우스의 혈청을 사용하였다. 20개의 양성혈청 ELISA 값은 800배, 1600배, 그리고 3,200배 희석에서 각각 1.430, 1.301, 1.268로 음성 대조군의 0.363, 0.365, 0.318에 비하여 매우 높았다(Table 2).

Table 2 . Serum IgG antibody levels against *Tritrichomonas foetus* in infected and control mice determined by ELISA

Group	No of examined	Absorbance(Mean ± SD)		
		×800	×1,600	×3,200
Infected	20	1.430 ± 0.154	1.301 ± 0.223	1.268 ± 0.212
Control	30	0.363 ± 0.086	0.365 ± 0.067	0.318 ± 0.063

* p < 0.05

- 2) 소 혈청내의 쇠세모편모충(*T foetus*) 에 대한 항체유무 : 중부지방의 목장에서 소 580 두에 대한 혈청을 취하여 ELISA 방법을 이용하여 *T foetus* 항체의 유무를 검사한 결과 x800배 희석농도에서 16두, x1,600배 희석농도에서 1두, 그리고 x3,200배 희석농도에서 3두가 의양성을 보였다. 580두의 평균 ELISA 값은 x800배 희석농도에서 0.612, x1,600배 희석농도에서 0.582, 그리고 x3,200배 희석농도에서 0.542로써 대조군의 0.572, 0.539 및 0.522와 별 차이가 없었다(Table 3, 4).

Table 3. Seroprevalence against *Tritrichomonas foetus* in cattles

Animal	No of examined	Results of ELISA					
		×800		×1,600		×3,200	
		No of Positive	No of suspect	No of Positive	No of suspect	No of Positive	No of suspect
Cattle	580	0	16	0	1	0	3

Table 4. Serum IgG antibody levels in cattle determined by ELISA

Cattle	No of examined	Absorbance(Mean ± SD)		
		×800	×1,600	×3,200
		Tested	580	0.612 ± 0.091
Control	10	0.572 ± 0.089	0.539 ± 0.098	0.522 ± 0.101

3) *T foetus*에 대한 ELISA 의양성 소 혈청의 Western blotting : 의양성으로 판정된 모든 혈청에 대하여 Western blot을 한 결과 모두 음성으로 판정되었다(Table 5).

Table 5. Immunoblot analysis of cattle sera shown suspect against *T foetus* by ELISA

Result of ELISA	No of tested	Result of immunoblot
Suspect	20	Negative

다. 결론 및 고찰

소에서 쇠세모편모충(*T foetus*)의 혈청학적 진단법을 확립하기 위하여 마우스에 면역접종하여 ELISA 항체가를 조사하여 좋은 결과를 얻었고, 560두의 젖소를 대상으로 ELISA 방법으로 항체가를 조사한 결과 20두에서 의양

성을 보였다. 이를 western blot 하여 확인한 결과 모두 음성으로 나타났다. 이는 국내에서 한우나 젖소의 번식이 인공수정에 의하여 이루어지며 종모우와 종빈우에 대한 쇠세모편모충(*T foetus*)의 검색 및 도태가 철저히 이루어지고 있어 감염이 없는 것으로 사려된다.

제 6절 한우 및 젖소에 대한 *Neospora caninum*의 혈청조사

가. 재료 및 방법

1) 검사 재료

혈청검사 재료로는 9개 도의 78개 한우 목장으로부터 무작위로 채혈한 438두를 사용하였다. 혈청검사는 간접형광항체법을 이용하여 수행하였다.

2) 항원 슬라이드 제작

항원으로는 네오스포라 국내분리주인 KBA-2를 이용하여 Yamane등의 방법에 준해서 항원 플레이트를 제작하였다. 항원 슬라이드를 제작하기 위하여 tachyzoite 접종 7일 -10일 후에 육안적으로 세포배양 플라스크에 증식된 vero cell의 약 75%가 감염되었을 때 tachyzoite를 수거하였다. 감염된 세포를 플라스크로부터 수확하여 350g에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 약간의 PBS가 남은 상태에서 pellet를 부유시켜 주사바늘로 세포를 붕괴시키는 과정을 3회 반복하였다. 50 ml 플라스크 시험관에 tachyzoite와 세포붕괴물이 함유된 부유액에 30% percoll 용액을 첨가하였다. 멸균된 긴 바늘을 이용하여 50% 와 80% percoll 용액을 50 ml 플라스크의 밑부분에 첨가한 후 4°C 2,200g에서 30분간 원심분리하였다. 50%와 80%의 percoll 접합면에 위치한 tachyzoite를 수거하여 40 ml의 멸균 PCS를 첨가한 뒤 1,700g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 5 ml 정도의 PBS가 남은 상태로 tachyzoite를 부유시켜 혈구계산판을 이용하여 수를 측정하고 1 μ l 당 300-400개의 tachyzoite가 포함되도록 희석하였다. Teflon-coated 12 well slide (Superior, USAS)의 well 당 10 μ l tachyzoite함유용액을 떨어트린 후 상온에서 건조시키고, 2% paraformaldehyde가 함유된 PBS로 10분간 고정된 다음 건조시켜 -80°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

3) 혈청검사

혈청을 분리한 다음 200배 희석하여 tachyzoite가 부착된 슬라이드 well에 각각 well 당 10 μ l씩 분주하였다. 37°C 습상에서 1시간 간 반응시키고 0.05% triton-X 100이 함유된 PBS 5분씩 3회 세척하였다. 슬라이드상의 습기를 완

전혀 제거한 후 이차항체로 1:200으로 희석된 FITC-conjugated goat anti-bovine antiserum (Cappel Durham, USA)을 각 well 당 10 μ l씩 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C 습상에서 1시간 간 반응시키고, 반응이 끝난 다음 슬라이드를 PBS로 3회 세척한 다음 25% glycerol 함유 PBS로 봉입하여 현광현미경으로 관찰하였다. 양성 및 음성 대조혈청으로는 VMRD로부터 구입하여 사용하였으며 양성반응은 슬라이드에 부착된 tachyzoite의 표면전체에서 형광을 발하는 것을 기준으로 판단하였다. 혈청검사에서 양성으로 판정된 샘플들은 특소플라즈마 응집반응kit (Eiken Chemical, Japan)를 이용하여 설명서에 제시된 절차를 따라서 양성유무를 추가로 조사하였다.

나. 결과

젓소와 한우에 대한 혈청검사 결과는 Table 1과 2에 제시되어 있다. 한우의 경우 검사한 총 혈청 438두 중 18마리가 양성으로 확인되어 약 4.1%의 낮은 양성률을 보이고 있음이 확인되었다. 전체적으로 충청남도과 전라북도를 제외하고는 검사두수가 많지 않으나 충남을 제외하고는 4%이내의 양성률을 보였고 특히 충북, 전북과 전남 등 3도에서는 전혀 양성 예가 검출되지 않았다. *N. caninum*에 양성인 18예 중에서 단 1예만이 *T. gondii*에 양성반응을 보였다.

전국에서 검진한 유조사산 우 총 2,745두의 혈청에서 *N. caninum*에 대한 항체가 의양성 및 양성인 약 21%를 차지함을 알 수 있었다. *N. caninum*에 대한 항체를 지니는 경우 음성우에 비해 유산발생율이 3-7배가 증가하며, 유생산량이 1.3kg/day 감소함이 밝혀진바 있어 젓소농가의 경제성 손실(약 67만원/년/두)에 큰 영향을 끼치고 있음을 알 수 있었다. 이에 대한 대책으로 양성우의 번식우 사용의 배제등이 심각하게 고려 되어야 할 것으로 판명되며, 소를 입식시에는 이에 대한 검사를 철저히 하여 전파를 방지하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

다. 고찰

1996년 한국에서도 *N. caninum*에 의한 소 유산이 처음으로 확인된 이래

본 연구에서도 확인되었듯이 네오스포라 감염증은 젖소의 유산과 밀접한 관련이 있다. 전국적 규모의 혈청검사를 통해서도 젖소의 경우 제주도를 제외한 모든 도에서 비교적 높은 양성률이 확인되었다.

하지만 본 조사를 통하여 상대적으로 한우에서는 젖소에 비해서 매우 낮은 감염률을 보이고 있음이 확인되었다. 본 조사 결과는 최근에 발표된 네덜란드 및 스페인의 조사 결과와 유사하다.

젖소에 비해서 한우에서 *N. caninum*의 감염율이 낮은 것은 단순히 breed의 차이에 기인하는 것으로는 판단되지 않는다. 외국의 연구 결과에 의하면 육우에 비해서 젖소에서 높은 혈청양성율을 보이는 것은 사육조건과 밀접한 관련이 있는 것으로 조사되었다. 즉 제한된 지역 (dry-lot dairy, confinement)에 사육하는 환경적인 요인과 더 intensive한 husbandry등과 같은 조건이 감염정도와 연관이 깊다. 좁은 한정된 지역에 사육하는 것보다 방목하여 키우는 젖소 및 육우에서 감염율이 낮다는 것이 이러한 사실을 뒷받침한다. 미국의 경우에도 좁은 지역에 한정시켜서 키우는 California에 비해서 넓은 지역에 방목하여 키우는 주의 경우 전체적인 감염율을 낮다. 우리나라 젖소의 경우도 주로 방목하여 사육하는 제주도의 경우도 다른 지역에 비해서 항체양성률이 매우 낮다.

Gozalo나 Sanderson등의 연구 결과에 의하면 육우에서 *N. caninum* 감염은 herd size나 cow density와 연관이 깊다고 하였다. 2000년도 통계결과에 의하면 현재 한국의 한우 수는 1,590,000마리 정도이고 젖소는 544,000마리 정도이다. 하지만 젖소의 경우 평균 herd size가 40.7두인데 반하여 한우의 herd size는 herd 당 5.5마리에 불과하다. 따라서 이러한 한우와 젖소간의 평균 herd size의 차이로 인하여 한우에서 젖소에 비해서 낮은 혈청양성율을 보였을 것으로 분석된다.

아직까지 한우에서 *N. caninum* 감염에 의한 유산은 확인되지 않았으며 혈청검사 결과 역시 *N. caninum*이 한우 유산원인체로는 큰 문제가 되지 않는 것으로 사료된다. 하지만 앞으로도 지속적인 추후 조사와 주의가 요구된다.

Table 1. Seroprevalence of *Neospora* antibodies in dairy cattle in Korea as determined by IFA.

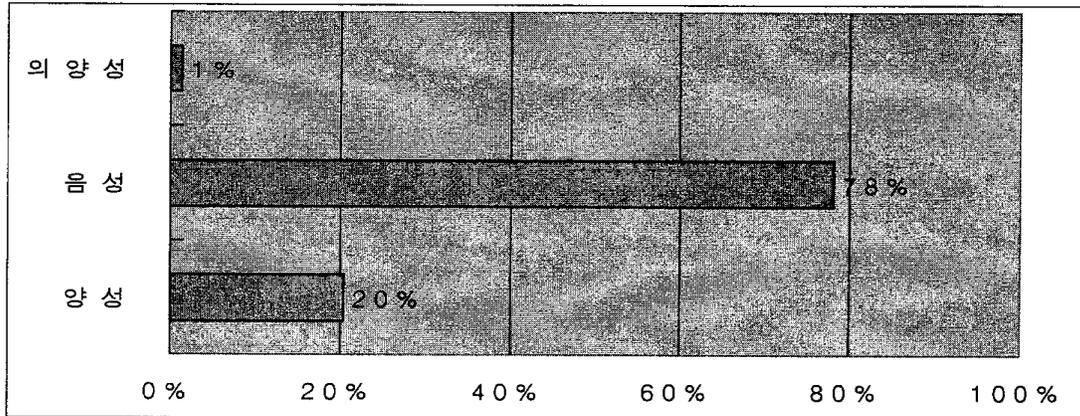


Table 2. Seroprevalence of *Neospora* antibodies in Korean native beef cattle in nine provinces in Korea as determined by IFA.

Province	NO. of test	Negatives	Positives(IFAT titers)				Total (%)
			200	400	800	1600	
Kyunggi	44	42	2	0	0	0	2(4.6)
Kangwon	36	34	1	1	0	0	2(5.6)
Chungbuk	21	21	0	0	0	0	0
Chungnam	123	112	5	3	2	1	11(8.9)
Kyungbuk	34	33	0	1	0	0	1(2.9)
Kyungnam	24	23	1	0	0	0	1(4.2)
Jeonbuk	78	78	0	0	0	0	0
Jeonnam	21	21	0	0	0	0	0
Cheju	57	56	1	0	0	0	1(1.8)
Total	438	420	10	5	2	1	18(4.1)

제 5 장 전염성 유산증에 대한 미생물학적 연구

제 1 절 서 론

소의 유산이라함은 생존할 수 있는 태령에 도달하기전에 살아있는 태아 또는 사태아가 자궁으로부터 배출되는현상을 말한다. 광의에서는 수정란의 조기사멸에 의한 임신 종결도 포함된다. 특히 태아 부산물이 배출되지 않고 흡수되어 외부에서 감지할수 없는 초기 유산은 현재까지의 기술로는 원인을 찾아내어 진단을 하기가 매우 어렵다. 소의 유산에 의한 경제적인 피해는 어려가지 측면에서 시작될수 있다. 즉, 소는 경제적인 동물이기 때문에 소를 사육하여 얻는 소득은 우유, 고기 및 번식을 통한 송아지 생산이 추가된다. 이는 분만이 곧 생산의 시작이 되는것이고 이를 위하여는 정상적인 수태와 분만이 가장 중요하다. 소의 유, 조, 사산은 낙농업을 주로 하는 국가 뿐만아니라 전세계적으로 막대한 경제적인 피해를 주고 있다. 더욱이 최근들어서는 새로운 원인체 및 요인의 개재로 인하여 이러한 소의 유, 조, 사산이 증가하는 추세이다. 특히 교통수단의 발달로 전세계의 전염성 질환이 전세계로 쉽게 전파되고 있는 실정이다. 그러므로 이에 대한 정확한 진단과 대책의 수립이 절실히 요구되는 실정이다.

소 유산의 원인은 물리적인 요인, 화학적인 요인, 생물학적 요인등 다양하다. 이 중 생물학적인 요인중에는 유전학적인 소인과 같은 개체 자체에 의한 요인과 미생물과 같은 전염원성등 외적 요인에 의한 원인들로 구분할수 있다. 이러한 전염성 원인체로는 세균성, 바이러스성, 진균성 및 기생충성 요인으로 구분할수 있다. 이러한 원인체들은 임신시기별에 따라서 발생정도에 차이가 있을수 있다. 주로 초기에는 Bluetongue, BVD virus 등과 같은 원인체가, 중기에는 Brucella, Campylobacter, Yeast 와 같은 원인체가 말기에는 Leptospira, Anaplasmosis, Listeria, Neospora 등과 같은 원인체가 개체되어 유산을 유발한다.

소 유산원인의 진단은 임상학적 소견을 바탕으로 육안적인 병변, 병리학적 소견, 미생물학적 검사등을 통하여 이루어 진다.

현재까지 국내에서 소 유산증의 원인체 조사는 1995년 국립수의과학검역원에 서 실시한 결과 유사산우증 43.6% 가 원인을 밝힐수 있었으며, 원인체들로는 아까바네 바이러스, 호르몬제 오용, 소 설사병 바이러스등으로 규명되었으나 머지 56.4%에 대하여는 그 원인을 밝혀지지 않았다. 또한 국내에서는 최근들 어서 소 부루셀라병이 지속적으로 발생하고 있도 또한 매년 증가 추세에 있 다. 이로 인한 양성우의 살처분등으로 인한 경제적인 피해는 막대하다. 또한 국내에서 렙토스피라병에 대한 항체조사 결과 한우는 2.5%, 젖소는 3.2%의 양성율을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 그러나, *Campylobacter* 감염증등 다른 병원체에 대한 피해 우려는 있으나 아직까지이에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

전염성 소 유산의 진단은 병리학적 소견을 바탕으로한 원인체의 분리동정, 혈청학적 검사등을 통하여 이루어진다. 원인체의 분리동정은 원인체의 종류 에 따라서 여러 가지 방법들이 적용되고 있다. 그러나, 일반적으로 소 유산증 에 관련된 원인체들의 분리동정에 어려움이 많기 때문에 새로운 원인체 검색 기법의 개발이 요구되어 왔다. 또한 우군의 검색을 효율적으로 할수 있는 혈 청학적 진단 기법들의 개발이 많이 요구되어 지고 있다. 특히 부루셀라병과 같은 전염병의 근원지를 파악하기 위하여는 발생농장에서 분리한 원인균들에 대한 역학적 연구가 매우 중요하다. 이에 부가하여 중요한 것 농장에서 직 접 소를 사육하는 농장주 또는 목부들의 소유산증에 대한 인식과 이를 예방 하고자 하는 의식이다.

이러한 내용들을 바탕으로 본 연구에서는 유산가검물의 원인체들로부터 관련 된 세균성 원인체들의 분리, 동정을 시도 하였고 또한 국내 목장에서 의 혈청 학적 검사을 통한 질병의 분포양상을 파악 하고자 하였다. 최근 발달된 분자 생물학적 기법을 이용하여 소 유산 원인체들의 신속, 정확한 검색기법의 개 발과 이들의 역학적 특성을 파악할수 있는 기법의 개발과 아울러 국내 분리 원인균에 적용하였고, 설문조사를 통하여 국내 목장에서 소유산 및 예방대책 에 대한 인식의 조사도를 조사하여 국내 전염성 원인체에 의한 소 유산의 예 방대책을 수립하는데 기초 자료로 사용하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 유산가검물의 원인체 분리, 동정

가. 유산 관련 세균성 원인체 분리, 동정

유산 가검물로부터 세균성 원인체를 분리하기 위하여 유산 태아를 부검후 실질장기 (폐, 신장, 심장등) 및 흉, 복수액을 채취하여 Brucella agar (Difco), BPNV agar [Nutrinet agar 916 ml, 10 g dextrose in 50 ml of bovine serum, Bacitracin (25,000 IU/ml) 10ml, Polymyxin B (5,000 IU/ml, 0.83 ml, Nalidixic acid (5mg/l), 1 ml, Nystatin (100 IU/ml), 10 ml, Vancomycin (20mg/l), 10ml, Cycloheximide (100mg/l), 2 ml] 및 Blood agar (Comed) 등에 접종한후 37°C에서 5% CO₂ 분압하에서 24-48 시간 배양후 단일집락을 분리하여 Gram염색, oxidase, catalase 등 간단한 생화학적 검사를 실시한후 미생물 자동 동정 장치 (Vitek system)을 이용하여 동정 하였다. 본 연구를 통하여 세균성 원인체 분리 동정을 위하여 사용한 가검물은 유산태아 262 예, 태반 44 예 및 우유 32 예 이었다.

나. Virus 성 질병 원인체의 분리

1) BVD virus 의 분리 ; 유산 가검물을 PBS 로 10% 유제액을 하여 4,500rpm에서 30분간 원심분리후, 상층액을 0.8 μ m, 0.2 μ m filter 로 연속 여과한후 virus 분리에 사용하였다. 96 well microplate 에 monolayer 가 형성된 MDBK cell 에 가검물 여과액을 접종한후 37°C에서 한시간동안 흡착시킨후 PBS 로 세척하고, 여기에 배양 배지(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)을 추가하여 37°C에서 5 일간 배양한후, 동일한 방법으로 4 대 계대 배양한후 BVD 특이 CPE를 확인 하였으며, 이를 RT-PCR 을 통해 재 확인 하였다.

2) Akabane virus 의 분리 ; Akabane virus 의 분리는 Vero cell 과 HmLu-1 cell 을 사용 하여 BVD virus 분리와 동일한 방법으로 수행하였고, HmLu-1 cell 에 3대 계대 배양하여 Akabane virus 특이 CPE를 확인하였으며, 이를 RT-PCR 을 실시하여 Akabane virus 특이 band를 확인 하였다.

3) IBR virus 의 분리 ; IBR virus 의 분리는 vero cell을 이용하여 위와 같이 동일한 방법에 의하여 수행하였다.

2. 유산 관련 미생물 원인체에 대한 혈청학적 조사

가. 세균성 원인체에 대한 혈청학적 검사

유산 관련 미생물 원인체에 대한 혈청학적 조사는 실험계획에 서술되어 있는 방법들을 이용하여 실시하였다. 즉, 브루셀라에 대하여는 시험관 응집 반응법 (Tube Agglutination Method)을, 렙토스피라는 현미경 응집 용균 반응 (Microscopic Agglutination Test, MAT)을 *Campylobacter* 에 대하여는 microplate 응집반응법을 이용하였다. 즉, *Brucella* 항체 검사를 위한 tube agglutination 법에서는 혈청을 25배, 50배, 100배, 200배, 및 400배 로 희석하고 여기에 100배로 희석한 브루셀라 항원(국립수의과학검역원)을 2씩 tube에 분주한후 37에서 48시간동안 방치 후 응집 여부를 판독하였다. 응집가가 100 배이상을 양성, 50배를 의양성, 25배이하는 음성으로 판독 하였다. *Leptospira* 에 대한 항체가 검사는 MAT 법에 의해서 실시하였다. 즉, *Leptospira* medium 인 EMJH에서 증균한 균들을 항원으로 사용하기 위하여 2.0×10^8 cells/ml (MacFarland Scale No. 0.5) 로 조정하였다. 가검혈청을 microplate 을 이용하여 12.5 배에서 1,600 배까지 희석한후 혈청을 25, 항원을 25 씩을 각각 넣은후 37 °C에서 1시간 배양한후 암시야 현미경을 이용하여 응집여부를 관찰하여 50%이상 응집되었을시 응집한 것으로 판정 하였다. 응집가가 100배 이상인 혈청을 양성으로 판정하였다. *Campylobacter* 에 대한 항체가는 *Campylobacter fetus*을 Chocolate agar 에 배양한후 멸균 PBS을 이용하여 집균한후 항원농도를 MacFarland Scale No. 0.5 로 조정하여 microplate을 이용하여 응집반응을 실시하였다. 응집가가 100 배이상인 것을 양성으로 판정하였다. Q fever 에 대하여는 조등의 방법에 따라서 IFA 법을 이용하여 실시하였다. 즉, *Coxiella burneti* Nine Mile strain phase I antigen을 항원으로 이용하였다. 즉, 가검혈청을 PBS 용액으로 1:20 으로 희석한후 항원재료가 미리 점적된 multispot slide 상에서 37 °C에서 30 분간 반응을 시킨다음 PBS 로 세척한 다음, FITC- conjugated anti-bovine immunoglobulin (rabbit

anti-bovine IgG)을 1:100 으로 희석하여 동 slide 상에서 37 °C에서 30 분간 반응을 시킨다음 PBS 로 세척하였다. 마지막으로 slide 상에 FA mounting fluid (Difco Co) 를 적점시킨다음 coverslip을 덮고, 형광현미경하에서 관찰하였다. 통상적으로 250배 시야에서 1차 검경후, 500배 시야에서 확인 하였다. 확인후 이때 혈청 희석 배수가 1:20 이상을 양성으로 판정하였다.

나. Virus 성 원인체에 대한 혈청학적 검사

소 유산증 바이러스에 대한 혈청학적 검사는 중화 시험법에 의하여 실시하였다. Virus 배양을 위한 세포주로는 MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cell 과 Vero cell을 이용하였고, virus 로는 IBR virus 는 PQ7 strain 을, BVD virus 는 NY-1 strain을, Akabane virus 는 OBE-1 virus을 이용하여 혈중 항체를 조사하였다. 중화시험은 혈청을 2 진 계단 희석한후 각각의 virus 200TCID₅₀ 의 농도로 동량 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 분압하에서 30분간 반응 시킨후 각각의 세포주에 분주하고 2-5 일 동안 세포 변성 효과의 유무를 관찰하여 항체를 판정 하였다. CPE을 억제하지 못한 최종 혈청 희석 배수를 항체가로 결정 하였으며, 4 배이상인 경우 양성으로 판정 하였다.

3. 유산 관련 진단법의 개발 및 확립

가. 유전자 검색기법을 이용한 진단 기법 개발

1) 세균성 원인체 검색 기법 개발 ; 유전자 검색을 통한 세균성 유산 원인체의 검색을 위하여 PCR 기법을 개발하였다. 이때 사용된 Primer 는 다음의 표 1 과 같다.

Table 1. Nucleotide sequence of primers used to detect bacterial causative agents of bovine abortion

Diseases	Nucleotide sequences of primers
Brucellosis	BSCP1 F 5'GTATCGTTCTTGAAGCCTAC 3' R 5'GTGCATTTCAATAGGCTAGAG 3'
	OMP F 5' ACTGGAGGTCAGAAATGAAC 3' R 5'GATTAGAACGAACGCTGGAA 3'
Campylobacteriosis	MG3F 5' GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT 3'
	MG4R 5' YAGCTACAATAAGGACA ACT 3'
	Ven SR 5'CTTAGCAGTTTGGCGATATTGCCATT 3' Ven SF 5'GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT 3'
Leptospirosis	LeptoIn F 5'CTTGACATGGAGTGGAATC 3' R 5' TGCGGTTGGCAAAGACCAC 3'

이때에 사용한 PCR 의 조건은 *Brucella abortus* 는 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분을 30 회 실시하였으며, 72°C에서 5 분간 실시하였다. *Campylobacter fetus* 의 경우에는 95°C 에서 20초, 50°C 에서 20초, 72°C에서 2 분간 실시하였고, 72°C 에서 10분간 실시하였다. *Leptospira interrogans* 의 경우에는 94°C 에서 15초, 53°C 에서 20초, 72°C 에서 1 분간을 실시하였으며, 72°C 에서 5 분간 실시하였다. PCR 후 증폭된 유전자는 1.0 또는 1.5% agarose gel 에서의 전기영동에 의하여 증폭된 DNA을 확인하였다.

나. Virus 성 원인체 검색기법 개발 ; 유산 가검물로부터 virus 성 유산 원인체를 검색하기 위한 PCR 시 사용한 Primer 는 다음의 표 2 와 같다.

Table 2. Nucleotide sequence of primers used to detect viral causative agents of bovine abortion

Viruses	Nucleotide sequence of primers
Akabane	AKA F2 5'ACCAGAAGAAGGCCAAGTAG 3'
	AKA R2 5'CACACGGTGCATGTCGATAA 3'
	AKA F3 5' GCAGTGCAAGGCTAATCAGA 3'
	AKA R2 5'CACACGGTGCATGTCGATAA 3'
BVD	BVDV F1 5'GCCATGCCCTTAGTAGGACT 3'
	BVDV CR1 5' GCWRCACCCTATCAGGCTGT 3'
IBR	IBR F1 5' CATACCGTCGCCCTTCGCAG 3'
	IBR R1 5' GAGTTTCGAGAACCAGCAGT 3'

Akabane virus 검색을 위하여는 S gene을 목표로 Nested RT-PCR을 실시하였으며, 이때에 PCR 조건은 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 45초를 30 회 실시한후 72°C 에서 5 분간 최종 증폭 시켰다. BVD virus 에서는 95°C 30초, 52°C 30초, 72°C 30초를 30 회 실시한후 72°C 에서 최종 5분간 증폭시켰다. IBR virus 에서는 94°C 에서 30초, 54°C 에서 30초, 72°C 에서 30초로 30회 실시한후 72°C 에서 최종 5분간 증폭 시켰다. 최종 증폭된 유전자는 1.0 - 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

나. 부루셀라에 대한 혈청학적진단기법 개발

소 부루셀라병의 조기 검출 및 효율적인 진단 기법을 확립하기 위하여 부루셀라균의 세포벽 성분을 구성하는 2 가지 성분에 대한 재조합 단백질 (16.5kDa, 26kDa)을 생산하여 야의 가검 혈청 314 개를 이용하여 본 연구를 통하여 확립한 ELISA 법과 시험관응집반응법의 결과의 상관관계를 비교 분석하였다. ELISA법 ; Coating buffer 에 희석한 항원을 1 well당 100씩 (16.5kDa : 0.02/100, 26kDa : 0.01/100) 분주한후 4°C 에서 16-18시간 동안 방치하여 항원을 코팅하였다. Washing buffer(PBST)로 1 well당 200씩 분주

하여 3회씩 세척한 후에 PBST에 BSA(Bovine serum Albumine)를 1%로 희석하여 blocking solution을 만들어 250씩 분주하여 항온실(37)에서 1시간 방치하였다. Washing buffer(PBST)로 3회씩 세척한 후 400배로 희석한 혈청을 1 well당 100씩 분주하여 37⁰C에 1시간 방치하였다. Washing buffer(PBST)로 3회씩 세척한 후 HRP conjugate(anti-bovine)를 4,000배로 희석하여 1 well당 100씩 분주한후 37⁰C 에서 1시간 방치하였다. Washing buffer(PBST)로 3회씩 세척한 후 Substrate로 발색 후 판독하였다. 발색제는 ABTS 0.02g을 1의 D.W.에 녹인 후 ABTS 500 + H₂O₂ 200 + Working Citrate 50의 비율로 섞어 1well당 100씩 분주한 후 실온에 방치하였다가 30분 경과 후 Stop solution을 50씩 분주하고 파장 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tube Agglutination Test; 혈청당 5개의 tube를 준비한 후 혈청을 25배, 50배, 100배, 200배, 및 400배로 희석한후 100배로 희석한 브루셀라 항원 (국립수의과학검역원)을 2씩 tube에 분주하고, 37⁰C에 48시간동안 방치 후 응집 여부를 판독하였다.응집가가 100 배이상을 양성, 50배를 의양성, 25 배이하는 음성으로 판독 하였다. 이때에 본 시험에 사용한 가검혈청의 응집가는 25 미만 129개, 25 배 48 개, 50 배 19 개, 100 배 10 개 200 배 15 개, 400배이상 93 개로 총 314개의 혈청을 이용하여 비교 하였다.

다. 직접 형광 항체법에 의한 BVD, IBR 바이러스의 검출

BVD 와 IBR virus를 검출하기 위하여 각각의 direct FA conjugate (VMRD, INC, Catalog No. 210-62-BVD 와 Catalog No. 210-600 IBR)를 이용하여 형광항체법을 이용하여 확인하기 위하여 가검물 유제액을 접종한 cell culture plate를 PBS 로 washing 한후 80% acetone 으로 10 분간 고정 하였다. 고정한후 37⁰C에서 10 분간 건조 시킨후 형광항체와 20분간 37⁰C에서 반응 시켰다. 반응후 FA rinse buffer 로 wsahing 하고 형광현미경상에서 관찰하였다.

4. RAPD 기법을 이용한 부루셀라균의 유전, 역학적 분석기법 확립

야외 분리 부루셀라균에 대한 유전, 역학적 분석을 위하여 여러 가지 방법들이 적용되고 있는데 이중에 URP (Universal Rice Primer)을 이용한 PCR 기

법을 표준균주를 이용하여 확립한후, 이 기법을 이용하여 야의 분리부루셀라 균에 대한 strain typing을 시도 하였다.

Genomic DNA 분리; genomic DNA를 분리하기 위하여 각각 5 의 LB broth에 접종한 후 200 rpm의 속도로 shaking incubator에 배양한 후 원심분리하여 bacterial cell을 침전시키고 추출용 완충액 (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) 400 로 균체를 잘 현탁한 후, Proteinase K(20 mg/ml) 10 를 첨가하여 37의 항온기에서 1시간 동안 보온하였다. 이 혼합액에 2×CTAB 용액을 동등한 volume으로 넣고 잘 혼합하여 65에서 15분간 방치한 후, 700 의 phenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1)를 처리하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 원심튜브에 옮기고 0.6 volume의 isopropanol을 혼합하여 응결시킨 genomic DNA를 새 튜브에 옮겨 70%의 ethanol을 이용하여 세척한 후 완전히 건조시켜 200 의 TE buffer에 녹여 실험에 사용하였다.

PCR 조건; PCR핵산지문 분석을 위하여 20 mer의 URP 2, 3, 6, 9 primer가 적용되었으며, 주형 DNA는 *B. abortus*로부터 분리된 50 ng의 genomic DNA를 사용하였다. PCR반응 용액은 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 200 μM의 dNTP, 200 ng의 primer 및 *Taq* polymerase (PerkinElmer, USA)를 2.5 unit을 사용하여 전체 반응용액은 50 가 되게 하였다. PCR증폭조건은 PerkinElmer-9600를 이용, 처음 DNA의 열변성을 위하여 94에서 3분간 1 cycle, 그리고 94 1분, 55에서 1분, 72에서 2분간으로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA합성은 72에서 7분으로 하였다. 증폭된 PCR산물은 TAE 완충액 (45 mM Tris-acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)에서 1.5%의 agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide용액로 염색하고 깨끗한 d.w로 세척하여 UV등 밑에서 증폭된 DNA 다형을 확인하였다.

5. 소 유산증에 대한 설문조사

국내 양축농가들의 소 유산증의 예방에 대한 인식도 및 현재 유산증 예방을 위하여 실시하고 있는 방법등에 대하여 알아보고, 이를 바탕으로 국내 소 유

산증에 대한 방역대책수립의 참고 자료로 이용하기 위하여 국내 양축농가들을 대상으로 소 유산증에 관한 설문조사를 실시하였다. 이때 사용한 설문내용은 다음과 같다.

소 유산증에 관한 설문 조사서

본 연구조사는 국내 소 유산증 (아까바네, 네오스포라 등 전염성 유산증) 예방을 위하여 실시하는 연구로서 국내 목장에서 현재 실시되고 있는 소 유산증 예방법들에 대하여 조사, 검토하여 소 유산증에 대한 효율적인 예방대책을 수립하기 위한 참고 자료로 사용하고자 합니다. 목장에는 어떠한 피해도 가지 않음을 말씀드립니다.

I. 소 유산증에 관한 사항

1. 귀하의 목장에서 소 유산을 경험한 적이 있습니까 ?
 없다 () 있다 ()
2. 소 유산 경험이 있다면 1년에 몇 회 정도입니까 ?
 1 회 이하 2 - 3 회 4 - 6 회 7 - 10회 10 회 이상
3. 귀하의 목장에서 소 유산 예방을 위하여 주로 실시하는 방법은 ?
 예방(백신)접종 모기 구제(방충망 설치 등) 우사주위소독(분무소독)
 우사주위소독(연막소독) 기타()
4. 귀하의 목장에서 소 유산 예방을 위하여 실시하는 예방접종의 종류는 ? -
 목장에서 실시하시는 예방접종 모두를 표시하여 주십시오.
 소호흡기기관염(아비알,IBR) 소바이러스성 설사병 (비브이디, BVD) 파
 라인푸루엔자 3
 형 유행열 아까바네 기타()
5. 소 유산증 이외에 귀하의 목장에서 실시하는 예방접종의 종류는 ?
 소코로나바이러스 소대장균증 소 호흡기백신 기타()
6. 소 유산증에 대한 예방 접종 시 접종연령은 ?
 1 세미만 1-3 세 3-5세 5 -7세 7세 이상 모든연령
7. 소 유산증에 대한 접종시기는

봄(3-5월) 여름(6-8월) 가을(9-11월) 겨울(12-2월) 수시로

8. 귀하의 목장에서 신규 소 구입 시 부루셀라병에 대한 검사실시여부를 확인하십니까 ?

확인하지 않는다 확인한다

9. 검사여부를 확인한다면 확인 방법은 ?

확인서 첨부를 요구한다 직접 검사기관에 의뢰한다

소를 판 축주나 증개상에게서 구두로만 확인한다 기타()

10. 귀하의 목장에서 부루셀라 이외에 유산과 관련하여 검사를 받고있습니까?

받고 있다 받고있지 않다

* 10번 문항에서 “ 받고 있다”라고 답하신 분만 답하세요.(1114)

11. 부루셀라 이외의 유산과 관련한 검사는 주로 어디에 의뢰합니까 ?

가축위생시험소 대학 수의과학검역원 동물약품회사

사료회사 동물병원 기타 ()

12. 주로 검사 받고 있는 항목은 ?

혈액 항체가 검사 원인체 분리동정 기타()

13. 주로 검사 받고 있는 질병은 ? - 모두 표시하여 주시기 바랍니다.

소호흡기기관염(아비알,IBR) 소바이러스성설사병 (비부이다,BVD)

파라인푸루엔자 3형 유행열 아까바네 기타()

14. 검사 받는 주기는

1 년 2회 이상 1 년 1회 2년 1회 3년 1회 기타()

II. 일반 사항

1. 귀하의 목장 소재지는 ?

경기, 인천지역 충청도지역(대전) 전라도지역 경북(대구) 지역 경남(부산) 지역

강원지역

2. 귀하 농장의 착유 두수는 몇 두입니까?

10두 미만 10 - 30두 30 -50 두 50두 이상

3. 귀하의 목장 운영 경력은 ?

5 년 미만 5 - 10 년 10 - 20 년 20 년 이상

4. 귀하 목장의 납유업체는 ?

서울우유 매일우유 해태우유 빙그레 남양유업

지역 낙협 등 파스퇴르유업 기타 유업체()

제 3 절 결 과

1. 유산 가검물의 원인체 분리 동정

가. 세균성 원인체

소 유산증의 원인 분석을 위하여 본 연구를 통하여 (1999. 6. 15 - 2002. 5. 31) 세균성 원인체를 분리, 동정 하기 위하여 사용한 가검물 (유산태아 262 예, 태반 44 예, 우유 32 예) 로 분리, 동정한 세균은 다음표 3 와 같다.

Table. 3 Bacterial agents isolated and identified from specimen of bovine abortion

Bacteria isolated	No. of Isolates			
	1차	2차	3차	Total
<i>Acinetobacter calcoaceficus-baumannii</i> complex	1	2	0	5
<i>Acinetobacter lwoffii/junii</i>	1	3	4	8
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	0	2	0	2
<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i>	5	2	0	7
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	0	1	0	1
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1	0	0	1
<i>Budvicia aquatica</i>	0	1	0	1
<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	0	1	0	1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0	1	0	1
<i>Chryseobacterium</i> (<i>Flavobacterium</i>) <i>indologenes</i>	0	5	0	5
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1	0	0	1
<i>Citobacter freundii</i>	0	1	0	1
<i>Comamonas acidovorans</i>	0	1	0	1
<i>Corynebacterium xerosis</i>	3	0	1	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	2	2
<i>Enterobacter aminigenus</i>	0	1	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	1
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i>	0	1	3	4
<i>Enterococcus faecalis</i> -(group D)	0	2	0	2
<i>Enterococcus faecium</i>	1	3	4	8
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	0	3	4
<i>Enterococcus gergoviae</i>	0	1	0	1
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	0	2	0	2
<i>Escherichia coli</i>	6	29	22	57
<i>Escherichia hermannii</i>	0	1	0	1
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	2	0	0	2
<i>Flavobacterium odoratum</i>	1	0	0	1
<i>Gemella morbillorum</i>	0	2	0	2
<i>Gemella morbillorum</i> / <i>Streptococcus agalactiae</i> (group D)	0	3	0	3
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	5	0	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	2	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	1	1
<i>Moellerella wisconsensis</i>	0	1	0	1
소계	24	72	39	135

표 3 (계속)

Bacteria isolated	No. of Isolates			
	1차	2차	3차	Total
<i>Morganella morganii</i>	1	3	0	4
<i>Pasteurella haemolytica</i>	2	0	0	2
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0	0	1
<i>Photobacterium damsela</i>	1	0	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	0	1
<i>Proteus vulgaris</i>	2	7	0	9
<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	0	0	2
<i>Providencia rettgeri</i>	1	0	0	1
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	0	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	0	1	3
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0	0	1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1	0	1
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	8	0	9
<i>Staphylococcus sciuri</i>	12	2	0	14
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	1	1	2
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0	1	0	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia (Xanthomonas maltophilia)</i>	0	1	1	2
<i>Streptococcus acidominimus</i>	0	0	2	2
<i>Streptococcus agalactiae</i> (group B)	0	1	1	2
<i>Streptococcus bovis</i> & <i>S. bovis</i> (Group D)	0	3	5	8
<i>Streptococcus mutans</i>	0	0	1	1
<i>Streptococcus uberis</i>	4	0	9	13
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	1	2	3
<i>Vibrio fluvialis</i>	0	2	0	2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	1	0	1
Yeast	6	0	0	6
<i>Yersinia kristensenii</i>	0	0	1	1
Non-fermenting G(-) bacillus (asacharolytic)	0	2	1	3
unidentification Gram(-)Oxidase(+)	51	26	7	84
unidentification Gram(-)Oxidase(-)	0	4	2	6
unidentification Gram(+)Catalase(+)	0	8	9	17
unidentification Gram(+)Catalase(-)	0	4	0	4
fungi-like	0	1	0	1
소계	90	79	38	207
총계	114	151	77	342

나. 바이러스성 원인체

1) Virus 분리

아래 표에서와 같이 본 연구기간동안 바이러스 분리를 위하여 사용한 가검물은 유산태아을 포함하여 총 426 예이었으며 이중 IBR virus 14 예, BVD virus 31 예, Akabane virus 6 예를 동정할수 있었고, 분리된 바이러스는 IBR virus 5 주, BVD virus 5 주, Akabane virus 1 주 이었다.

표 유산가검물로부터 분리, 동정된 IBR virus, BVD virus 및 Akabane virus

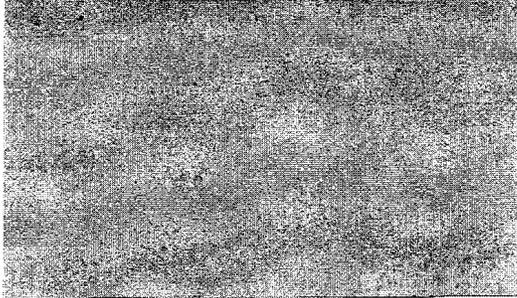
가검물수	바이러스 동정수			바이러스 분리수		
	I	B	A	I	B	A
1 년차 114	5	14	0	1	2	0
2 년차 256	2	2	6	2	2	1
3 년차 56	2	1	0	2	1	0
총 계 426	14	31	6	5	5	1

I : IBR virus, B : BVD virus, A : Akabane virus

2) BVD virus 분리 및 특성 조사

가검물에서 RNA를 추출하여 reverse transcriptase를 이용해 cDNA를 만든 후 PCR을 실시하여 양성으로 판단된 샘플로부터 바이러스 분리를 시도하였다. 분리주중 2주에 대하여 RT-PCR product를 이용해 염기서열을 분석하였다. 분석결과 분리주는 모두 BVD type 1으로 판정되었으며, BVDV NY-1 strain과 homology를 조사하였다. 분리주 모두 BVD type 1 으로 판정되었고, BVDV Bo 41 isolate 는 cytopathic BVDV 이고, BVDV Bo 333 isolates 는 non-cytopathic BVDV 이었다. Sequencing 결과 BVDB NY-1 주와는 각각 95% 와 97% 의 homology을 나타내었다. 본 실험을 통하여 총 5 개의 가검물로부터 바이러스를 분리 하였다. 이들에 대한 특성은 아래의 표와 같다.

< BVDV 분리주에 의한 세포변성 효과 >



Cell control



BVDV, Bo 41 isolate(200)

그림. Comparison of 5UTR sequences from BVDV, NY-1 strain and BVDV-1 isolates

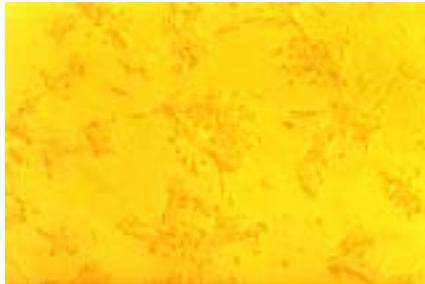
1 NY-1	GCCATGCCCTTAGTA	GGACTAGCAAATAA	GGGGGGTAGCAACAG	TAGTGAGTTCGTTGG	ATGGCTGAAGCCCTG	AGTA-CAGGGTAGTC	89
2 Bo41	*****	*****G*	*****	*G*****	*****	****G*****	90
3 Bo333	*****	*****G***	*****	*G*****	*****	****-*****	89
4 Bo373	*****	*****G****	*****C**	*G*****	*****	*T*--*****CGT	88
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
1 NY-1	GTCAGTGGTTCGACG	CTTCGGAGGACAAGC	CTCGAGATGCCAC-G	TGGACGAGGGCATGC	CCACA-GCACATCTT	AACCTGA-GCGGGGG	176
2 Bo41	*****	***T*****	*****-	*****	****A*****	****G-A*****	178
3 Bo333	*****	***T*****	*-*****-	*****	****-*****	****G-A*****	176
4 Bo373	*****	***T*****	*****T*	****T*****	****-*****	****GGA*****	177
	181	195 196	210 211	225 226	240		
1 NY-1	TC-GTTCAGGTGAAA	ACGGTTTAACCAA-C	CGCTACGAATACAGC	CTGATAGGGTGCTGC			234
2 Bo41	**--*****	*****TGG*	*****	*****			237
3 Bo333	**--*****	*****-*	*****	*****A***			234
4 Bo373	**T*****	*****-	*****	*****			236

BVDV 이었다. Sequencing 결과 BVDB NY-1 주와는 각각 95% 와 97% 의 homology을 나타 내었다. 본 실험을 통하여 총 5 개의 가검물로부터 바이러스를 분리 하였다. 이들에 대한 특성은 아래의 표와 같다.

< BVDV 분리주에 의한 세포변성 효과>



Cell control



BVDV, Bo 41 isolate(×200)

그림. Comparison of 5UTR sequences from BVDV, NY-1 strain and BVDV-1 isolates

1 NY-1	GCCATGCCCTTAGTA	GGACTAGCAAAATAA	GGGGGGTAGCAACAG	TAGTGAGTTCGTGG	ATGGCTGAAGCCCTG	AGTA-CAGGGTAGTC	89
2 Bo41	*****	*****G*	*****	*G*****	*****	***G*****	90
3 Bo333	*****	*****G****	*****	*G*****	*****	***-*****	89
4 Bo373	*****	*****G****	*****C***	*G*****	*****	*T*-*****CGT	88
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
1 NY-1	GTCAGTGGTTCGACG	CTTCGGAGGACAAGC	CTCGAGATGCCAC-G	TGGACGAGGGCATGC	CCACA-GCACATCTT	AACCTGA-GCGGGGG	176
2 Bo41	*****	**T*****	*****-*	*****	***A*****	***G-A*****	178
3 Bo333	*****	**T*****	*****-*	*****	***-*****	***G-A*****	176
4 Bo373	*****	**T*****	*****T*	***T*****	***-*****	***GGA*****	177
	181	195 196	210 211	225 226	240		
1 NY-1	TC-GTTCAGGTGAAA	ACGGTTTAACCAA-C	CGCTACGAATACAGC	CTGATAGGGTGCTGC	234		
2 Bo41	**-*****	*****TGG*	*****	*****	237		
3 Bo333	**-*****	*****-*	*****	*****A***	234		
4 Bo373	**T*****	*****-*	*****	*****	236		

그림. Comparison of 5' UTR sequences from BVDV-2 890 strain, BVDV Bo388 isolate and BVDV NY-1

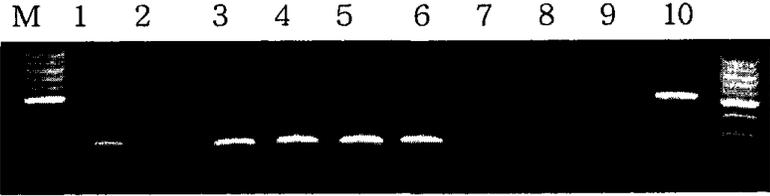
	15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
1 BVDV-2	ATTGGATGGCC-GAA	CCCCTGAGTACAGGG	GAGTCGTCAA-TGGT	TCGACACTCCTTAG	TCGAGGAGTCTCGAG	ATGCCATGTGGACGA	88
2 Bo388	*****C*** T*****	A*****A****	*****A*C*A	**C*****	*****	*****	90
3 BVDNY1	G*****T-*** G*****	T*****G-****	*****G*+---CG*	AG**CA**C*****	*****C*****	*****	85
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
1 BVDV-2	GGGCATGCCCCAGGC	ACATCTTAACCCACG	CGGGGTGCGTGGG	TGAAAGCGCCATT-C	GTGGCGTCATGGACA	CAGCCTGATAGGGT-	176
2 Bo388	*****	*****T*T*	*****A****	*****A*-----	***T**T*****	*****T	179
3 BVDNY1	*****A**	*****TGA*	*****C*TTCA**	*****A**GTT*AA*	CAAC**CT*C*A*T*	*****-	174
	181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270
1 BVDV-2	GTAGCAGAGACCTGC	TACTCCGCTAGTAAA	AA-CTCTGCTGTACA	TGGCACATGGAGTTG	TTTTCAAATGAACTT	TTATACAAAACATAT	265
2 Bo388	*****	**T*****	**-----	*****GGAGTTG	ATATCAAATGAACTT	TTATACAAAACATAT	268
3 BVDNY1	*CT*****G***A*	*GTATT***C****	**T*****	*****-----	-----	-----	225

* Bo373 와 Bo388 는 분변에서 분리한 균주임.

아래 표에서와 같이 가검물에서 분리한 BVD virus 의 조사한 결과 4 주가 BVD type 1 로 1 는 type 2 로 판정 되었고, BVDV Bo41 만이 cytopathic BVDV 로 판정 되었고, 나머지는 non-cytopathic BVDV 이었다.

Isolates	Genotype	Biotype	Passage level
Bo 41	Type I BVDV	cpBVDV	P5
Bo 333	Type I BVDV	nepBVDV	P5
Bo 373	Type I BVDV	nepBVDV	P5
Bo 388	Type II BVDV	nepBVDV	P3

Isolates	Homology against BVDV NY-1 strain
BVDV, Bo 41 isolate	95%
BVDV, Bo 333 isolate	97%
BVDV, Bo 373 isolate	93%



분리주의 genotyping을 위한 RT-PCR 결과. 3-6 번 lane은 BVDV type I, II에 대한 공통 primer를 이용하였으며 7-10번 lane은 type II 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과이다.

Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : BVDV, NY-1 strain Lane 2 : Negative control (MDBK cell)

Lanes 3&7 : Bo 41 isolate Lanes 4&8 : Bo 333 isolate

Lanes 5&9 : Bo 373 isolate Lanes 6&10 : Bo 388 isolate

2. 유산관련 원인체에 대한 혈청학적 조사

가. 세균성 원인체

총 2246 예 의 혈청에 대하여 세균학적 질병에 대하여 검색한 결과 아 래의 표와 같다. 즉, Brucella 는 2246 개의 혈청 검사 결과 두 개체가 양성을 나타내었고, Leptospira 는 검사를 실시한 81 두 모두 음성이었다. Campylobacter 는 81 두중 17 두가 (21%) 양성 반응을 나타내었다. Q fever 에 대하여는 185 두중 18 두가 (9.7%) 양성을 나타내었다.

1) 1차년도 혈청학적 검사 결과

농장수	가검물수	항 체 양 성 수			
		Brucella ¹	Leptospira ²	Campylobacter ³	Q fever ⁴
153	967	2/967 ^b	0/81	17/81	18/185

양성기준 ; 1 ; 1:100, 2 ; 1:100, 3 ; 1:100, 4 ; 1:20, 5 ; 양성수/검사두수



분리주의 genotyping을 위한 RT-PCR 결과. 3-6 번 lane은 BVDV type I, II에 대한 공통 primer를 이용하였으며 7-10번 lane은 type II 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과이다.

Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : BVDV, NY-1 strain Lane 2 : Negative control (MDBK cell)

Lanes 3&7 : Bo 41 isolate Lanes 4&8 : Bo 333 isolate

Lanes 5&9 : Bo 373 isolate Lanes 6&10 : Bo 388 isolate

2. 유산관련 원인체에 대한 혈청학적 조사

가. 세균성 원인체

총 2246 예 의 혈청에 대하여 세균학적 질병에 대하여 검색한 결과 아 래의 표와 같다. 즉, *Brucella* 는 2246 개의 혈청 검사 결과 두 개체가 양성을 나타내었고, *Leptospira* 는 검사를 실시한 81 두 모두 음성이었다. *Campylobacter* 는 81 두중 17 두가 (21%) 양성 반응을 나타내었다. Q fever 에 대하여는 185 두중 18 두가 (9.7%) 양성을 나타내었다.

1) 1차년도 혈청학적 검사 결과

농장수	가검물수	항 체 양 성 수			
		<i>Brucella</i> ¹	<i>Leptospira</i> ²	<i>Campylobacter</i> ³	Q fever ⁴
153	967	2/967 ⁵	0/81	17/81	18/185

양성기준 ; 1 ; $\geq 1:100$, 2 ; $\geq 1:100$, 3 ; $\geq 1:100$, 4 ; $\geq 1:20$, 5 ; 양성수/검사두수

2) 2차년도 혈청학적 검사 결과

지 역	혈 청 수	Brucella 음 성	Brucella 양 성
경 기	162	162	0
총 남	26	26	0
총 북	3	3	0
경 북	112	112	0
전 남	424	424	0
지 역 미 상	115	115	0
총 계	787	787	0

3) 3차년도 혈청학적 검사 결과

지 역	혈 청 수	Brucella 음 성	Brucella 양 성
경 기	163	163	0
총 북	78	78	0
강 원	1	1	0
경 남	12	12	0
전 남	22	22	0
지 역 미 상	216	216	0
총 계	492	492	0

4) 총 혈청가검물에 대한 항체 양성수

질병명	항 체 양 성 수			
	Brucella	Leptospira	Campylobacter	Q fever
양성수/가검물수	2/2,246	0/81	17/81	18/185

* Brucella 에 대하여는 전제 우군들에 대하여 실시 하였으나 기타는 유산을나타낸 개체들에 대하여 실시 하였음.

나. 바이러스성 원인체

소 유산증의 virus 성 원인체에 대한 혈청학적 검사는 혈청 중화반응을 이용하여 실시하였으며 이때 사용한 virus 는 IBR virus (PQ7 strain), BVD virus (NY-1 strain) 및 Akabane virus (OBE-1 strain)을 사용하였고, 세포주는 MDBK(Madin-Darby bovine kidney) cells 와 Vero cells 을 사용하여 실시 하였다.

아래 표에서와 같이 본 연구기간 동안 2,979 예 의 가검 혈청에 대하여 소 유산 관련 virus 에 대한 혈청학적 검사 결과 BVD virus 에 대하여 77.0% 로 가장 높게 나타났고, Akabane virus 에 대하여는 53.3%, IBR virus 에 대하여는 10.6% 로 나타났다.

표 IBRV, BVDV, Akabane virus 에 대한 항체 양성을

혈청수	항 체 양 성 율		
	IBRV	BVDV	Akabane virus
1 년차 711	43 (6.05%)	578 (81.29%)	298 (41.91%)
2 년차 1,846	223 (12.1%)	1,390 (75.3%)	994 (53.8%)
3 년차 422	51 (12.1%)	327 (77.5%)	297 (70.4%)
총 계 2,979	317 (10.6%)	2,295 (77.0%)	1,589 (53.3%)

3. 유산 관련 원인체에 대한 진단 기법 확립 및 개발

가. 세균성 원인체

본 연구를 위하여 확보한 소 유산증 관련 세균성 원인체의 표준균주 및 야외 분리주는 다음과 같다. 이들 균주는 국립수의과학검역원에서 분양 또는 야외 가검물에서 분리하여 사용하였다.

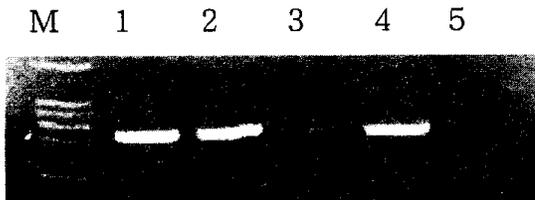
- *Brucella abortus* 1119 및 야외 분리주

- *Leptospira interrogans* serovar *icterohemorrhagiae*
Leptospira interrogans serovar *pomona*
Leptospira interrogans serovar *canicola*
Leptospira interrogans serovar *hardjo*

- *Campylobacter fetus* subsp *fetus*
Campylobacter fetus subsp *veneralis*

1) PCR 을 이용한 진단기법 확립

Brucella abortus 의 효율적인 진단을 위하여 사용한 PCR Primer 는 BCSP1 (F) GTATCGTTCTTGAAGCCTAC, 및 (R) GTGCATTTC AATAGGCTAGAG 와 OMPB (F) ACTGGAGGTCAGAAATGAA 및 (R) GATTAGAACGAACGCTGGAA 을 사용하여 PCR 조건 으로는 (94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min)-30cycles, 72°C-5min 로 실시한 결과 아래 그림과 같이 *B abortus* 에 특이적인 band 을 확인할수 있었다.



Lane M ; Molecular weight Marker,
lanes 1-4 ; *Brucella abortus*
lanes 5 ; negative control

3. 유산 관련 원인체에 대한 진단 기법 확립 및 개발

가. 세균성 원인체

본 연구를 위하여 확보한 소 유산증 관련 세균성 원인체의 표준균주 및 아외 분리주는 다음과 같다. 이들 균주는 국립수의과학검역원에서 분양 또는 아외 가검물에서 분리하여 사용하였다.

- *Brucella abortus* 1119 및 아외 분리주

- *Leptospira interrogans serovar icterohemorrhagiae*
Leptospira interrogans serovar pomona
Leptospira interrogans serovar canicola
Leptospira interrogans serovar hardjo

- *Campylobacter fetus subsp fetus*
Campylobacter fetus subsp venerealis

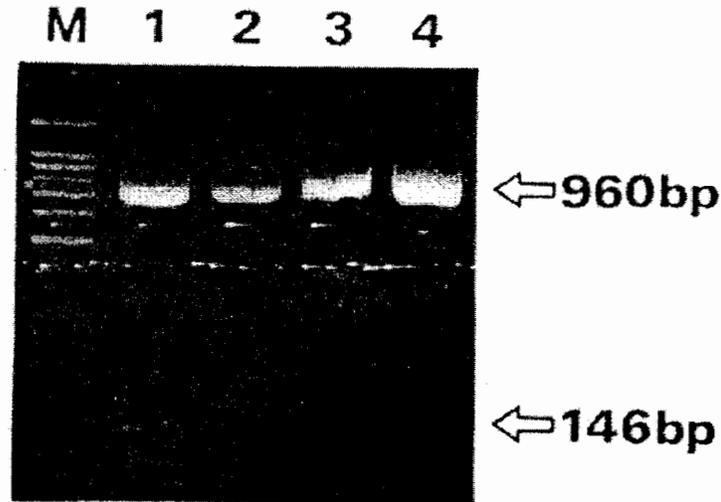
1) PCR 을 이용한 진단기법 확립

Brucella abortus 의 효율적인 진단을 위하여 사용한 PCR Primer 는 BCSP1 (F) GTATCGTICTTGAAGCCTAC, 및 (R) GTGCATTTCAATAGGCTAGAG 와 OMPB (F) ACTGGAGGTCAGAAATGAA 및 (R) GATTAGAACGAACGCTGGAA 을 사용하여 PCR 조건 으로는 (94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min)-30cycles, 72°C-5min 로 실시한 결과 아래 그림과 같이 *B. abortus* 에 특이적인 band 을 확인할수 있었다.



Lane M ; Molecular weight Marker,
lanes 1-4 ; *Brucella abortus*
lanes 5 ; negative control

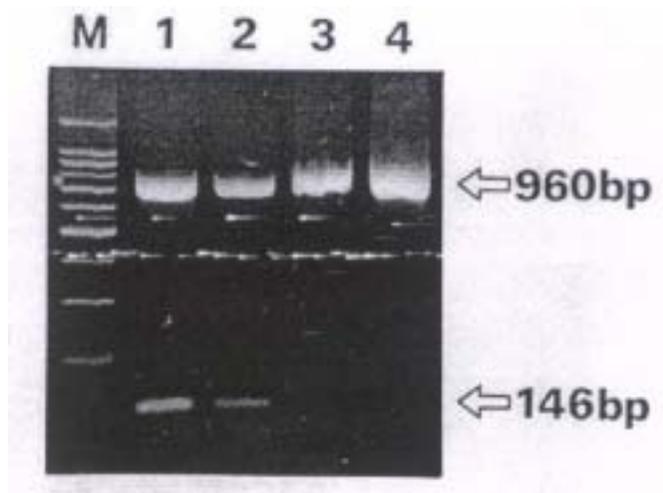
Campylobacter fetus 에 대하여는 Primer 로 MG3F GGTAGCCGCGAGCTGCTAAGAT 및 MG4R TAGCTACAATAAGGACAACCT 와 Ven SR CTTAGCAGTTTGCGATATT GCCATT 및 Ven SF GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT 을 사용하였고 PCR 조건 으로는 (95°C -20sec, 50°C-20sec, 72°C-2min)-30cycles, 72°C-10min 로 한결과 아래 그림과 같이 *C fetus* 에 대하여 특이적인 band 을 확인 할수 있었다.



Lane M ; Molecular weight Marker (1kb ladder),
lanes 1-2 ; *Campylobacter fetus subsp. veneralis*,
lanes 3-4 ; *Campylobacter fetus subsp. fetus*

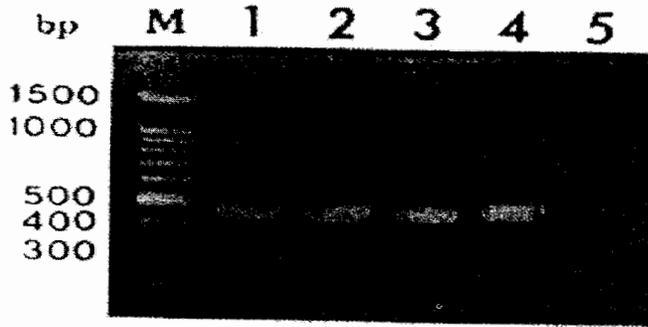
Leptospira 에 대하여는 Primer 로 LeptoIn Forward CTTGACATGGAGTGGGAATC 및 LeptoIn Reverse TGCGGTTGGCAAAGACCAC 을 사용하여 (94°C-15sec, 53°C-20sec, 72°C-1min)-30cycles, 72°C-5min 의 조건에서 PCR 을 실시한 결과 아래와 그림과 같이 특이적인 band을 확인 할수 있었다.

Campylobacter fetus 에 대하여는 Primer 로 MG3F GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT 및 MG4R TAGCTACAATAAGGACAACCT 와 Ven SR CTTAGCAGTTTGCGATATT GCCATT 및 Ven SF GCTTTTGGAGATAACAATAAGAGCTT 을 사용하였고 PCR 조건 으로는 (95°C -20sec, 50°C-20sec, 72°C-2min)-30cycles, 72°C-10min 로 한결과 아래 그림과 같이 *C. fetus* 에 대하여 특이적인 band 을 확인 할수 있었다.



Lane M ; Molecular weight Marker (1kb ladder),
lanes 1-2 ; *Campylobacter fetus subsp. veneralis*,
lanes 3-4 ; *Campylobacter fetus subsp. fetus*

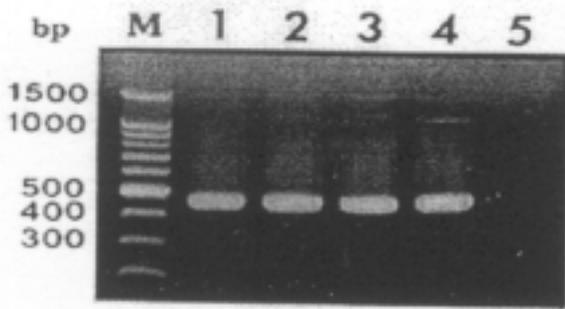
Leptospira 에 대하여는 Primer 로 LeptoIn Forward CTTGACATGGAGTGGAAATC 및 LeptoIn Reverse TGCGGTITGGCAAAGACCAC 을 사용하여 (94°C-15sec, 53°C-20sec, 72°C-1min)-30cycles, 72°C-5min 의 조건에서 PCR 을 실시한 결과 아래와 그림과 같이 특이적인 band을 확인 할수 있었다.



Lane M ; Molecular weight Marker (1 kb ladder),
 lane 1 ; *Leptospira interrogans* serovar *icterohemorrhagiae*
 lane 2 ; *Leptospira interrogans* serovar *pomona*
 lane 3 ; *Leptospira interrogans* serovar *canicola*
 lane 4 ; *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*
 lane 5 ; No template DNA (negative control)

2) 재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단 기법 연구

Brucella 감염증에 대한 효율적인 진단 기법을 개발하기 위하여 기존의 진단 기법인 시험관응집반응법에서 양성을 나타낸 가검혈청들을 이용하여 유전자 재조합에 의하여 얻은 16.5kDa 와 26kDa 의 항원을 이용하여 ELISA 기법을 확립하고자 하였다. 아래의 그림에서 보는 것처럼 이들 두 항원은 모두 시험관 응집 반응에서 높은 항체가를 나타내는 개체들에 대하여는 상관관계가 매우 낮게 나타났으나, 낮은 항체가 즉 감염 초기로 생각되는 개체에 대하여는 비교적 높은 상관관계를 나타냄으로 이 기법은 우군에서 감염의 우려가 있는 경우 조기 발견을 위하여 사용하는것에는 바람직할것으로 생각된다.



- Lane M ; Molecular weight Marker (1 kb ladder),
 lane 1 ; *Leptospira interrogans serovar icterohemorrhagiae*
 lane 2 ; *Leptospira interrogans serovar pomona*
 lane 3 ; *Leptospira interrogans serovar canicola*
 lane 4 ; *Leptospira interrogans serovar hardjo*
 lane 5 ; No template DNA (negative control)

2) 재조합 항원을 이용한 혈청학적 진단 기법 연구

Brucella 감염증에 대한 효율적인 진단 기법을 개발하기 위하여 기존의 진단 기법인 시험관 응집 반응법에서 양성을 나타낸 가검 혈청들을 이용하여 유전자 재조합에 의하여 얻은 16.5kDa와 26kDa의 항원을 이용하여 ELISA 기법을 확립하고자 하였다. 아래의 그림에서 보는 것처럼 이들 두 항원은 모두 시험관 응집 반응에서 높은 항체를 나타내는 개체들에 대하여는 상관관계가 매우 낮게 나타났으나, 낮은 항체가 즉 감염 초기로 생각되는 개체에 대하여는 비교적 높은 상관관계를 나타냄으로 이 기법은 우균에서 감염의 우려가 있는 경우 조기 발견을 위하여 사용하는 것에는 바람직할 것으로 생각된다.

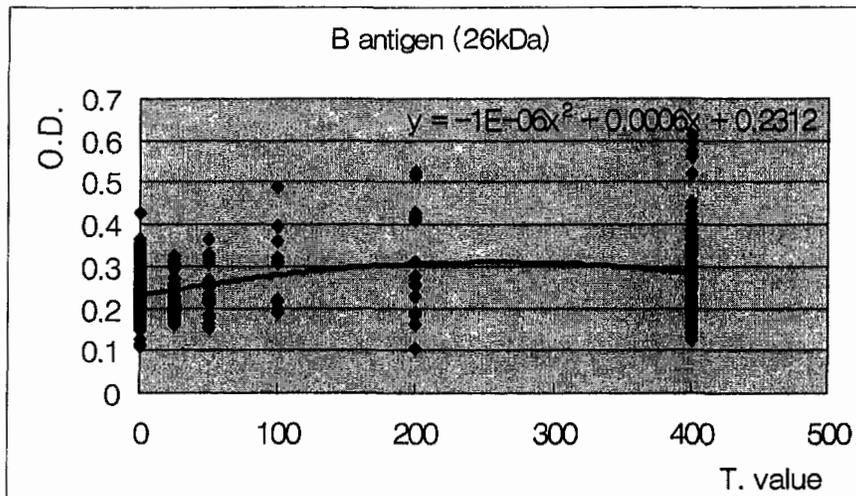
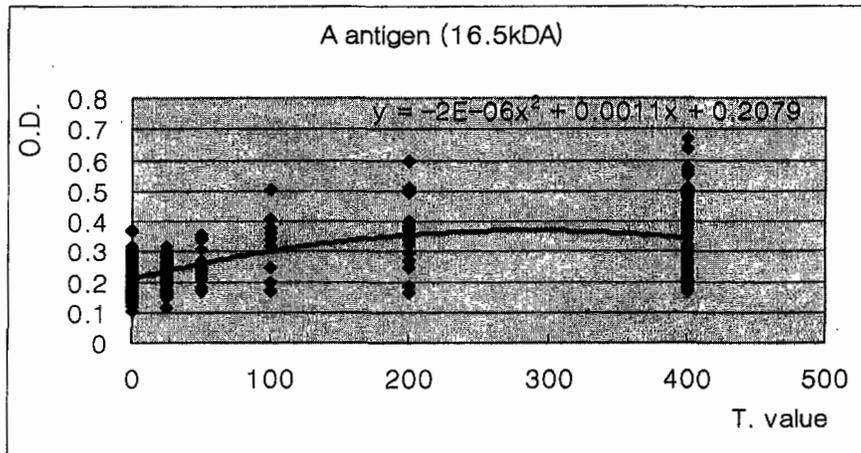


그림. *Brucella abortus* 재조합 항원을 이용한 ELISA 기법 개발

나. 바이러스성 원인체

1) PCR 을 이용한 진단기법 확립

Akabane virus 는 S gene을 target.으로 하여 Nested RT-PCR을 이용하여 진단 기법을 확립 하였다. 1차 PCR 은 forward primer(AKA F2) : 5'-ACCAGAAGAAGGCCAAGTAG-3' 및 reverse primer(AKA R2) : 5'-CACACGGTGCATGTCGATAA-3'을 이용하였고, 2차 PCR 은 forward primer(AKA F3) : 5'-GCAGTGCAAGGCTAATCAGA-3' 와 reverse primer(AKA

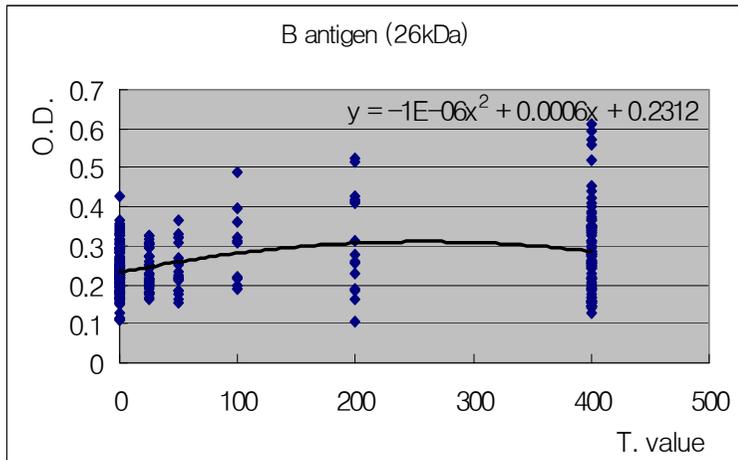
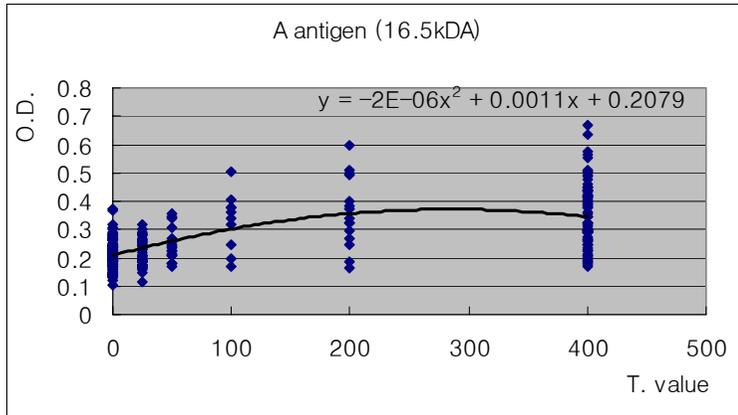


그림. *Brucella abortus* 재조합 항원을 이용한 ELISA 기법 개발

나. 바이러스성 원인체

1) PCR 을 이용한 진단기법 확립

Akabane virus 는 S gene을 target으로 하여 Nested RT-PCR을 이용하여 진단 기법을 확립 하였다. 1차 PCR 은 forward primer(AKA F2) : 5'-ACCAGAAGAAGGCCAAGTAG-3' 및 reverse primer(AKA R2) : 5'-CACACGGTGCATGTCGATAA-3'을 이용하였고, 2차 PCR 은 forward primer(AKA F3) : 5'-GCAGTGAAGGCTAATCAGA-3' 와 reverse primer(AKA

R2) : 5'-CACACGGTGCATGTGATAA-3'을 이용하여 다음과 같은 PCR 조건에서 Denaturation Tm : 95°C , 30sec, Annealing Tm : 58°C , 30sec, Elongation Tm : 72°C , 45sec 로 30 회 실시하여 아래의 그림과 같이 347bp 와 165bp 의 특이적인 PCR products 을 얻을수 있었다.

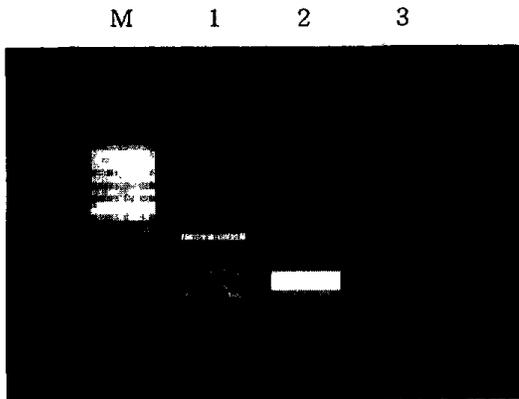


그림. RT-PCR 기법을 이용한 Akabane virus 의 검출

Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1: Akabane virus, OBE-1 strain (1st PCR)
Lane 2 : Akabane virus, OBE-1 strain (nested PCR) , Lane 3 : negative control

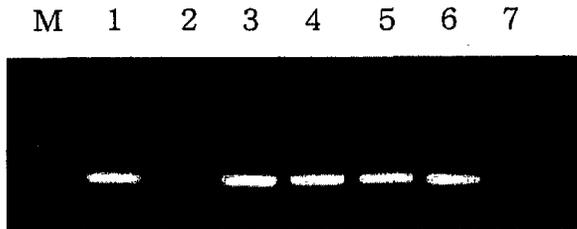


그림. Field sample에서의 Akabane virus RT-PCR

Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1 : Akabane virus OBE-1 strain
Lane 2 : negative control, Lane 3 : sample No. Bo 152
Lane 4 : sample No. Bo 156, Lane 5 : sample No. Bo 158
Lane 6 : sample No Bo 163, Lane 7 : sample No Bo 160

R2) : 5'-CACACGGTGCATGTCGATAA-3'을 이용하여 다음과 같은 PCR 조건에서 Denaturation Tm : 95°C , 30sec, Annealing Tm : 58°C , 30sec, Elongation Tm : 72°C , 45sec 로 30 회 실시하여 아래의 그림과 같이 347bp 와 165bp 의 특이적인 PCR products 을 얻을수 있었다.

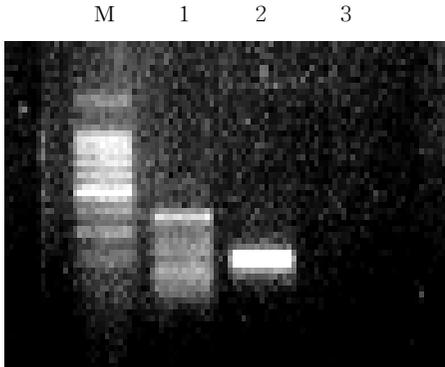


그림. RT-PCR 기법을 이용한 Akabane virus 의 검출

Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1: Akabane virus, OBE-1 strain (1st PCR)

Lane 2 : Akabane virus, OBE-1 strain (nested PCR) , Lane 3 : negative control



그림. Field sample에서의 Akabane virus RT-PCR

Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1 : Akabane virus OBE-1 strain

Lane 2 : negative control, Lane 3 : sample No. Bo 152

Lane 4 : sample No. Bo 156, Lane 5 : sample No. Bo 158

Lane 6 : sample No Bo 163, Lane 7 : sample No Bo 160

BVD (Bovine Viral Diarrhea) virus 에 대한 진단 기법 확립은 5'-UTR(Untranslated region)에
 서 BVDV type&의 common detection primer를 제작하여 RT-PCR기법을 이용해 수행하였으
 며, 이때 사용한 primer 는 forward primer(BVDV F1) : 5'-GCCATGCCCTTAGTAGGACT-3'
 및 reverse primer(BVDV CR1) : 5'-GCWRCACCCTATCAGGCTGT-3' (W : A&T, R :
 T&C) 이었으며 PCR 조건은 Denaturation Tm : 95°C , 30sec, Annealing Tm : 52°C ,
 30sec, Elongation Tm : 72°C , 30sec 로 30 회 실시 한결과 아래 그림 과 같이 237bp 의 특
 이적인 band 을 확인할수 있었다.

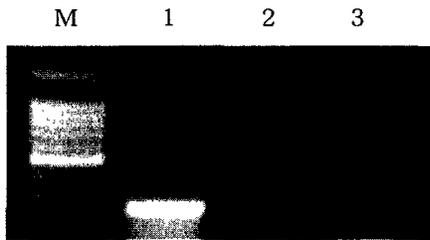


그림. RT-PCR 기법을 이용한 BVD virus 검출
 Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1 : BVDV, NY-1 strain
 Lane 2 : Sample No. Bo333, Lane 3 : negtive control

RT-PCR 기법에 대한 Sensitivity test

BVDV 의 RT-PCR 에 대한 sensitivity test 결과 2×10^0 TCID₅₀/ml
 의 농도까지 바이러스를 검출할수 있었다.

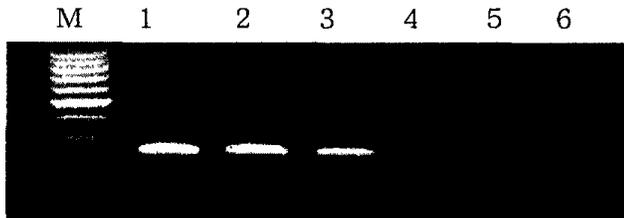


그림. BVDV NY-1 주를 2.0×10^4 TCID₅₀/ml에서 2.0×10^0 TCID₅₀/ml 농도까지
 연속 희석하여 RT-PCR을 실시한 결과

BVD (Bovine Viral Diarrhea) virus 에 대한 진단 기법 확립은 5'-UTR(Untranslated region)에 서 BVDV type 1 & 2 의 common detection primer를 제작하여 RT-PCR기법을 이용해 수행하였으며, 이때 사용한 primer 는 forward primer(BVDV F1) : 5'-GCCATGCCCTTAGTAGGACT-3' 및 reverse primer(BVDV CR1) : 5'-GCWRCACCCTATCAGGCTGT-3' (W : A&T, R : T&C) 이었으며 PCR 조건은 Denaturation Tm : 95°C , 30sec, Annealing Tm : 52°C , 30sec, Elongation Tm : 72°C , 30sec 로 30 회 실시 한결과 아래 그림 과 같이 237bp 의 특이적인 band 을 확인할수 있었다.

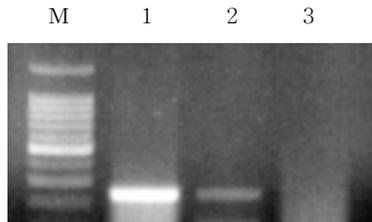


그림. RT-PCR 기법을 이용한 BVD virus 검출
 Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1 : BVDV, NY-1 strain
 Lane 2 : Sample No. Bo333, Lane 3 : negative control

RT-PCR 기법에 대한 Sensitivity test

BVDV 의 RT-PCR 에 대한 sensitivity test 결과 2×10^0 TCID₅₀/ml 의 농도까지 바이러스를 검출할수 있었다.

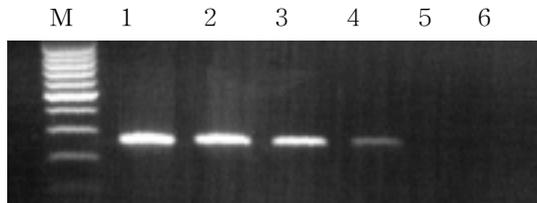


그림. BVDV NY-1 주를 2.0×10^4 TCID₅₀/ml에서 2.0×10^0 TCID₅₀/ml 농도까지 연속 희석하여 RT-PCR을 실시한 결과

Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : 2×10^4 TCID₅₀/ml

Lane 3 : 2×10^2 TCID₅₀/ml

Lane 5 : 2×10^0 TCID₅₀/ml

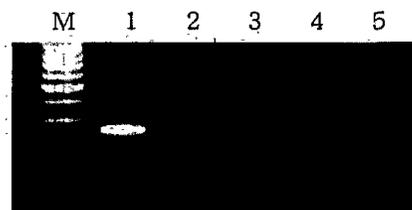
Lane 2 : 2×10^3 TCID₅₀/ml

Lane 4 : 2×10^1 TCID₅₀/ml

Lane 6 : Negative control

RT-PCR 법에 대한 specificity test

BVDV 의 RT-PCR 에 대한 specificity test 실시 결과 다른 바이러스와의 교차반응이 없음을 확인할 수 있었다.



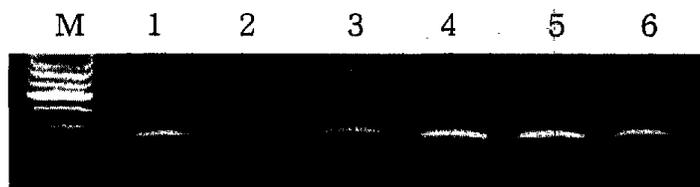
Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : BVDV, NY-1 strain

Lane 2 : Negative control

Lane 3 : Akabane virus, OBE-1 strain

유산 가검물로부터 RT-PCR을 이용하여 BVD Virus 의 검출



Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : BVDV NY-1

Lane 2 : Negative control (MDBK cell)

Lane 3 : BVDV Bo 41

Lane 4 : BVDV Bo 333

Lane 5 : BVDV Bo 373

Lane 6 : BVDV Bo 388

IBR(Infectious Bovine Rhinotracheitis) virus 는 Glycoprotein D region(gpD)에대한 primer-제작

Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : 2×10^4 TCID₅₀/ml

Lane 3 : 2×10^2 TCID₅₀/ml

Lane 5 : 2×10^0 TCID₅₀/ml

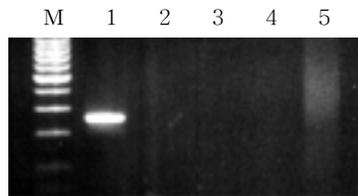
Lane 2 : 2×10^3 TCID₅₀/ml

Lane 4 : 2×10^1 TCID₅₀/ml

Lane 6 : Negative control

RT-PCR 법에 대한 specificity test

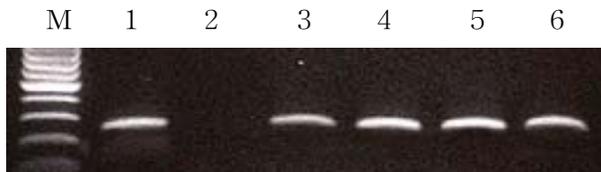
BVDV 의 RT-PCR 에 대한 specificity test 실시 결과 다른 바이러스와의 교차반응이 없음을 확인할 수 있었다.



Lane M : 100bp DNA ladder Lane 1 : BVDV, NY-1 strain

Lane 2 : Negative control Lane 3 : Akabane virus, OBE-1 strain

유산 가검물로부터 RT-PCR을 이용하여 BVD Virus 의 검출



Lane M : 100bp DNA ladder

Lane 1 : BVDV NY-1 Lane 2 : Negative control (MDBK cell)

Lane 3 : BVDV Bo 41 Lane 4 : BVDV Bo 333

Lane 5 : BVDV Bo 373 Lane 6 : BVDV Bo 388

IBR(Infectious Bovine Rhinotracheitis) virus 는 Glycoprotein D region(gpD)에대한 primer제작

하였으며, forward primer(IBR F1) : 5'-CATACCGTCGCCCTTCGCAG-3' 및 reverse primer(IBR R1) : 5'-GAGTTTCGAGAACCAGCAGT-3'을 사용하여, PCR 조건 Denaturation Tm : 94°C , 30sec, Annealing Tm : 54°C , 30sec, Elongation Tm : 72°C , 30sec 을 30 회 실시하여 아래 그림 과 같이 454bp 크기의 특이적인 band 을 확인할수 있었다.

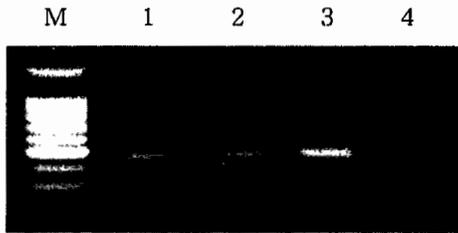


그림. PCR 기법을 이용한 IBR virus 의 진단기법 확립

Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1~3 : IBR virus, PQ7 strain, Lane 4 : negative control

2) 직접 형광 항체법에 의한 BVD, IBR 바이러스의 검출

BVD 와 IBR virus를 검출하기 위하여 각각의 direct FA conjugate (VMRD, INC, Catalog No. 210-62-BVD 와 Catalog No. 210-690 IBR)를 이용하여 형광항체법에 의하여 실시하고 형광현 미경상에서 관찰하였다. 관찰결과 가검물 중 BVD virus 및 IBR virus 가 각각 16 개 및 5 개 가 검출 되었다.

4. 오염원 추적을 위한 부루셀라균에 대한 분자생물학적 진단

부루셀라병의 효율적인 방역을 위해서는 효율적이고 정확한 진단이 요구된다. 현재 사용되고 있는 진단방법들은 부루셀라병의 screening을 목적으로 개발되어 효과를 거두고 있다. 하지만 *Brucella* spp.와 백신 strain에 의한 것인지 구분하기가 어려운 경우가 많았다.

이에 최근 분자생물학적 기법의 발달과 함께 PCR을 이용하여 적용되는 URP(Universal Rice Primer) primer가 식물체로부터 유래된 repetitive sequence로부터 개발되었다. 이 primer는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하는 다양한 생물종의 PCR 핵산지문에 모두 이용 가능한 universal

하였으며, forward primer(IBR F1) : 5'-CATACCGTCGCCCTTCGCAG-3' 및 reverse primer(IBR R1) : 5'-GAGTTTCGAGAACCAGCAGT-3'을 사용하여, PCR 조건 Denaturation Tm : 94°C , 30sec, Annealing Tm : 54°C , 30sec, Elongation Tm : 72°C , 30sec 을 30 회 실시하여 아래 그림 과 같이 454bp 크기의 특이적인 band 을 확인할수 있었다.

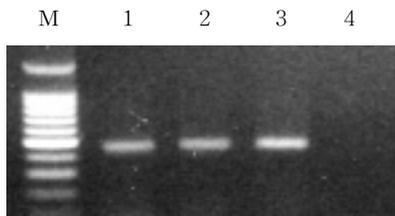


그림. PCR 기법을 이용한 IBR virus 의 진단기법 확립

Lane M : 100bp DNA ladder, Lane 1~3 : IBR virus, PQ7 strain, Lane 4 : negative control

2) 직접 형광 항체법에 의한 BVD, IBR 바이러스의 검출

BVD 와 IBR virus를 검출하기 위하여 각각의 direct FA conjugate (VMRD, INC, Catalog No. 210-62-BVD 와 Catalog No. 210-600 IBR)를 이용하여 형광항체법에 의하여 실시하고 형광현 미경상에서 관찰하였다. 관찰결과 가검물 중 BVD virus 및 IBR virus 가 각각 16 개 및 5 개 가 검출 되었다.

4. 오염원 추적을 위한 부루셀라균에 대한 분자생물학적 진단

부루셀라병의 효율적인 방역을 위해서는 효율적이고 정확한 진단이 요구된다. 현재 사용되고 있는 진단 방법들은 부루셀라병의 screening 을 목적으로 개발되어 효과를 거두고 있다. 하지만 *Brucella* spp.와 백신 strain에 의한 것인 지 구분하기가 어려운 경우가 많았다.

이에 최근 분자생물학적 기법의 발달과 함께 PCR을 이용하여 적용되는 URP(Universal Rice Primer) primer가 식물체로부터 유래된 repetitive sequence로부터 개발되었다. 이 primer는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하는 다양한 생물종의 PCR 핵산 지문에 모두 이용 가능한 universal

primer의 특징을 가지고 있다. 특히, 이 primer는 20 mer로서 55 이상의 annealing 온도에서 PCR반응을 수행할 수 있어 높은 재현성으로 안전하게 PCR 다형성 밴드를 검출할 수 있고, 특히 PCR 생성물의 분리와 이용이 매우 용이하다. 본 연구는 부루셀라균에 URP primer를 적용하여 부루셀라균의 strain typing을 시도하였다.

URP-primer의 검색 ; 국내에서 분리된 부루셀라 임상균주를 대상으로 PCR 핵산지문법을 실시하였다. 상업적으로 판매되고 있는 URP-primer는 총 12가지 종류가 있다. fig 1과 fig 2는 이들 12종류의 URP-primer들 중에서 *Brucella*의 임상분리균주들을 감별하는데 용이한 primer를 찾는 연구의 결과를 나타내었다. fig 1과 fig 2에서는 URP 2, 3, 6, 9의 4가지를 이용하여 DNA 다형성 양상을 살펴보았다. 부루셀라균주에 따라 0.4 kb에서 2 kb사이에서 10개 이상의 다형성 band를 나타내었다.

URP 2, 3, 6, 9를 사용하였을 때 PCR증폭 산물에서의 젤 양상을 보면 특이적으로 나타나는 PCR band중 23개의 band가 공통적으로 존재하고 있는 것으로 확인되었다. fig 2에서 보는바와 같이 URP-9를 사용하였을 때 0.3 kb과 2.6 kb사이에서 임상균주에 따라 DNA 다형성을 나타내었다. 임상분리균주 7번에 대한 PCR 증폭산물에서 1.1 kb의 밴드가 있는 외에는 임상분리균주 8번과 거의 유사한 밴드 type을 나타내었다. 그리고 임상분리균주 9번과 10번에 대한 URP-9를 사용하였을 때의 양상은 같은 밴드 type을 나타내었다. 임상분리균주 1번에서 6번까지에 대한 PCR 증폭산물에서 다양한 밴드 type을 나타내었다.

61개의 임상분리균주에의 적용 ; fig 3에서 fig 7까지도 역시 국내에서 분리된 부루셀라 임상분리균주에 대한 RAPD 결과를 나타낸 결과이다. fig 3은 61개의 임상균주중에서 12개의 균주를 무작위로 선택하고, URP-2를 이용하여 DNA를 증폭한 결과이다. 대부분의 결과에서 DNA 다형성의 모습이 보이지 않는 것을 확인하였고 다만 1.0 kb 이상에서 몇 가지 band를 확인할 수 있었으나 부분적이었다.

URP-9를 이용하여 증폭한 DNA 다형성 결과를 나타낸 fig 4에서는 19개의 임상균주를 사용하여 DNA를 증폭시켜 결과를 얻었는데, 0.3 kb에서 3 kb까지의 78종류의 다양한 크기의 DNA 다형성을 확인하였고 1.6 kb에서 하나의 주요 band가 확인되었으며, 0.5 kb이하에서도 여러 가지 band를 확인할 수 있었으며 균주간에 차이는 거의 확인되지 않았다.

fig 5는 URP-6을 이용한 DNA 다형성을 확인한 결과이다. 여러 가지 임상균주의 양상을 확인하였는데 한결같이 1.6kb에서 단 하나의 주요 band만을 확인할 수 있었다. 이러한 양상은 61

개의 임상분리균주중에서 무작위로 선택한 29개의 모든 균주에서 동일한 결과를 얻었다. 이들 다형성의 양상은 fig 1에서의 양상중 URP-6을 이용한 결과와 비교하면 어느 양상과도 비슷하지는 않았으므로 fig 1에서 사용된 균주와는 다른 균임을 예상할 수 있었다. 그리고, 다른 URP primer를 이용한 결과와도 비슷한 결과를 얻은 균주는 없었다.

URP-3을 이용한 fig 6은 28가지의 무작위 선택한 아외균주를 이용하여 역시 RAPD를 실시한 결과이다. 겔 양상에서 보는바와 같이 0.4 kb에서 희미한 band가 확인되었고 1 kb에서부터 3 kb까지 3종류의 band를 확인 할 수 있었다. 각 임상분리균주의 band마다 강도의 차이는 있지만 28가지 균주 모두에서 같은 양상의 band를 확인할 수 있었고, fig 1과 비교하면 0.7 kb정도의 크기에서 보이는 band가 사라진 것을 확인할 수 있었다.

fig 7은 역시 61가지의 균주중에서 선택된 10가지 종류의 아외균주를 fig 1과 fig 2에서 확인한 URP-3, 6, 9 primers를 이용하여 증폭하였다. URP-3을 이용한 fig 7의 A를 보면 역시 1 kb와 2 kb사이에서 약 3가지 DNA 다형성이 관찰되었다. fig 6에서 보인 3가지 band 양상과 비슷한 결과를 보였다. fig 7의 B에서는 URP-6을 이용한 결과이다. 1.65 kb의 크기에서 주요 band가 하나만 형성되었고, 이는 fig 5에서 관찰된 것과 거의 같았다. fig 7의 C에서는 URP-9를 이용한 결과인데 0.65 kb와 4 kb사이에서 상당히 많은 수의 band를 확인할 수 있었으나 서로간의 차이는 확인할 수 없었다.

본 연구에서는 *Brucella* 임상분리균주에 URP primers를 사용한 핵산지문법을 적용함에 있어서 URP-2, 3, 6, 9를 고루 활용해 보았으나 URP-2, 3, 6에서는 거의 다형성 양상을 찾아볼 수 없었던 반면 URP-9를 이용한 핵산 지문법에서는 부루셀라균주간에 특징적인 DNA 다형성 검출을 유용하게 나타낼 수 있었고 이들 61가지의 국내 임상분리균주들은 이들 URP primer들로 확인해 본 결과 결론적으로는 한 클론에서 분리된 하나의 균주라는 결론을 잠정적으로 내릴 수 있었다. 그리고 이들 URP primer를 이용하여 증폭된 DNA 다형성 양상으로 국내에서 분리된 임상균주의 종의 구별에 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각된다.

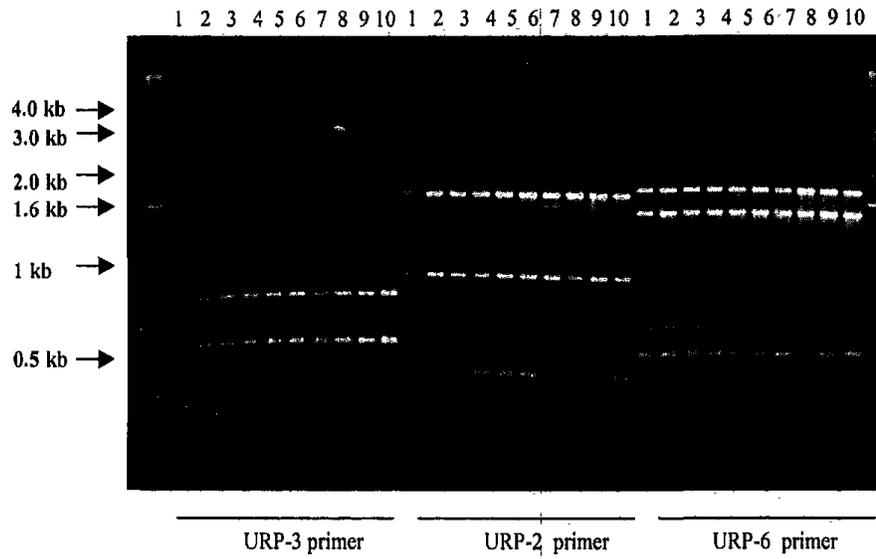


Fig 1. URP primer-2, 3, 6을 이용한 *Brucella abortus* (10 clinical isolates)에 대한 RAPD분석

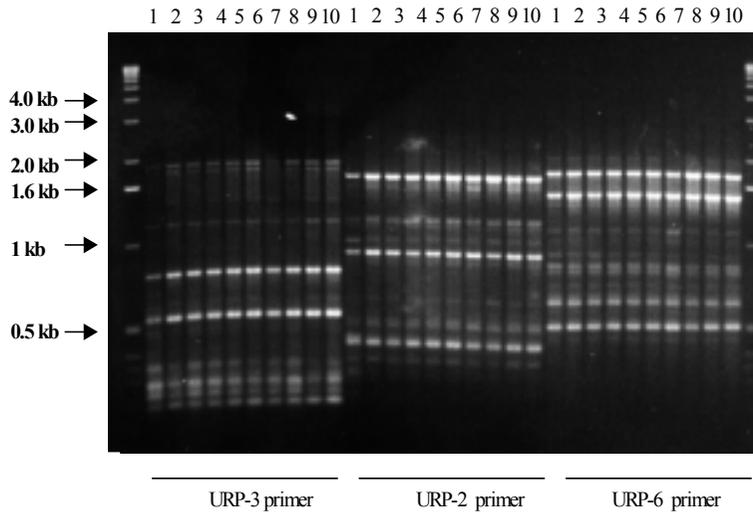


Fig 1. URP primer-2, 3, 6을 이용한 *Brucella abortus* (10 clinical isolates)에 대한 RAPD분석

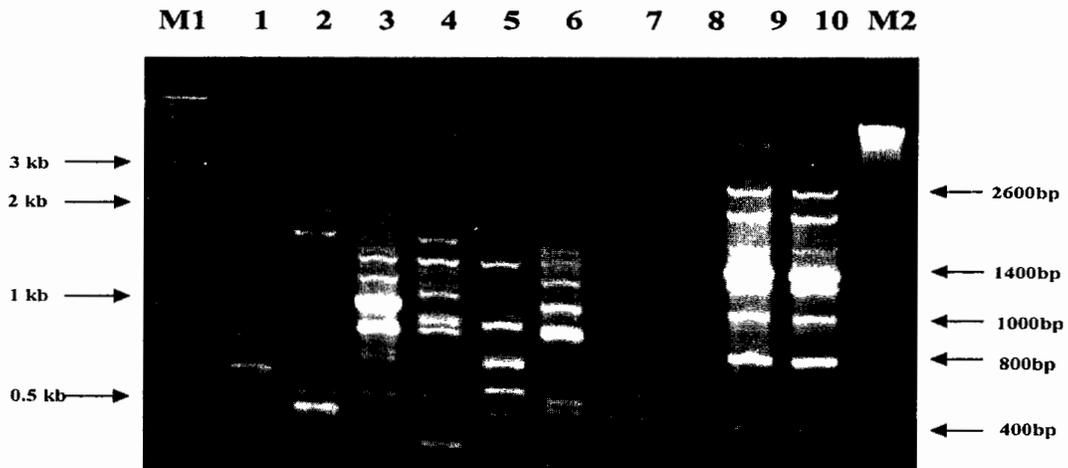


Fig 2. URP-9 primer 이용한 *Brucella abortus* (10 clinical isolates)에 대한 RAPD 분석

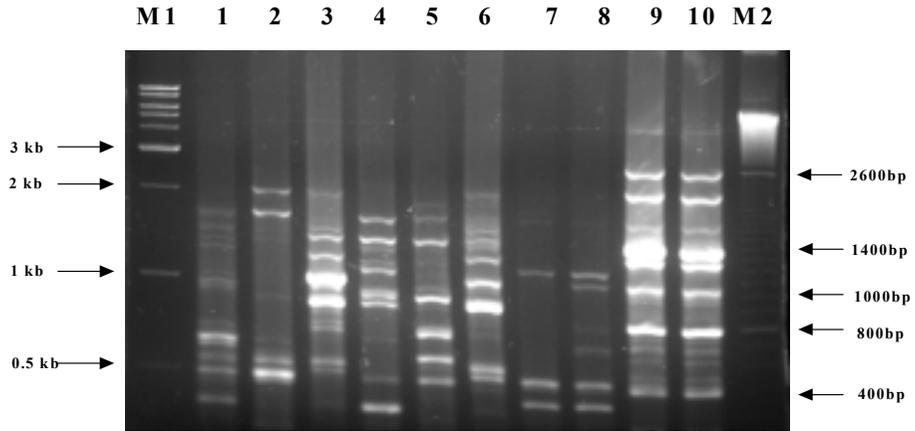


Fig 2. URP-9 primer 이용한 *Brucella abortus* (10 clinical isolates) 에 대한 RAPD 분석

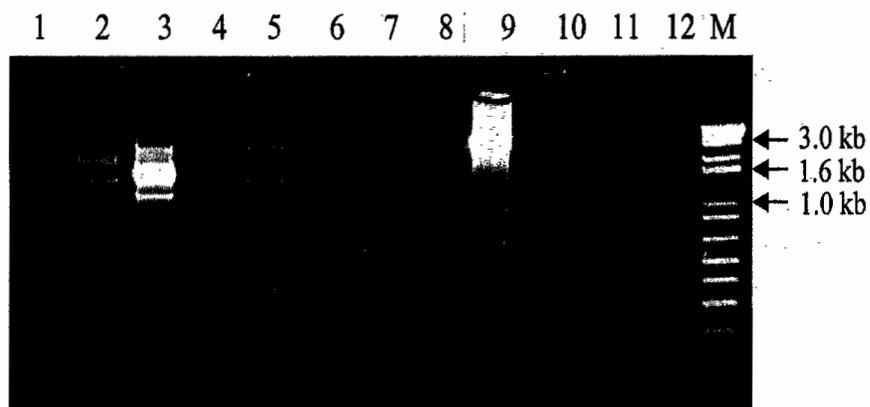


Fig 3. RAPD fingerprint profiles of 12 *Brucella* field isolates out of 61 field isolates with URP-2, M; 1kb DNA marker.

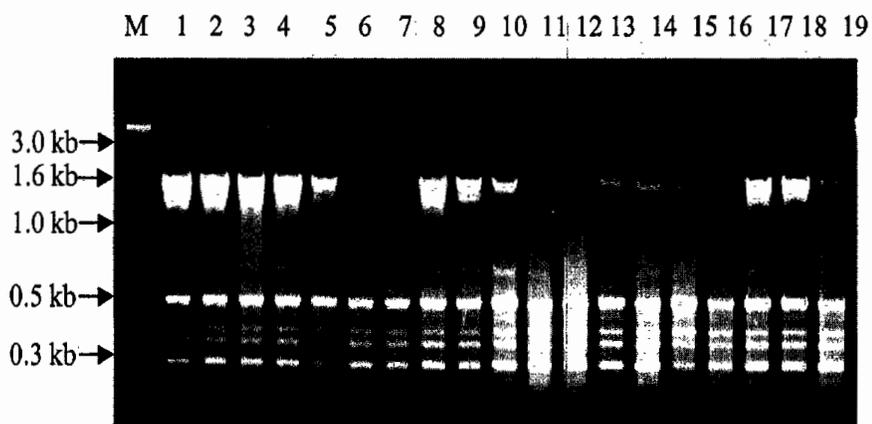


Fig 4. RAPD fingerprint profiles of 19 *Brucella* field strains out of 61 field isolates with URP-9, M; 1kb DNA marker.

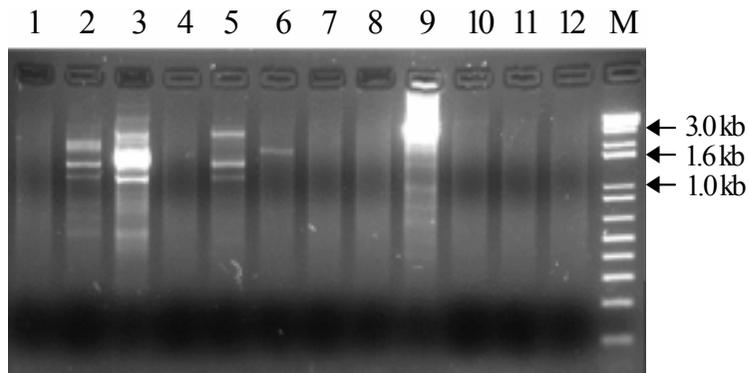


Fig 3. RAPD fingerprint profiles of 12 *Brucella* field isolates out of 61 field isolates with URP-2, M₁ 1kb DNA marker.

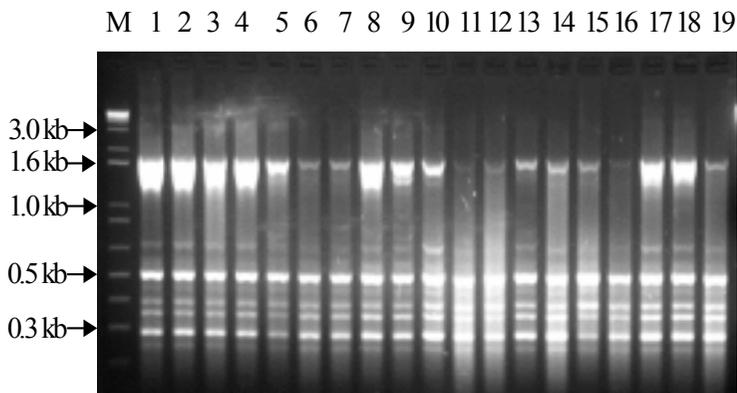


Fig 4. RAPD fingerprint profiles of 19 *Brucella* field strains out of 61 field isolates with URP-9, M₁ 1kb DNA marker.

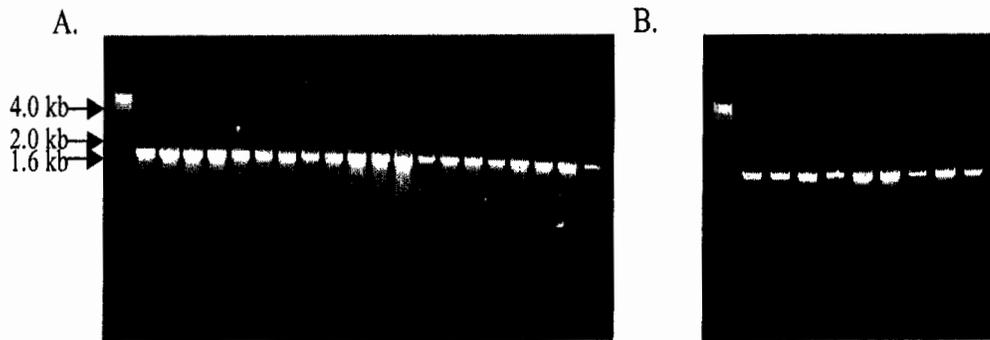


Fig 5. RAPD fingerprint profiles of 29 *Brucella* field isolates out of 61 field isolates with URP-6, M; 1 kb DNA marker.

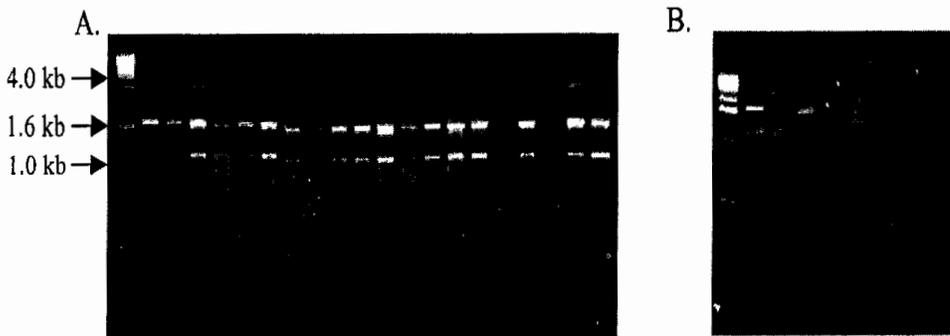


Fig 6. RAPD fingerprint profiles of 29 *Brucella* field isolates out of 61 field isolates with URP-3, M; 1 kb DNA marker.

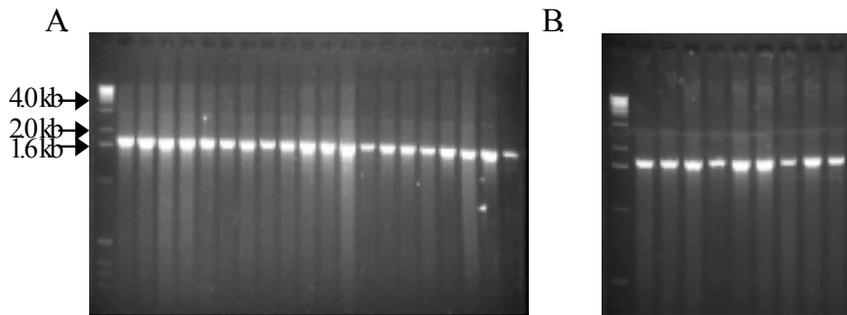


Fig 5. RAPD fingerprint profiles of 29 *Brucella* field isolates out of 61 field isolates with URP-6, M₁ 1 kb DNA marker.

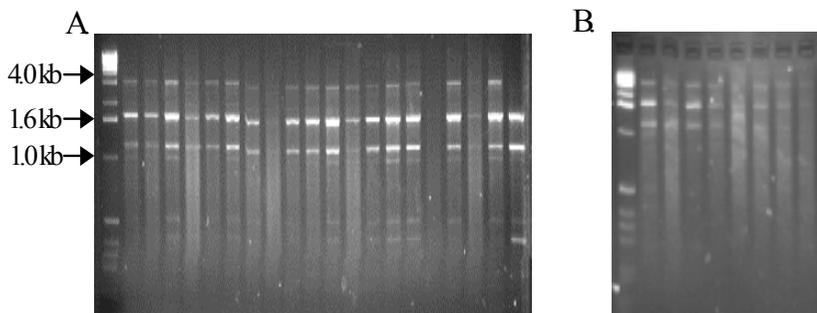


Fig 6. RAPD fingerprint profiles of 29 *Brucella* field isolates out of 61 field isolates with URP-3, M₁ 1 kb DNA marker.

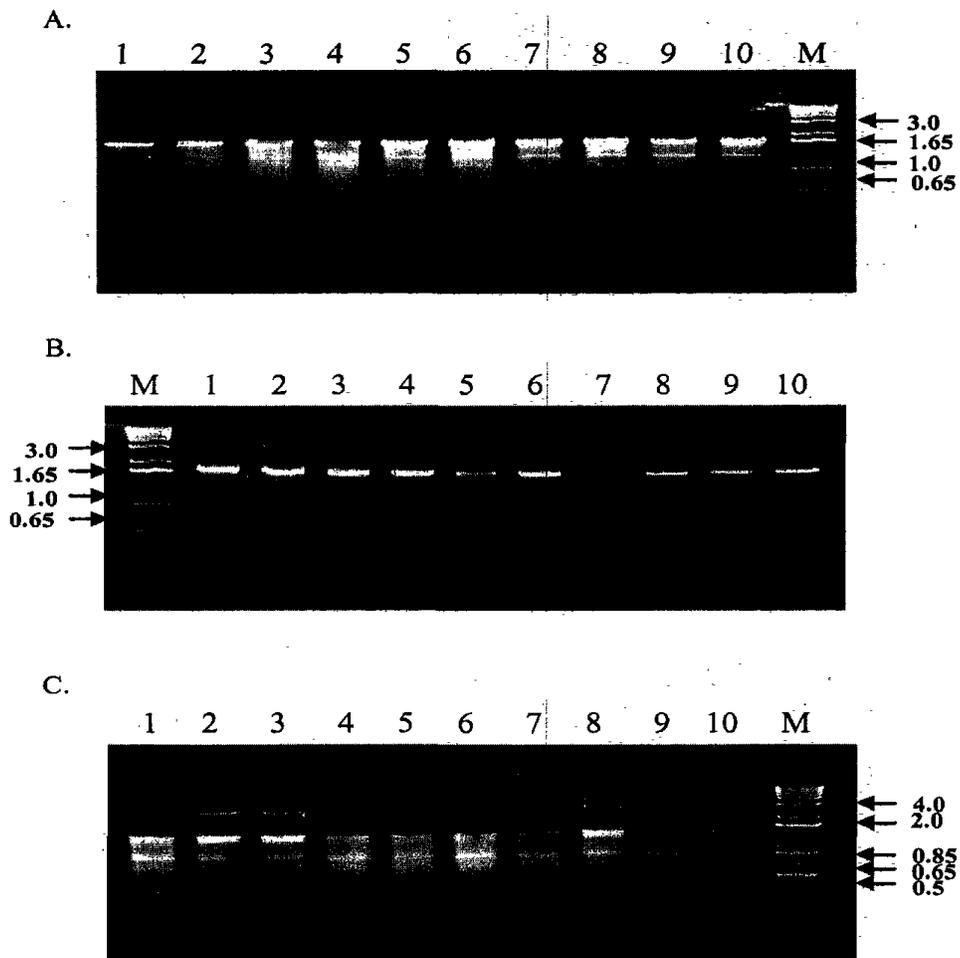


Fig 7. RAPD patterns of 10 *B. abortus* field strains out of 61 field isolates. Panel A, amplification patterns by using URP-3 primer ; Panel B, amplification patterns by using URP-6 primer ; Panel C, amplification pattern by using URP-9 primer M; 1kb plus DNA marker.

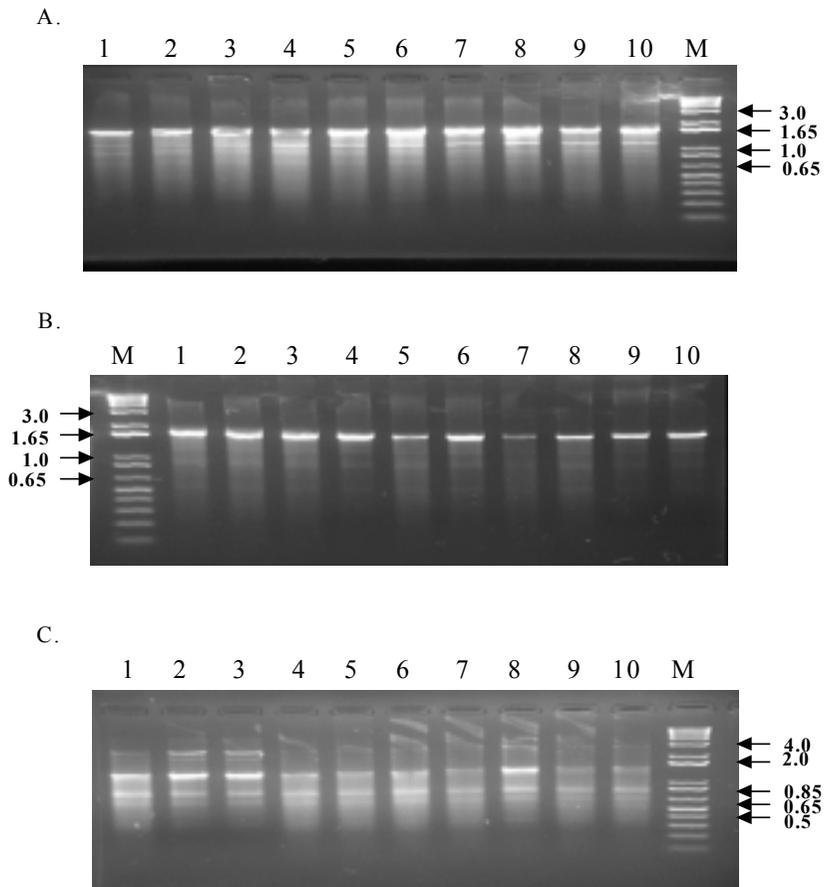


Fig 7. RAPD patterns of 10 *B. abortus* field strains out of 61 field isolates. Panel A, amplification patterns by using URP-3 primer ; Panel B, amplification patterns by using URP-6 primer ; Panel C, amplification pattern by using URP-9 primer. M; 1kb plus DNA marker.

5. 소 유산증에 관한 설문 조사 결과

가. 일반적인 사항

소 유산증과 관련하여 본 설문조사에 참여한 농가수는 전체 614 농가 이었고 이중 지역별로는 경기, 인천지역 (81%), 충청도 지역(대전포함)(17%), 강원 지역 (2%) 순이었다. 이들 농장의 규모는 착유두수 기준으로 볼때 10-30 두 사이가 가장 많았고 (67%), 30-50두 (23%) 이며 50두 이상과 10두 미만이 각각 5%을 차지 하였다. 조사 대상 농가들의 목장운영 경력은 10-20년 사이가 가장 많았고 (44%), 5-10년 (25%), 20년 이상 (21%) 그리고 5년 미만(9%) 순으로 나타났다. 이들 조사 대상 농가들의 납유업체는 서울우유가 가장 많았고 (81%), 매일우유 (11%), 빙그레 (5%) 이었고 나머지 (3%) 는 남양유업, 지역낙협, 파스테르유업등 기타 유업체 이었다.

나. 소 유산 관련 사항

목장에서 유산을 경험은 아래의 표에서와 같이 조사대상의 93% 가 유산 경험이 있었고, 년 2-3 회 가 가장 많았으며, 1 회 이하, 4-6 회 순이었다. 조사 대상농가중 6.1% 는 유산 경험이 없었던 것으로 답하였다.

구 분	백분율	발생농가/전체농가
있 다	93%	(569/614)
1회 이하	33%	(190/580)
2-3회	53%	(308/580)
4-6회	11%	(68/580)
7-10회	2%	(9/580)
10회 이상	1%	(5/580)
없 다	6.6%	(41/614)
무 응 답	0.4%	(4/614)

목장에서 소 유산 예방을 위하여 주로 실시하는 예방방법으로는 아래 표에서와 같이 농가에서 실시하였던 소 유산 예방을 위한 방법은 주로 우사주위 분무소독 (33%), 연막소독(24%), 소 유산증에 대한 예방접종 (31%), 모기구제 (10%) 및 기타(2%) 등의 순서로 나타났고, 농가에서는 주로 우사주위 소독과 예방접종 방법을 병행하는 것으로 나타났다.

구 분	백 분 율	실시농가/전체농가
예방 접종	30.6%	252/822
모기 구제	9.9%	82/822
우사주위 분무소독	32.9%	271/822
우사주위 연막소독	24.3%	200/822
기타	2%	17/822

본 조사의 목장에서 소 유산 예방을 위하여 실시하는 예방접종의 종류는 아래의 표에서 나타나는 것과 같이 아까바네가 가장 많았고 (42%), 유행열 (28%), 소바이러스설사병 (14%), 소호흡기기관염 (11%), 파라인플루엔자 3형 (3%) 순이었다. 일반적으로 조사 대상농가들은 대부분 2 가지 이상 또는 복합백신을 이용하여 3 종이상의 질병에 대하여 예방접종을 실시하는 것으로 나타났다.

구 분	백 분 율	실시농가/전체농가
소호흡기기관염	10.6%	118/1109
소바이러스성 설사병	13.5%	150/1109
파라인플루엔자 3형	2.7%	30/1109
유행 열	28.1%	312/1109
아 까 바 네	43.4%	482/1109
기 타	1.5%	17/1109

소 유산증 이외에 조사목장에서 실시하는 예방접종의 종류는 아래의 표에서와 같이 과반수 이상이 실시하지 않았고 (52.6%) 실시 농가 중에는 기타 소호흡기 백신이 가장 많았고 (33.7%), 소대장균증 (4.2%), 소 코로나바이러스

(1.9%) 등이었다.

구 분	백 분 율	실시농가/전체농가
소 코로나바이러스	1.9%	12/614
소 대장균증	4.2%	26/614
소 호흡기백신	33.7%	207/614
기 타	7.4%	46/614
미 실시	52.6%	323/614

본 조사를 통하여 본 소 유산증에 대한 예방접종시 접종연령은 아래표에서와 같이 1-3세 가장 많았고 (35%), 모든연령 (25.2%), 3-5세 (16.4%)등의 순이었 고, 무응답도 19.2%에 달하였다.

구 분	백 분 율	대상농가/전체농가
1세 미만	2.6%	16/614
1 - 3세	35%	215/614
3 - 5세	16.4%	101/614
5 - 7세	0.9%	6/614
7세이상	0.4%	3/614
모든연령	25.2%	155/614
무응답	19.2%	118/614

소 유산증에 대한 접종시기는 봄이 가장 높았고 (57.1%), 가을 (11.2%), 여름 (6.3%) 순이었다. 또 일부 농가들중에는 수시로 접종하는 농가들도 있었다 (9.9%).

구 분	백 분 율	대상농가/전체농가
봄 (3-5월)	57.1%	351/614
여름 (6-8월)	6.3%	39/614
가을 (9-11월)	11.2%	69/614
겨울 (12-2월)	2.1%	13/614
수시로	9.9%	61/614
무응답	13.1%	81/614

본 조사 결과 목장에서 신규로 소 구입시 부루셀라병에 대한 검사 실시 여부를 확인여부에서는 아래의 표에서와 같이 조사대상 약 30% 만이 확인하였다. 확인하지 않은경우도 43.4% 로 높은 비율을 나타내었고, 확인하는경우에도 중개상에 구두 확인등이 약 27%을 차지 하고 있었다.

확인한다	29.1%(179/614)
확인서 첨부를 요구한다	14.8%(33/222)
직접 검사기관에 의뢰한다	58.1%(129/222)
소를 판 축주나 중개상에게서 구두로만 확인한다	24.7%(55/222)
기타	2.2%(5/222)
확인하지 않는다	43.4%(267/614)
무 응 답	27.3%(168/614)

본 조사 결과 목장에서 부루셀라 이외에 유산과 관련하여 검사여부는 아래의 표에서와 같이 대부분 받고 있지 않는 것으로 나타났으며, 받는 경우에는 가축 위생시험소, 동물병원, 수의과학검역원순이었고, 대학은 거의 이용하지 않은 것으로 나타났다. 검사 항목은 대부분 아까바네, 유행열, 소호흡기염등에 대한 항체가 측정이 대부분을 이루었고, 검사주기는 년 1 - 2 회가 대부분을 이루고 있었다.

받고있다	18.7%(115/614)
부루셀라 이외의 유산과 관련한 검사는 주로 어디에 의뢰하십니까 ?	
가축위생시험소	54.7%(75/137)
대학	1.4%(2/137)
수의과학검역원	10.9%(15/137)
동물약품회사	2.1%(3/137)
사료회사	8%(11/137)
동물병원	22.6%(31/137)
주로 검사 받고있는 항목은 ?	
혈액항체가 검사	78.2%(90/115)
원인체 분리동정	12.1%(14/115)
기타	3.4%(4/115)
무응답	6%(7/115)
주로 검사받고 있는 질병은 ?	
소호흡기염	13.6%(29/213)
소마이러스성설사병	16.4%(35/213)
파라인푸루엔자 3형	7.5%(16/213)
유행열	22%(47/213)
아까바네	31.9%(68/213)
기타	8.4%(18/213)
검사받는 주기는 ?	
1년 2회 이상	25.2%(29/115)
1년 1회	62.6%(72/115)
2년 1회	2.6%(3/115)
3년 1회	1.7%(2/115)
기타	6%(7/115)
무응답	1.7%(2/115)
받고있지 않다	73.4%(451/614)
무응답	7.8%(48/614)

제 4 절 고 찰

소의 유산증은 태아가 생존할수 있는 태령에 도달하기전에 여러 가지 원인에 의해서 살아있는 태아 또는 사태아가 자궁밖으로 배출되는 현상을 말하는 것으로, 원인으로서는 물리,화학적 요인, 생물학적 요인, 유전학적 요인등 다양하다. 이들 유산으로 인한 경제적인 피해는 태아의 폐사에 의한 피해, 유생산 감소에 의한 피해, 공태기간의 증가에 의한 피해등 여러 가지를 포함하는 것으로 막대한 경제적인 피해를 유발하게 된다.

소의 유산을 유발할 수 있는 생물학적 요인중 전염성 원인체들은 세균, 바이러스, 진균류, 원충류등을 들수 있다. 세균성 원인체로서는 현재 국내에서 양성 판정으로 매년 약 1,000 여두 가 도살처분되는 부루셀라가 가장 중요한 원인체의 하나로 알려져 있다. 바이러스성 원인체로는 IBR, BVD, Akabane 등을 들 수 있다. 이들 원인체의 진단은 근본적으로 가검물로부터 원인체를 분리동정함으로써 이루어진다. 그러나, 이외에도 혈청학적인 방법, 최근의 분자 유전학적인 방법들을 이용한 원인체의 검색등을 들수 있다. 이러한 진단 방법들이 연구팀별로 개발되어 사용하고 있는곳도 있지만, 그러하지 못한점도 많이 있다. 소 유산증은 진단에 의한 치료가 매우 어렵기 때문에 조기에 예방을 하지 않으면 이 질병을 방제 하기가 매우 어렵다.

본 연구에서는 본 연구기간동안 공시된 가검물로부터 세균성 또는 바이러스성 원인체의 분리를 시도 하였고, 이를 위하여 유전학적인 기법을 이용하여 조기에 검색할수 있는 진단기법을 확립하였고, 국내 우군에서의 이들 원인체들에 대한 혈청 역학조사를 실시하였다. 질병발생의 근원지를 확인 할수 있는 방법을 정립하기 위하여 원인균들의 유전자 분석을 통한 근원지 추적기법을 확립하였고, 국내 분리주들에 대하여 적용하였다. 또한 소 유산증의 근본적인 대책수립을 위하여 현재 국내 양축농가들이 소 유산증 예방을 위하여 어떠한 인식들을 가지고 있고 이에 대한 예방대책들을 어떻게 실시하고 있는지에 대하여 설문조사를 통하여 조사하였다.

본 연구 기간동안 의뢰된 유산태아, 태반, 우유등의 가검물로부터 분리, 동정된 균주는 342주가 분리 되었으며, 이중 227 주(66.4%) 는Vitek system을 이

용하여 동정 할수 있었으나, 나머지 115 주(33.6%) 는 동정할수 없었다. 동정된 균주들중에서는 현재까지 문헌상에 보고된 소유산증과 직접적인 원인이되는 균주들은 찾을수가 없었으나, 현재 동정된 균주들중 상재균으로서 비병원성 균주들도 있지만, 몇몇 중에서는 소 유산증과 관련 하여 병원성의 검증이 필요한 균주들도 있었다.

소 유산증 관련 바이러스를 분리하기 위하여 유산태아, 태반등을 포함한 총 426 예의 가검물로부터 총 51 예의 바이러스를 동정할수 있었고, 11 주의 바이러스를 분리 하였다. 또한 분리 바이러스중 BVDV 는 sequencing 분석결과 reference strain 인 NY-1 strain 과 높은 상동성을 나타내었다. 현재 까지 분리된 바이러스의 특성에 대한 실험결과는 추후 더 진행되어야 될것으로 사료된다.

유산관련 원인체들에 대한 혈청학적 조사 결과 가검혈청 2,246 예에 대하여 Brucella을 검사한 결과 2 두가 양성으로 판정되었다. 양성판정된 개체는 국가 방역지침에 따라서 관련 기관에 통보함으로서 법적 절차에 따라서 처리하였다. 유산한 개체들에 대한 유산관련 세균성 원인체들에 대하여 혈청학적 조사를 81 두에 대하여 실시한 결과 Leptospira 는 전두수 음성이었고, Campylobacter 는 17두 가 양성(21%) 으로 판정 되어 유산 하지 않은 개체들을 포함한 전반적인 추후 조사가 더 실시 되어야 할것으로 사료된다. *Coxiella burnetti* 에 대한 항체 검사 결과 이 또한 185 두중 18 두가 양성(9.7%) 으로 나타났다. 이러한 양성결과를 나타낸 것은 이들에 의해서 전적으로 유산을 유발하였다고 단정하기는 어렵지만, 개연성에 대하여는 부인할수 없는 상황이므로 이러한 부분들을 광범위하고 깊이있게 조사를 실시하여야 할것으로 사료된다.

소 유산관련 virus 성 원인체에 대한 혈청학적 조사 결과 총 2,979 예에 대하여 조사한 결과 BVDV 에 대하여 가장높은 77.0% 의 항체 양성율을 나타내었고, Akabane virus 에 대하여는 53.3%, IBR virus 에 대하여는 10.6% 의 항체 양성율을 나타내었다. 이러한 항체 양성율을 설문조사를 통한 예방접종 사실과 비교해 볼때에 BVDV 는 전반적으로 많은 감염을 이루고 있는 것으로 나타났다. 또한 이러한 항체 양성율은 특히 IBR virus 에 대한 것은 매우 낮

은 편임으로 철저한 예방접종을 지도, 홍보하여 전반적으로 높은 항체가를 유지할수 있도록 하여야 하겠다.

현재까지 소 유산증의 진단은 혈청학적 진단기법을 이용한 진단 또는 원인체 분리, 동정법에 의존 하여 왔다. 그러나, 소 유산증의 원인체들은 배양이 어렵고, 많은 시간이 걸리지 때문에 원인체들을 신속하게 검색할수 있는 기법의 개발이 요구되어 왔기 때문에 본 연구를 통하여 유산관련 원인체의 신속정확한 진단할수 있는 진단기법을 확립하였다. 세균성 원인체인 *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans*, *Camphylobacter fetus* 는 배양이 까다롭고 또한 잘 배양이 되지 않기 때문에 이러한 점을 해결하기 위하여 유전자 검색법인 PCR 기법을 확립하였다. 또한 바이러스성 원인체인 IBR, BVD 및 Akabane virus 에 대한 PCR 기법도 확립함으로써 유산 가검물로부터 직접 원인체를 검색함으로써 신속한 진단이 이루어 질것으로 사료된다. *B. abortus* 에대한 우균의 혈청학적 검사를 위하여 재조합 단백질을 이용하여 기존의 혈청학적 검사 방법인 시험관응집 반응법과 비교한 결과 감염초기의 개체로 생각되는 낮은 항체가에서는 비교적 높은 상관 관계를 나타내어 우균에서 감염초기의 개체들을 검색하는대에는 유효할것으로 생각된다. 그러나, 이를 좀더 발전 시켜서 모든 양성 개체들을 검색할수 있는 항원을 밝히는 추후의 연구가 계속적으로 진행되어야 할것으로 생각된다.

소 부루셀라병은 전 세계적으로 발생하고 있는 질병이며, 국내에서도 1955 연도 도입젖소에서 처음 검출된이후 최근까지도 연 약 1,000여두가 부루셀라 양성우로 판정되어 도태되고 있다. 이러한 실정에서 현재 까지 주로 사용되던 진단 기법은 부루셀라병의 검색용으로 이용되고 있고, *Brucella spp.* 또는 백신 strain 간의 비교에는 효율적이지 못하다. 최근 분자 생물학적 기법의 발달에 따라서 pulse field gel electrophoresis, restriction fragments length polymorphism, random amplified polymorphic DNA (RAPD), ribotyping, variable number tandem repeat typing 등 의 방법이 strain 의 typing을 위하여 사용되어 왔다. 근래 PCR 기법이 개발되어 사용되면서 10 - 12 mer 의 짧은 핵산을 이용한 RAPD 법이 개발 되어 사용되었으나, PCR 조건에 따라

서 비특이적인 DNA 밴드의 검출과 낮은 재현성등의 문제점이 지적되어 이러한 문제점을 개선한 URP (Universal Rice Primer)을 이용한 개발되어 이용되고 있어서 이 primer을 이용한 strain typing을 시도 하였다. 이 기법을 이용하여 *B. abortus* 의 strain을 효율적으로 구분할수 있었고, 또 국내 분리 균주들에 적용한 결과 이 기법을 이용하여 *Brucella abortus* 의 감염원 추적, 또는 역학적인 조사등에 효율적으로 적용될수 있을것으로 사료된다.

국내 소 유산증에 실태에 대한 설문 조사 결과 본 조사가 남부지방이 포함되지 않은 문제점은 있으나, 국내 젖소 사육농가수와 지역적 분포를 고려할때에 본 조사는 국내 소 유산증에 대한 실정을 반영할수 있는 것으로 생각된다. 본 조사에서 대부분의 농가들 (93%) 가 소 유산증을 경험하였고, 또한 이들중 약 70% 정도가 년 2 회 이상의 유산을 경험하였다고 하였다. 이러한 사항은 본 조사에서 착유두수가 30두 미만이 농가가 70% 이상을 차지하고 있는점을 고려할때에 소 유산증에의해서 축산 농가에 막대한 경제적인 피해를 주고 있을것으로 생각된다. 유산증 예방을 위하여는 예방접종과 우사주위 소독을 주로 실시하는 것으로 나타났다. 일부 농가에서는 아직까지도 소 유산증 예방을 위하여 어떠한 예방조치 (예방접종, 우사주위 소독등) 도 실시하지 않고 있는 것으로 생각되며, 소 유산증 예방을 위한 예방접종에서는 아까바네 (43.4%), 유행열 (28.1%) 에 치중되어서 있었으나, 이 또한 전체적으로 볼때에 매우 낮은 정도 이다. 그러나, 이것은 아마도 조사 지역이 모기가 많이 출현하는 지역인 남부 지방이 없이, 중부 이북지방에 치우쳐 있기때문일것으로 생각된다. IBR, BVD 바이러스에 대한 예방접종 상황은 약 10% 대로 매우 낮았다. 그러나, 이러한 원인체들 역시 많은 유산을 유발할수 있는 것으로 사료 되기 때문에 이에 대한 적극적인 예방대책의 수립이 요구된다. 이외에 기타 백신에 대하여는 조사대상의 반수 이상이 실시하지 않고 있었다. 대부분 소 유산증을 예방하기 위한 백신과 혼합하여 생산되는 혼합백신을 사용하는 것으로 사료된다. 소 예방접종연령이나 시기에서는 본 조사를 통하여 볼때에 적절하게 실시하고 있는 것으로 생각된다.

국내 소 부루셀라병 전파의 원인중의 하나인 신규소 구입시 전파을 배제하기 위한 방법중의 하나인 소 부루셀라병 검사결과 확인 여부에 대하여는 약 30% 만이 검사여부를 확인하고 있어서 이에 대한 지도가 요구된다. 기타 유

산관련 질병의 주기적인 검사에 대하여는 조사대상중 20% 이하만이 실시하고 있어서 이점에 대한 교육, 홍보가 강화 되어야 할것으로 생각된다. 이상의 설문 조사 결과를 바탕으로 할 때에 국내에서 소유산증을 예방하기 위하여 소유산증을 효율적으로 예방할수 있는 적절한 시기에 전반적으로 예방접종을 실시하며, 또한 소 신규 구입시에는 반드시 소 부루셀라병 검진여부를 확인하여 전파원을 차단할수 있도록 하여야 하겠다. 부가적으로 소 유산증 및 기타 소 질병에 대한 주기적인 검사를 통하여 미리 예방할 수 있는 방제 system을 구축하는 것이 무엇보다 중요하다고 생각한다.

제6장 소 유산증의 영양 및 사양환경적 원인 분석과 개선방안

제1절 서론

국내 축우산업인 낙농과 비육우산업이 시장개방화시대에 국제경쟁력을 갖기 위해서는 축우의 생산성 증대와 생산비의 절감대책이 수반되어야 한다. 그러나 축우산업의 경영을 악화시키는 각종 질병들의 발생율이 더욱 높아지고 있으며 특히 최근에 문제가 되고 있는 유·조산 및 사산율의 증가는 그 자체에서 오는 경제적 손실 뿐만 아니라 유·사산후에 이어지는 번식장애와 도태의 증가로 그 손실이 더욱 가중되고 있으며, 경영악화의 중요한 요인이 되고 있다. 현재 국내에서 소의 유산증의 발생율이 약 10% 이상으로 추정되고 있으며 이는 이상적인 발생수준보다 훨씬 높은 수준이다. 유산에 의한 경영손실이 막대한 것으로 추정되고 있지만 아직 적절한 대책이 수립되어 있지 못한 실정이다.

한편 목장 현장에서도 유·사산발생시 원인 규명과 재발방지를 위한 적절한 대책이 뒤따르지 못하고 있으며 그 결과 유산발생의 지속적인 증가가 계속되고 있다. 외국의 경우도 유산발생중에서 그 원인을 알 수 없는 예가 발생지역과 보고자간에 차이가 많으나 65-75%에 이르고 있다. 이들 대부분이 비감염성 유산인 것으로 추측되고 있다. 유산발생이 높은 임신시기와 계절 및 임신우 나이에 대한 보고도 보고자간에 차이가 많다.

비감염성 유산의 경우 환경요인으로서 스트레스, 축사구조, 축군크기, 파행 등이 크게 관여되고 있다. 유산증과 관련이 깊은 영양소로는 Ca, P, Mg, Cu, I, Se 등이 보고되어 있다. 또한 단백질의 과다급여, 과도한 NPN(Urea) 급여, 에너지 ⊖균형에서도 유산 및 수태지연이 일어나고 있다. 비타민 중에서는 특히 Vit. A와 β -carotene 결핍에서 유산이 발생되고 있다. 특히 분만 후 40-60일에서 혈중 glucose와 cholesterol이 낮을 때 수태 소요일수가 길게 나타나 있다.

국내에서 유산방지를 위한 영양소의 적정급여수준 그리고 특히 발생하는 유산원인중 영양소의 관련정도는 아직 보고된 예가 없기 때문에 앞으로 이 분야의 연구도 반드시 수행되어야 할 주요과제가 되고 있다.

본 연구에서 비감염성의 주요 원인으로서는 관여되고 있는 이들 요인들에 대

해 목장현장 방문조사를 통해서 조사분석하고 전체유산 발생율에 미치는 정도를 조사함으로써 유산발생율을 최소화 할 수 있는 영양, 사양관리 방안을 찾는 데 목적을 두고 수행하였다.

제2절 현장조사에 의한 젖소 유산발생율

1. 재료 및 방법

가. 조사지역

경기도내에서 안성, 평택, 화성, 안산, 이천, 여주, 장호원, 파주 8개 지역과 충남의 천안, 성환, 연기, 아산, 홍성 5개 지역 그리고 충북의 음성, 청주 2개 지역을 중심으로 하여 무작위로 선정된 총 254개 젖소 목장의 임신우, 8,893두를 대상으로 조사하였다.

나. 사양관리 조사방법과 시기

미리작성한 설문조사서의 내용에 따라 조사자(2인 1조)가 직접 목장을 방문하여 관리기록부와 질의응답 및 현장확인 방법으로 목장현황과 유산 발생율을 조사하였다. 조사목장중 유우군 산유능력검정에 참여한 검정 목장에 대해서는 능력검정기록표의 번식관련 내용을 참고하여 현장조사 내용을 보완하였다. 1개 목장에 대해서 1년 2회 조사를 원칙으로 하였고 유산이 2-3두이상 발생한 목장에 대해서는 2-3년 연속조사하였다.

다. 유산발생 조사

조사 목장내 초임, 착유 및 건유 중인 소의 사육두수를 파악하고 그 자료를 기초로하여 1년간 임신확인 두수에 대하여 유산율을 조사하였다. 유산은 임신 45일-260일 사이에 발생한 경우를 유산으로 간주하였다. 유산발생을 지역간 차이, 유산월령 분포, 계절별 유산빈도 및 유산우의 유산발생 빈도가 비교될 수 있도록 자료를 수집하였다.

2. 결과 및 고찰

조사목장의 연도별 및 지역별 유산 발생율은 표 1에서 보는 바와 같다. 비교적 임신두수가 많았던 화성, 평택, 안성, 이천, 여주 지역의 경우 3년간 유산율이 안성과 화성 지역보다 평택과 이천, 여주 지역이 5.7-5.8%로 다소 높았다.

이들 4개 지역에서 산유능력검정 참여 목장과 비참여 목장간에 유산율에 다소 차이가 있었다. 화성과 평택지역은 검정목장에서 낮은 반면에 안성, 이천, 여주 및 아산 지역에서는 오히려 더 높은 경향이 있었다. 또한 화성, 안성, 장호원, 음성 및 아산지역에서는 2000년도가 다른 년도보다 더욱 유산율이 높았다. 특히 2001년도에 조사된 파주와 충주, 홍성 지역에서는 유산율이 높은 편이었다.

표 1. 조사 지역별 유산 발생율(평균±SD)

지역	구분	연도			합계	목장구분*	
		1999	2000	2001		검정	비검정
화성, 안산	목장수	18	16	13	47	20	27
	조사두수	504	521	486	1,511	744	767
	유산율(%)	4.3±5.2	7.5±8.6	4.4±2.2	5.0±4.5	5.0±4.5	5.7±7.2
평택	목장수	18	9	2	27	18	11
	조사두수	425	307	64	796	614	182
	유산율(%)	5.9±6.0	5.7±5.7	1.5±2.0	5.8±5.8	5.1±4.5	6.1±6.7
안성	목장수	17	13	9	39	21	9
	조사두수	508	419	348	1,275	697	230
	유산율(%)	4.1±4.7	5.8±4.7	1.5±1.6	4.1±4.4	5.4±4.5	3.6±5.1
이천, 여주	목장수	30	16	-	46	42	5
	조사두수	1,114	801	-	1,915	1,739	76
	유산율(%)	5.7±5.3	5.9±5.2	-	5.7±5.2	5.9±5.2	4.2±5.4
장호원, 음성	목장수	10	10	-	20	-	20
	조사두수	242	293	-	535	-	535
	유산율(%)	5.9±6.0	9.1±3.1	-	7.5±4.9	-	7.5±4.9
천안, 성환	목장수	5	-	-	5	-	5
	조사두수	241	-	-	241	-	421
	유산율(%)	8.1±1.5	-	-	8.1±1.5	-	8.1±1.5
아산	목장수	13	11	-	24	4	20
	조사두수	421	366	-	787	163	624
	유산율(%)	1.9±2.7	8.2±9.7	-	3.9±7.2	6.8±6.0	4.4±7.7
파주	목장수	-	-	37	37	37	-
	조사두수	-	-	1,389	1,389	1,389	-
	유산율(%)	-	-	5.9±3.7	5.9±3.9	5.9±3.9	-
충주, 연기 홍성	목장수	-	-	9	9	9	-
	조사두수	-	-	444	444	444	-
	유산율(%)	-	-	7.3±3.3	7.3±3.3	7.3±3.3	-

*산유능력검정 참여여부를 구분

유산우의 유산시기 즉 유산월령(표 2)에서는 3개월이전 유산이 전체의 15.1%, 5-6개월령에서 61.0%, 7개월이상에서 24.1%였다. 계절별 유산빈도(표 3)에서는 가을이 전체 발생의 35.6%로 가장 높았고 다음이 여름, 겨울, 봄의 순서였다. 특히 2000년도에서는 여름과 가을이 모두 36.7%, 전체 73%로 다른 연도보다 유산이 두 계절에 집중되었다.

유산개체의 유산경험 빈도(표 4)에서는 73.3%가 첫 유산이었고 2회, 3회째의 유산우가 19.1과 4.2%, 계 23.3%였고 4회째인 경우도 3.4%이었다.

표 2. 유산우의 유산 월령분포

연도		≤2	3	4	5	6	7	≥8	계
1999	두수	2	7	20	31	36	18	8	122
	(%)	(1.6)	(5.7)	(16.4)	(25.4)	(29.5)	(14.8)	(6.6)	
2000	두수	10	10	13	20	21	18	12	104
	(%)	(9.6)	(9.6)	(12.5)	(19.2)	(20.2)	(17.3)	(11.5)	
2001	두수	9	14	20	23	26	13	14	119
	(%)	(7.6)	(11.8)	(16.8)	(19.3)	(21.8)	(10.9)	(11.8)	
계	두수	21	31	53	74	83	49	34	345
	(%)	(6.1)	(9.0)	(15.4)	(21.5)	(24.1)	(14.2)	(9.9)	

표 3. 계절별 유산빈도

연도		봄	여름	가을	겨울	계
1999	두수	16	33	57	20	126
	(%)	(12.7)	(26.2)	(45.2)	(15.9)	
2000	두수	10	40	40	19	109
	(%)	(9.2)	(36.7)	(36.7)	(17.4)	
2001	두수	25	25	25	33	108
	(%)	(23.1)	(23.1)	(23.1)	(30.6)	
계	두수	51	98	122	76	343
	(%)	(14.9)	(28.6)	(35.6)	(21.0)	

표 4. 유산우 개체 유산경험 빈도

연도		0	1	2	≥3	계
1999	두수	74	24	10	10	118
	(%)	(62.7)	(20.3)	(8.5)	(8.5)	
2000	두수	102	14	4	0	120
	(%)	(85.0)	(11.7)	(3.3)	(0)	
2001	두수	85	30	1	2	118
	(%)	(72.0)	(25.4)	(0.8)	(1.7)	
계	두수	261	68	15	12	356
	(%)	(73.3)	(19.1)	(4.2)	(3.4)	

이상 결과에서 본 조사지역내 젖소의 전체 평균 유산율과 범위는 5.9%와 1.5-9.1%였다. 그러나 실제 유산율은 이보다 높을 것으로 예상되었다. 그 이유로서 유산우의 약 70%가 임신 5개월 이후 였고 또한 유산으로 인정된 경우의 약 85% 이상이 배출된 태아, 태막에 근거한 것으로 보아 임신 5개월 이전에 발생된 유산들이 확인의 어려움으로 목장에서 유산에 포함되지 않을 수 있었기 때문이다.

한편 유산월령에서 임신중반기 이후의 유산율이 연도간에 차이가 있으며, 또한 계절별 유산율에서도 연도간에 차이가 있었던 결과는 결국 즉, 기온, 유산감염증 발생양상 등의 외적요인이 유산 발생에 크게 영향을 것으로 사료되었으며 과거 문제가 되었던 유산중예방접종 후유증도 다수 조사되었다.

제 3절 유우군 산유능력 검정기록분석에 의한 유산발생율

1. 조사재료 및 방법

가. 조사지역

경기도에서 1998-2001년 사이에 유우군 산유능력검정에 참여한 목장에서 검정두수 규모(≤20두, 21-40두, ≥41두)와 지역(평택, 안성, 이천, 여주, 화성, 천안, 안양, 예산, 아산, 청주, 총 48개 목장)을 고려하여 끌고 루 임의 선정한 목장의 번식관련기록을 근거로 하여 유산 발생율을 조사하였다.

나. 유산발생 조사

번식관련 기록표에 입력된 인공수정과 분만(유산)기록 중에서 인공수정 후 90일 이상 지난 후 재수정된 기록과 인공수정 후 260일 이하 기간에 분만(유산)된 기록 두가지로 기록을 분류하여 그 발생 빈도를 조사하였으며, 각 발생빈도를 검정두수 규모, 계절 및 년도별로 구분하여 분석하였다.

다. 목장내 월평균 임신두수 조사

유산우가 속해있는 동일 목장내에 유산한 월에 속하는 모든 임신개체를 번식기록에 의해 확인하였으며 각 월의 임신기록을 합한 후 12개월로 나누어 월평균 임신두수를 산출하였다. 인공수정 후 90일 이내에 발정이 재발되지 않은 소를 임신우로 간주하였으며, 그 이전에 임신진단으로 임신이 확인된 소는 90일 이전에도 임신우로 분류하였으며 번식장애로 무발정인 소는 임신우에서 가능한한 제외되도록 하였다. 조사목장내 검정두수 규모별 임신두수의 비율은 표 5와 같다.

표 5. 조사목장내 검정두수 규모별 임신두수

검정두수 규모	목장수	임신두수, %
≤20두	9	67.6±7.9
21-40두	19	62.1±7.9
≥41두	20	60.2±7.3
계	48	62.2±7.9

라. 유산율 조사

월 유산두수를 그 유산월에 해당하는 축군내 임신두수로 나눈 백분율을 먼저 산출하고 그 뒤 1년간 유산율을 계산하였다.

마. 경기도와 충청도 유우군 검정목장 전체의 유산율 조사

1999-2001년 3년간 유우군 능력검정 번식기록중에서 정상 분만과 유산(임신 180일 이전과 이후)기록이 있는 자료를 근거로 하여 년도별, 지역별 및 계절별 유산율을 산출하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 검정목장내 재수정율과 분만(유산)율

검정두수 규모(≤20두, 21-40두, ≥41두)에 따른 재수정율(인공수정 후 90일 이후에 재수정)을 보면(표 6) 각각 11.5, 7.3 및 5.1%였고 분만(유산) 기록은 11.0, 7.0 및 4.8%였다. 이 두 기록을 합칠 경우 22.5, 14.3 및 9.9%로서 규모증가에 따라 감소되었다.

계절별의 재수정율과 분만율을 보면(표 7) 재수정율이 여름에 낮고 가을과 겨울에서 여름보다 높았다. 또한 분만기록도 봄, 여름보다 가을과 겨울에서 더욱 높았다. 재수정과 분만기록의 합계에서도 마찬가지로의 경향을 보였다.

지역간 비교(표 8)에서는 충남과 충북지역의 재수정율이 7.9-8.3%로 안성, 평택 화성 지역보다 높았고 분만기록은 안성, 평택, 충청지역에서 7.0-8.3%로 높았다.

표 6. 검정두수 규모별 재수정 및 분만기록의 비율

연도	≤20두			21-40두			≥41두		
	재수정 ¹⁾	분만 ²⁾	계	재수정	분만	계	재수정	분만	계
총입									
신기 특수	557	184	741	3,806	1,705	5,509	7,615	3,571	11,186
1998	11.6	13.6	25.2	9.8	10.1	19.9	8.2	8.7	16.9
1999	12.1	12.3	24.4	6.8	6.1	12.9	4.0	3.9	7.9
2000	9.2	10.4	19.6	6.4	5.7	12.1	3.4	3.6	7.0
2001	3.0	7.6	20.6	6.2	5.9	12.1	4.6	3.1	7.7
계	11.5 ±1.6	11.0 ±2.6	22.5 ±2.8	7.3 ±1.7	7.0 ±2.1	14.3 ±3.8	5.1 ±2.2	4.8 ±2.6	9.9 ±4.7

¹⁾ 인공수정후 90일 이후에 재수정.

²⁾ 인공수정후 260일 이내에 분만(유산).

표 7. 계절별 재수정 및 분만기록의 비율

연도	봄			여름			가을			겨울		
	재수정	분만	계									
총임신 기록수	3,379	1,519	4,898	3,473	1,013	4,486	2,577	1,197	3,774	2,563	1,512	4,075
1998	12.0	9.6	21.6	7.6	7.7	15.3	9.1	11.9	21.0	9.2	10.6	19.8
1999	5.1	4.4	10.0	4.9	5.8	10.7	6.7	4.8	11.5	7.0	7.4	14.4
2000	5.1	5.0	10.1	4.7	3.7	8.4	3.9	3.6	7.5	5.0	5.4	10.4
2001	3.9	4.1	8.0	3.9	5.7	9.6	8.2	16.6	24.8	7.5	3.9	1.4
계	6.7 ±3.6	5.8 ±2.6	12.4 ±6.2	5.3 ±1.6	5.7 ±1.6	11.0 ±3.0	7.0 ±2.3	9.3 ±6.1	16.2 ±8.1	7.2 ±1.7	6.8 ±2.9	14.0 ±4.2

표 8. 지역별 재수정 및 분만기록의 비율

연도	안성, 평택			화성			이천, 여주			충남			충북		
	재수정	분만	계	재수정	분만	계									
총임신 기록수	3,837	1,251	5,088	3,755	1,745	5,500	2,141	999	3,140	1,654	796	2,450	401	401	802
1998	8.0	12.5	20.5	7.4	12.5	17.9	10.7	6.9	18.6	17.4	15.4	32.8	7.4	12.5	17.9
1999	5.6	6.6	12.2	5.2	4.9	10.2	7.6	6.2	13.8	6.5	6.1	11.6	5.2	4.9	10.1
2000	5.0	5.7	10.7	4.5	4.5	9.0	5.3	4.2	9.5	3.9	3.4	7.3	4.5	4.5	9.0
2001	5.3	3.9	9.2	3.6	3.6	9.7	6.7	5.7	12.4	5.2	10.0	15.2	6.1	3.6	9.7
계	6.0 ±1.4	7.2 ±3.7	13.2 ±5.1	5.8 ±1.3	6.4 ±4.1	11.7 ±4.2	7.6 ±2.3	5.8 ±1.1	13.6 ±3.8	8.3 ±6.2	8.7 ±5.2	16.7 ±11.2	5.8 ±1.3	6.4 ±4.1	11.7 ±4.2

나. 경기도와 충청도 검정유우균 전체 유산율

앞에서 언급한 표 6-8의 분만(유산)기록과 같은 의미를 갖는 유산율을 보면 표 9와 같다. 연도간에 유산율에 상당한 차이가 있었으며 2000-2001년도에 3.9-4.1%로 특히 유산율이 높았다. 또한 지역간에서도 경기도보다는 충청도에서 유산율이 4.6%로 높았다. 계절간에서 차이가 많아 여름과 가을에 3.7-4.0%로 유산율이 높았다.

표 9. 경기와 충청도내 유우군의 유산율

구분		임신 건수		계	유산율, %
		정상분만	유산		
연도	1998	12,744	203	12,947	1.6
	1999	65,848	1,625	67,473	2.4
	2000	77,617	3,317	80,934	4.1
	2001	79,765	3,218	82,983	3.9
지역	경기	187,100	5,974	193,074	3.1
	충청	52,242	2,509	54,751	4.6
계절	봄	46,050	1,611	47,661	3.4
	여름	60,332	2,287	62,619	3.7
	가을	65,241	2,744	67,985	4.0
	겨울	67,709	1,841	69,550	2.6

표 6의 결과에서 분만 즉, 유산으로 기록된 비율이 4.8-11.0%, 재수정기 록은 5.1-11.5%였다. 특히 검정두수 21-40두와 41두 이상인 목장에서 각각 약 5,000건과 12,000건의 임신기록에 근거한 유산율(재수정기록+분만기록/전체 임신기록)이 14.3%와 9.9%였던 것은 국내 젖소의 평균 유산율을 대표할 수 있는 결과로 사료되었다.

이런 결과를 통해서 표 1의 현장조사에서 얻은 유산율 5.9%은 재수정 또는 태아, 태막 미확인에 의한 유산발생이 유산율 산출에 포함되어 있지 않은 결과임을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 그러한 사실은 표 9에서도 나타나 있다. 즉, 경기, 충청도 젖소의 평균 유산율 2.4-4.6%는 본 현장조사에서 재수정이 포함 안된 분만(유산) 기록만으로 산출된 결과(표 1)와 유사한 결과이기 때문이다.

한편 계절에서 재수정율과 분만율이 특히 가을에 더욱 높았던 것은 하계 고온스트레스와 관련이 있는 것으로 사료되었다. 지역간 유산율(표 8)에서 충남지역이 높았던 결과는 1998년도에 월등히 높았던 것과 관계가 있었다. 표 1, 8과 9에서 나타난 지역간 유산율 차이에 대한 원인은 앞으로 더욱 조사되어야 할 부분이다.

제 4절 유산우의 혈액내 광물질 및 대사물질 수준

1. 재료 및 방법

가. 채혈

유산발생 목장의 유산우와 정상 임신우로부터 경정맥 혈액을 채혈후 혈청을 분리하였으며 혈청내 광물질을 조사할 때까지 -20°C 에 보관하였다.

나. 혈청내 광물질 측정

혈청은 광물질 함량측정을 위해 건식법(AOAC, 1990)으로 전처리 하였다. 혈청 0.5-1ml를 crucible에 정량하여 550°C 회화로에서 2시간 태운후 시료를 실온에서 냉각시키고 HNO_3 (32.5%) 용액을 시료에 2-3방울 떨어뜨리고 다시 550°C 회화로에서 2시간 회화시켰다. 그후 실온에서 냉각시킨 후 HCl (17.5%)용액 10ml를 crucible에 넣고 유리봉으로 완전 용해시킨 다음 여과지 (No.-41)로 여과시키고 증류수로 250ml가 되게 하였으며 공시액을 공기중에 24시간 방치한 다음 ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer, Jobin Yvon, France) 방출분광기를 이용하여 측정하였다.

다. 혈청내 Glucose와 총 Cholesterol 측정

Sigma Diagnostic Kits(glucose: No. 315; 총 cholesterol: No. 352)를 이용하여 측정하였다.

라. 혈청내 광물질 과부족의 기준

정상임신우와 유산우의 혈청내 및 사료내 광물질 수준을 비교하였으며 참고문헌상에 나타난 정상수준과 경계 또는 결핍수준에 기준을 두었다.

2. 결과 및 고찰

가. 임신우와 유산우의 임신월령에 따른 혈청내 광물질 수준

표 10과 같이 macro minerals(P, Ca, Mg)의 경우 정상 임신우와 유산

우 모두 임신초기보다 임신말기에서 다소 낮은 경향을 보였고, 또한 유산우에서 임신 6개월이후 정상우보다 다소 낮았다. 그러나 유산우의 수준은 광물질 요구량을 충분히 충족시키고 있었다. Trace minerals(Zn, Cu, Mn)의 경우에서도 정상 임신우와 유산우간에 차이가 없었으며 역시 유산우에서도 정상 혈청수준을 유지하고 있었다.

나. 유산우의 산차별 및 유산 계절별의 광물질 수준

표 11과 표 12에 나타난 바와 같이 P, Ca, Mg수준이 1-2산 유산우에서 다소 높았고 Zn, Ca, Mn수준은 산차간에 차이가 없었다. 유산 계절에서는 P, Ca, Mg수준이 가을과 겨울에 현저히 높았으며 Zn, Cu, Mn에서는 계절간에 큰차이가 없었다. 산차별, 계절별의 광물질 수준차이에서도 유산의 원인이 될 만큼의 낮은 수준은 아니었고 역시 광물질 수준은 요구량을 훨씬 넘고 있었다.

다. 혈청내 Glucose와 총 Cholesterol 수준

임신월령을 기준으로 조사된 정상 임신우와 유산우간의 혈청내 glucose과 cholesterol수준은 표 13과 같다. Glucose 수준은 모두 50.3~71.1mg/dl 수준으로서 유산우와 정상임신우간에 차이가 없었고 임신 월령간에도 차이가 없었다. 총 cholesterol의 경우 임신 5개월령 이전의 유산우에서 정상 임신우보다 높았고 6개월이상의 유산우에서 다소 낮았다. 그러나 이들 수준은 개체간에 차이가 많았다.

표 10. 정상 임신우와 유산우의 임신월령별 혈청내 mineral 수준 정상 임신우
(단위 : ppm)

임신 월령	P	Ca	Mg	Zn	Cu	Mn
≥3	434.6* ± 101.6	338.2 ± 114.0	136.6 ± 27.8	5.68 ± 3.40	3.56 ± 2.24	1.00 ± 0.98
4-5	448.2 ± 93.7	282.0 ± 56.5	120.2 ± 23.8	6.43 ± 4.40	3.75 ± 3.07	0.84 ± 0.41
6-7	403.1 ± 115.1	318.6 ± 114.0	152.0 ± 39.4	5.29 ± 4.51	3.50 ± 2.92	0.94 ± 0.61
≥8	335.0 ± 75.1	294.5 ± 74.6	129.4 ± 27.0	4.77 ± 2.88	2.91 ± 1.13	0.63 ± 0.34

*평균 ± SD.

유산우(단위 : ppm)

유산 월령	P	Ca	Mg	Zn	Cu	Mn
≥3	404.2 ± 161.4*	312.3 ± 105.5	118.2 ± 25.0	8.69 ± 8.65	7.55 ± 9.06	0.77 ± 0.27
4-5	412.7 ± 119.0	277.2 ± 68.5	126.6 ± 30.3	4.34 ± 1.94	5.48 ± 1.69	1.04 ± 1.64
6-7	340.7 ± 129.4	273.8 ± 115.5	125.2 ± 27.9	4.57 ± 2.76	4.93 ± 2.16	0.86 ± 0.37
≥8	318.7 ± 115.0	258.4 ± 67.6	89.7 ± 32.4	4.07 ± 2.40	7.09 ± 12.28	0.55 ± 0.13

*평균 ± SD.

표 11. 유산우의 산차별 혈청내 mineral수준(단위 : ppm)

산차	P	Ca	Mg	Zn	Cu	Mn
초입	415 ± 108*	307 ± 125	117 ± 39	10.9 ± 10.5	9.9 ± 10.6	0.7 ± 0.3
1-2	516 ± 394	350 ± 115	132 ± 25	5.7 ± 4.2	5.2 ± 1.7	1.0 ± 0.8
3-4	360 ± 205	262 ± 126	144 ± 20	4.2 ± 3.3	5.0 ± 2.0	1.2 ± 1.4
≥5	448 ± 100	320 ± 50	116 ± 15	5.8 ± 1.5	5.1 ± 2.3	1.7 ± 2.4

*평균 ± SD.

표 12. 유산우의 유산 계절별 혈청내 mineral 수준(단위 : ppm)

산차	P	Ca	Mg	Zn	Cu	Mn
봄	410 ± 125*	299 ± 895	108 ± 17	6.6 ± 3.2	4.4 ± 2.1	0.7 ± 0.2
여름	414 ± 278	234 ± 885	104 ± 12	4.2 ± 3.3	6.3 ± 7.8	1.0 ± 1.6
가을	432 ± 224	520 ± 255	148 ± 58	6.4 ± 5.58	6.4 ± 4.0	0.9 ± 0.9
겨울	448 ± 330	347 ± 145	123 ± 48	8.1 ± 8.0	7.0 ± 8.4	0.8 ± 0.8

*평균 ± SD.

표 13. 혈액내 glucose와 총 cholesterol 수준

성분	구분	임신월령				비교
		≤3	4-5	6-7	≥8	
Glucose (mg/dl)	정상임신우	53.3±26.1*	62.6±30.1	71.1±10.0	60.1±23.2	
	유산우	50.3±21.0	61.2±37.8	53.4±17.3	51.0±28.2	(51.0±28.2**)
총 Cholesterol (mg/dl)	정상임신우	200.8±80.3	192.9±91.7	207.9±76.4	179.7±56.2	
	유산우	230.1±103.1	246.9±109.4	155.2±61.7	168.6±90.0	(154.8±53.0)

평균 ± SD. ** 유산 월령 불명

제 5절 유산우 급여사료의 성분조사

1. 재료 및 방법

가. 사료의 시료 채취

유산이 발생된 목장에서 급여중인 구입농후사료(배합사료), 완전혼합사료(구입 또는 자가배합) 및 조사료를 적당량 채취하여 사료의 일반성분 및 광물질 수준을 조사하였다.

나. 사료의 일반성분 분석

사료내의 조지방, 조단백 및 조회분은 AOAC방법(1990)에 준하여 실시하였다. 사료내 ADF(acid detergent fiber) 측정을 위해 시료 0.25-0.3g을 시험관에 넣고 실온에서 acid detergent용액 20ml와 decalin 0.5ml을 첨가한 후 수조에서 1시간 끓였다. NDF(neutral detergent fiber)측정을 위해서는 시료 0.25-0.3g을 시험관에 넣고 neutral detergent용액 30ml와 decalin 0.5ml, sodium sulfate 0.5g를 채우고 수조에서 1시간 끓였다. 각각 끓인 시료를 glass crucible에 채우고 진공펌프로 여과하였다. 시료를 drying oven에서 하룻밤 건조후 desiccator에서 30분간 냉각시킨 다음 무게를 측정하였다.

다. 사료내 mineral분석

혈청내 mineral분석과 동일한 방법으로 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

유산우 급여사료의 일반성분 분석결과(표 14)에서 특히 조단백과 조지방 수준이 구입 및 자가 TMR(완전혼합사료)에서 14-15% 및 4.9-5.2%이었고 NDF와 ADF는 70%와 30%였다. 한편 농후사료(배합사료)의 경우는 조단백과 조지방이 15.8%와 75.8%, NDF와 ADF가 75.8%와 22.3%였다. 이들 두 TMR내 광물질 수준(표 15)은 차이가 없었으며 농후사료내 다량광물질 수준은 0.2-0.5%, 미량광물질 Zn, Cu, Mn수준은 124, 23, 62ppm이었다. 또한 유산우 두수가 다른 목장간에 TMR내 사료성분 조사에서는 표 16과 같이 ADF가 유산다발 목장에서 다소 높았고, 특히 미량광물질에서도 유산발생목장간에 다소 차이가 있었으나 편차가 매우 컸다.

유산목장의 급여 조사료에서 대표적 형태를 채취하여 분석한 사료성분은 표 17과 같았고, 조사료의 NDF와 ADF가 비교적 높았다. 광물질에서는 절대부족과 같은 특이한 사항은 나타나지 않았다.

표 14. 유산우 급여사료의 일반성분

사료종류	건물량 (%)	조회분 (%)	조단백 (%)	조지방 (%)	NDF (%)	ADF (%)
구입 TMR	95.1 ± 1.0*	6.8 ± 1.0	13.6 ± 2.0	4.9 ± 1.3	70.6 ± 4.1	31.9 ± 5.7
자가 TMR	94.9 ± 1.1	7.5 ± 1.3	14.4 ± 1.8	5.2 ± 1.7	70.6 ± 3.7	31.0 ± 6.6
농후(배합) 사료	96.1 ± 1.2	8.3 ± 2.6	7.4 ± 1.7	15.8 ± 6.1	75.8 ± 4.6	22.3 ± 13.4

NDF : neutral detergent fiber, ADF : acid detergent fiber.

*평균 ± SD.

표 15. 유산우 급여 완전혼합사료(TMR)내 mineral 수준

구분	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
구입 TMR	1.7 ± 0.7	1.7 ± 0.3	0.7 ± 0.1	135.9 ± 60.1	44.8 ± 18.9	151.9 ± 59.2
자가 TMR	1.6 ± 0.5	1.4 ± 0.3	0.7 ± 0.1	182.1 ± 83.8	37.2 ± 13.4	199.3 ± 79.8
농후(배합) 사료	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.1	124.3 ± 168.5	23.0 ± 12.6	61.8 ± 7.2

*평균 ± SD.

표 16. 목장내 유산두수별 완전혼합사료(TMR) 성분

사료 일반 성분

유산두수	건물량 (%)	조회분 (%)	조단백 (%)	조지방 (%)	NDF (%)	ADF (%)
<1	94.7 ± 1.7*	6.8 ± 1.1	13.7 ± 1.8	5.3 ± 2.5	71.1 ± 3.9	28.2 ± 7.7
3	95.2 ± 0.7	7.7 ± 1.6	14.4 ± 1.2	5.0 ± 1.0	68.0 ± 4.0	28.3 ± 1.9
>4	94.9 ± 0.7	7.7 ± 1.2	14.4 ± 2.4	5.1 ± 1.0	69.6 ± 3.5	33.7 ± 3.9

NDF : neutral detergent fiber, ADF : acid detergent fiber.

*평균 ± SD.

Mineral 수준

유산두수	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
≤1	1.5 ± 0.4*	1.4 ± 0.5	0.6 ± 0.1	227.2 ± 216.8	32.9 ± 12.7	188.5 ± 88.4
3	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.1	203.1 ± 80.8	30.7 ± 26.7	244.7 ± 99.8
≥4	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	259.8 ± 181.5	51.4 ± 22.6	175.5 ± 29.4

*평균 ± SD.

표 17. 유산발생 목장의 조사료 성분

조사료	일반성분				광물질					
	조단백 (%)	조지방 (%)	NDF (%)	ADF (%)	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)
벼짚	7.0	6.0	87.0	58.2	0.5	0.7	0.4	78.8	31.0	230.5
티모시	6.1	3.8	80.2	47.0	0.2	0.5	0.3	80.1	18.5	85.9
틀페스큐 등	6.0	12.0	76.1	43.0	0.3	0.7	0.4	62.6	30.1	280.5
라이, 풀페스큐등	10.5	6.3	69.7	35.7	1.6	0.4	0.6	107.8	25.6	92.2
오차드, 티모시 등	4.9	2.0	75.8	53.6	0.4	0.5	0.4	72.9	21.4	72.9
벼짚, 수입건초 등	6.6	3.1	79.2	40.9	0.7	0.8	0.5	111.9	47.1	151.5
옥수수 사일리지	9.8	3.1	65.3	26.0	1.2	0.4	0.5	65.6	8.7	65.6
수단사일리지	5.8	2.5	78.6	36.5	2.1	0.7	0.6	99.5	18.4	233.0

혈액내 광물질수준의 과부족현상을 유산발생과 연관시키는 데는 여러 가지 조건이 고려되어야 할 문제이다. 즉, 섭취 사료내 광물질 수준이 혈액내 수준과 일치되지 않는 예도 많고 또한 광물질효과간의 상호작용, 개체의 생리상태와 질병유무, 분석방법, 사료채취방법과 혈액채취시기 등 변화요인이 너무 많기 때문이다. 그러나 본 연구에서 개체 생리조건 중 임신월령의 동일조건에서 광물질 수준이 정상 임신우와 유산우간에 임신월령별로 차이가 없었던 것으로 보아 적어도 광물질 부족에 의한 유산발생의 가능성은 없었던 것으로 사료되었다. 또한 유산우의 혈청내 광물질 수준이 유산시 산차와 계절간에도 유산원인이 될 만큼의 수준 변동도 없었다. 혈액내 대사물질인 glucose와 cholesterol은 정상 임신우와 유산우에서 모두 상당한 개체차이가 있었기 때문에 이들 수준이 유산원인을 추정하는데는 본 연구에서는 적절한 지표가 되지 못하였다.

이상의 사료성분 분석결과에서 완전혼합사료와 배합사료내의 일반성분과 광물질 수준은 특히 낮은 수준이 아니었고 또한 유산이 4두이상 되는 목장의 사료에서도 성분상 특이한 상이점이 없었던 것으로 보아서 이들 사료의 섭취가 정상적 조건이었다면 사료에 기인된 유산 가능성도 없었던 것으로

사료되었다. 그러나 급여 조사료내 NDF와 ADF가 적정수준에 미치지 못한 것은 앞으로 더욱 깊이 고려되어야 할 부분이다. 특정개체의 사료섭취량의 절대부족에 따른 유산원인은 유생산 적소인 점을 고려하여 타 결핍증세와 병행하여 검토되어야 그 원인을 보다 정확히 알 수 있을 것이다.

제 6절 유산 원인 분석

1. 조사재료 및 방법

가. 조사지역 및 대상

경기도의 남부(안성, 평택, 이천, 여주, 장호원), 서부(화성, 안산), 북부(파주) 및 충남(천안, 성환, 아산, 홍성 등)지역내의 유우군 능력검정 참여와 비참여 목장을 대상으로 조사하였다.

나. 유산우 조사방법

조사 대상지역에서 1999-2001년간에 발생한 유산우에 대하여 설문지 내용에 의한 관리자 현장 설문조사 또는 관여 수의사, 수정사의 진단내용을 근거로 유산원인을 분석하였다.

다. 사양관리 조건 조사

설문지의 내용에 따른 여러 가지 항목을 처음 조사하였으나 예비조사를 통해서 관리자와 관련된 요인(목장 경험연수, 경영의지, 번식관리 수준, 수의사 관계, 소독관리) 및 축사와 시설의 환경요인(축사구조, 통로상태, 착유시설, 운동장상태와 시설등)을 중심으로 조사가 진행되었다.

2. 결과 및 고찰

가. 유산원인

표 18과 같이 발생원인이 불평한 경우가 47.9%(41.0-55.6%)였으며 유산원인으로 크게 관여하는 요인중에서 각종 스트레스(16.0%)와 타박, 받히기, 투쟁(14.4%)에 기인된 것이 전체의 약 30%를 차지하였다. 특히 스트레스의 경우는 그중 약 36%가 여름 고온 스트레스였고 최근 구제역 발생에 따른 소독과정의 스트레스도 약 32%로 매우 높은 부분을 차지하

였다. 또한 지역에 따라서는 소음, 진동에 대한 스트레스도 유산에 크게 관여되었다. 한편 1999과 2000년도에서는 유산감염증도 유산 원인의 7-12%(평균 8.1%)로서 유산율의 증가 요인이 되었다.

이들 원인외에 유산증 예방접종 6.3%, 유방염 또는 부제병, 대사성 질병과 연관된 요인이 2.3%를 차지하였다.

나. 사양관리 조건과 유산율

관리자의 경험년수에서는 표 19와 같이 점정목장과 비점정목장간에 다소 상반된 결과를 보였고 11-15년 경력의 관리자에서 비교적 낮은 유산율을 나타냈다. 경영개선 시도의 의지가 없는 목장에서 유산율이 높았고 비능력점정 목장에서는 유량, 유질개선을 시도한 목장에서도 다소 높았고 번식과 질병관리의 의지도 유산율 저하와 다소 관련이 있었다. 번식관리가 양호한 목장에서 유산율이 훨씬 낮았다. 특히 비능력점정 목장에서 수의사의 검진과 분만후 관리상태, 축사와 운동장 소독 여부에 따라 유산율의 차이가 있었다. 축사구조에서는 능력점정 목장의 경우 계류식보다는 개방식에서 다소 유산율이 높았다. 우사통로의 상태, 환기, 채광조건도 유산과 관련이 있었다. 착유시설에서는 pipe line식, 운동장의 경사도가 있는 목장에서 각각 유산율이 다소 높은 경향이 있었다.

표 18. 현장조사에 의한 유산원인 분포

원인	1999		2000		2001		계	
	두수	%	두수	%	두수	%	두수	%
원인불명	66	46.8	64	41.0	77	55.6	207	47.9
스트레스	28	19.9	29	18.6	12	8.9	69	16.0
소음, 진동	(3)		(4)		(4)		(11)	
고온	(14)		(8)		(3)		(25)	
소독	(3)		(15)		(4)		(22)	
기타	(8)		(2)		(1)		(11)	
타박, 받히기, 투쟁	19	13.5	25	16.0	18	14.1	62	14.4
습관성	1	0.7	2	1.3	6	4.4	9	2.1
약물(품)성	1	0.7	1	0.6	3	2.2	5	1.2
미끄럼, 넘어짐	1	0.7	1	0.6	2	1.5	4	0.9
쌍태	-	-	2	1.3	2	1.5	4	0.9
질병	3	2.1	4	2.6	3	2.2	10	2.3
유산감염증	10	7.1	19	12.2	6	3.7	35	8.1
예방접종	12	8.5	9	5.8	6	4.4	27	6.3
계	141	100	156	100	135	100	432	100

표 18에 나타난 원인불명의 유산발생을 최소화하기 위하여 유산 진단기술과 예방책이 절대적으로 필요하며 또한 각종 스트레스, 물리적 및 사회적 원인은 보다 기술적 축군관리가 따를 경우 유산율의 큰 감소가 기대되는 요인들이었다. 한편 유산율에 크게 관여된 유산감염증의 조기진단 및 예방접종의 기술적 측면도 유산율 저하에 크게 기여할 것으로 사료되었다.

표 19. 사양관리 조건과 유산율

관리조건	능력비검정 목장		능력검정 목장	
	목장수	유산율(평균±SD)	목장수	유산율(평균±SD)
1. 관리자 경험년수				
≤5	6	6.3 ± 4.9	6	4.7 ± 3.6
6-10	16	7.1 ± 7.8	37	4.5 ± 3.8
11-15	12	4.7 ± 5.5	44	5.2 ± 4.3
≥16	34	5.3 ± 6.3	54	6.2 ± 5.9
2. 경영개선 시도분야				
유량, 유질	40	5.8 ± 4.2	85	4.9 ± 4.1
번식	23	4.9 ± 3.9	46	5.9 ± 4.3
질병	11	3.9 ± 3.7	47	5.2 ± 4.5
사료	-	-	25	4.8 ± 4.4
무시도	29	6.0 ± 7.4	13	7.9 ± 7.0
3. 번식관리(발정)수준				
양호	35	5.5 ± 4.0	75	4.8 ± 4.1
보통	45	7.2 ± 6.8	50	6.2 ± 4.8
4. 수의사 검진				
정기적	8	5.4 ± 4.8	62	5.1 ± 4.3
필요시	46	5.8 ± 6.7	71	5.2 ± 4.8
무검진	5	7.2 ± 7.9	-	- -
5. 분만후 정기검진				
모든소	19	4.3 ± 5.9	80	5.1 ± 4.5
문제소	57	5.7 ± 6.2	41	6.5 ± 5.3
무검진	27	7.4 ± 7.9	17	5.3 ± 5.9
6. 축사, 운동장 소독				
정기적	24	4.6 ± 7.2	12	5.4 ± 6.1
부정기적	29	5.3 ± 5.0	25	6.3 ± 5.6
무소독	17	7.5 ± 5.5	25	5.5 ± 4.5

관리조건	능력비검정 목장		능력검정 목장	
	목장수	유산율(평균±SD)	목장수	유산율(평균±SD)
7. 축사구조				
계류식	41	5.6 ± 6.8	50	5.5 ± 5.2
개방식	20	5.3 ± 5.3	65	5.9 ± 5.4
혼합식	7	6.1 ± 6.2	8	4.6 ± 2.5
8. 우사, 통로 미끄럼				
보통 이상	47	5.8 ± 5.8	31	5.4 ± 5.5
양호	41	5.3 ± 6.0	43	5.2 ± 4.7
9. 환기 장치 및 채광				
장치, 유	22	4.2 ± 4.1	44	5.8 ± 5.2
무	34	6.3 ± 6.7	45	5.3 ± 5.1
채광, 보통이하	10	8.3 ± 6.2	26	6.5 ± 6.0
양호	48	5.1 ± 5.7	47	5.4 ± 4.9
10. 착유시설				
Basket	12	4.8 ± 6.0	8	5.2 ± 5.2
Pipe-line	49	5.6 ± 5.9	64	5.8 ± 5.7
Parlor	7	7.5 ± 9.2	56	5.1 ± 3.6
11. 운동장 지세				
경사	30	6.0 ± 7.2	27	6.1 ± 5.7
평지	41	5.1 ± 5.6	40	5.4 ± 5.0
12. 운동장 그늘막				
설치	56	5.5 ± 5.8	96	5.1 ± 4.3
무설치	12	5.7 ± 7.6	15	4.6 ± 4.3

이 결과의 종합에서 관리자의 사양기술 수준, 정기적인 건강과 위생관리
가 유산율과 크게 관련이 있었으며 동시에 축사구조와 시설의 적부여부가
직, 간접적으로 유산에 영향을 미치는 주요 요인이 됨을 알 수 있었다.

제 7장 참고 문헌

- Adams, R.S. et al. 1978. Use and limitations of profiles in assessing health or nutritional status of dairy herds. *J. Dairy Sci.* 61:1671-1679.
- Agerholm JS, Willadsen CM, Nielsen TK, Giese SB, Holm E, Jensen L and Agger JF (1997) Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *J. Vet. Med A* 44 :551-558.
- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Hoffman RL (1990) A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *J Vet Diagn Invest* 2 : 283-287.
- Andrianarivo AG, Choromanski L, McDonough SP, Packham AE and Conrad PA (1999) : Immunogenicity of a killed whole tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int J Parasitol* 29 : 1613-25.
- Anon. 1975. Abortion investigations 1974. *Surveillance* 1 : 4-6.
- Bak UB, Lim CH, Cheong CK, Hwang WS, Cho MR. (1908). Outbreaks of Akabane diseases of cattke in Korea. *Korean J Vet Res* 20 :65 -78.
- Ball, P.J.H. 1983. Fertility problems in dairy herds. In practice. Nov. 189-194.
- Ball, P.J.H. 1997. Late embryo and early fetal mortality in the cow. *Anim. Breed. Abst.* 65 : 167-175.
- Barber JS, Gasser RB, Ellils J, McMillan D and Trees AJ (1997) : Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol.* 83 : 1056-1058.
- Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OCH, Shen SK and Dubey JP (2001) : First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a natural infected dog. *J. Parasitol* 87 : 612-618.
- Baszler TV, Gay LJ, and Long MT (1999) Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaenous bovine abortion. *J Clin Microbiol* 37 : 4059-4064.

- Bjorkman C and Uggla A (1999) Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 29 : 1497 -1507.
- Buxton D, Maley SW, Pastoret PP, Brochier B, Innes EA (1997) : Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* 141 : 308-309.
- Charles JA (1994) Akabane virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10 :525-546.
- Cheadle MA, Lindsay DS, Blagburn BL (1999). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol* 85 :325-330.
- Cho JJ, Lee CG, Park BK, Chang CH, Chung CW, Cho IS (2000) Isolation of Akabane virus and its molecular diagnosis by reverse transcription polymerase chain reaction *Korean J. Vet. Res.* 40 :42-48.
- Choromanski L and Block W (2000) : Humoral immune response and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines. *Parasitol Res* 96(10) : 851-3. Dubey JP and Lindsay (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 57 :1-58.
- Committee on bovine reproductive nomenclature. 1972. Recommendations for standardizing bovine reproduction terms. *Cornell Vet.* 62 : 216-237.
- Correa, M.T. et al. 1990. An ecological analysis of risk factors for postpartum disorders of Holstein-Friesian cows from thirty-two New York farm. *J. Dairy Sci.* 73 : 1515.
- Davison, K.L. et al. 1964. Nitrate toxicity in dairy heifers. I. effects on reproduction, growth, lactation and vitamin A nutrition. *Vet. Rec.* 66 : 324-326.
- Dohoo, I.R. and S.W. Martin. 1984. Disease, production and culling in Holstein-Friesian cows. IV. effects of disease on production. *Prev. Vet. Med.* 2 : 755-770.
- Erb, R.E. et al. 1976. Dietary urea for dairy cattle. II. effect on functional traits. *J. Dairy Sci.* 59 : 656-667.
- Ferguson, J.D. 1991. Nutrition and reproduction in dairy cows. *Vet. Clin. Nor. Am : Food Anim. Prac.* 7 : 483-507.
- Forar, A.L. et al. 1995. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds.

- Theriogenology 45 : 1507-1513.
- Gibson, J.P. et al. 1987. Concentrations of blood constituents in genetically high and low milk-production lines of British Friesian and Jersey cattle around calving and in early lactation. *Anim. Prod.* 44 : 183-199.
- Gozalo AQ, Bueno JP, Tabares E, Innes EA, Paniello RG, Mora L (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol* 29 :1201-1208
- Graham, T.W. 1991. Trace element deficiencies in cattle. *Vet. Clin. Nor. Am : Food Anim. Prac.* 7 : 153-215.
- Graham, T.W. et al. 1994. Serum zinc and copper concentration in relation to spontaneous abortion in cows : implications for human fetal loss. *J. Reprod. Fertil.* 102 : 253-262.
- Hardin, D.K. 1993. Fertility and infertility assessment by review of records. *Vet. Clin. Nor. Am : Food Anim. Prac.* 9 : 389-403.
- Herdt, T.H. et al. 2000. The use of blood analysis to evaluate mineral status in livestock. *Vet. Clin. Nor. Am: Food Anim. Pract.* 16 : 423-444.
- Hidiroglow, M. 1979. Trace element deficiencies and fertility in ruminants : a review. *J. Dairy Sci.* 62 : 1195-1206.
- Hum S, Quinn C, Kennedy D. Diagnosis of bovine venereal campylobacteriosis by ELISA. *Aus Vet J.* 71, 140-143, 1994.
- Hurley, W.L. and R.M. Doane. 1989. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Sci.* 72 : 784-801.
- Jerret IV, McOrist S, Waddington J, Browning JW, Malecki JC and McCausland IP (1984) Diagnostic studies of the fetus, placenta, and maternal blood from 265 bovine abortions. *Cornell Vet* 74 :8-20.
- Kappel, L.C. et al. 1984. Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows. *Am. J. Vet. Res.* 45 : 2607-2612.
- Kim JH, Sohn HJ, Hwang WS, Hwang EK, Jean YH, Yamane I, Kim DY (2000) In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet Parasitol* 90 : 147-154.

- Kim JH, Sohn HJ, Lee JK, Hwang EK, Jean YH, Kim DY (accepted)
Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. J. Vet Med. Sci.
- Kim JT, Park JY, Seo HS, Oh HG, Noh JW, Kim JH, Kim DY, Youn HJ (2002) : In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. Vet Parasitol 103 : 53-63.
- King, J.O.L. 1971. Nutrition and fertility in dairy cows. Vet. Rec. 89 : 320-324.
- Kirkbride, C.A. et al. 1973. A diagnostic survey of bovine abortion and stillbirth in the northern plains states. JAVMA. 162 : 556-560.
- Kirkbride CA (1993) Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. Vet Diagn Invest 5 :64-68.
- Kirkbride CA (1992) Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. J. Vet Diagn Invest 4 : 374-379.
- Kronfeld, D.S et al. 1982. Nutritional status of dairy cows indicated by analysis of blood. J. Dairy Sci. 65 : 1925-1933.
- Lee JK, Park JS, Choi JH, Park BK, Lee BC, Hwang WS, Kim JH, Jean YH, Haritani M, Yoo HS, Kim DY (2002) Encephalomyelitis associated with Akabane virus infection in adult cows. Vet Pathol 39 : 269 -273.
- Liddell S, Jenkins MC, Collica CM, Dubey JP (1999) : Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. J Parasitol 85(6) : 1072-5.
- Lindsay DS, Spencer J, Rupprecht C, Blagburn BL (2001) : Prevalence of agglutinating antibodies to *Neospora caninum* in raccons, *Procyon lotor*. J. Parasitol 87 : 1197-1198.
- Macpherson, A. 2000. Trace-minerals status of forages. In: Forage Evaluation in Ruminant(Givens, D.I. et al. ed.)
- Maley SW, Buxton D, Thomson KM, Schiefer CE, Innes EA (2001) : Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. Vet Parasitol 96(1) : 1-9.

- Markusfeld-Nir, O. 1997. Epidemiology of bovine abortions in Israeli dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 31 : 245-255.
- Marsh AE, AL Mullins, J Lakritz (2001) : In vitro quantitative analysis of ³H-uracil incorporation by *Sarcocystis neurona* to determine efficacy of anti-protozoal agents. *Vet Parasitol* 95 : 241-249.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR. Willis RA, McGuire AM (1998) Dogs are definite host of *Neospora caninum* *Int. J Parasitol* 28 :1473-1478.
- McClure, T.J. 1994. Nutritional and metabolic infertility in the cow. CAB Int, UK.
- McDowell, L.R. and G. Valle. 2000. Major minerals in forages. In: *Forage Evaluation in Ruminant*(Givens, D.I. et al. ed.) CAB International.
- Mitchell, D. 1960. Bovine abortion—an analysis of 227 cases. *Can Vet. J.* 1 : 337-343.
- Morrow, D.A. 1969. Phosphorus deficiency and infertility in dairy heifers. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 154 : 761-768.
- Nayler, J.M. and S.L. Ralston. 1991. *Large Animal Clinical Nutrition*. Mosby Year Book.
- Nishikawa Y, Mikami T, Nagasawa H (2002) : Vaccine development against *Neospora caninum* infection. *J Vet Med Sci* 64(1) : 1-5.
- Norton, J.H. et al. 1989. A farming systems study of abortion in dairy cattle on the Atherton. 1. preproductive performance. *Aust. Vet. J.* 66 : 161-163.
- Norton, J.H. and R.S.F. Campbell. 1990. Non-infectious causes of bovine abortion. *Vet. Bull.* 60 : 1137-1147.
- Ohba, C. et al. 1992. Selenium and tocopherol levels in serum and organs of a aborted and premature fetuses and calves died just after birth *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 45 : 476-479.
- Peter DA, Fales WH, Miller RB, et al. (1995). *Tritrichomonas foetus* infection in a herd of Missouri cattle. *J. Vet. Dign. Invest.* 7:278-280.
- Rhyan JC, Wilson KL, Burgess DE, et al. (1995). Immunohistochemical detection of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed paraffin-embedded

- sections of bovine placenta and fetal lung. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:98-101.
- Roberts L. bovine venereal campylobacteriosis (vibriosis) in north east Scotland. *Vet. Rec.* 105, 295-296, 1979.
- Roberts, S.J. 1986. *Veterinary obstetrics and genital diseases (Theriogenology)*. 3rd ed. Publ. by Author, N.Y.
- Rowlands, G.J. et al. 1977. Relationships between blood composition and fertility in dairy cows—a field study. *J. Dairy Sci.* 44 : 1-7.
- Sanderson MW, Gay KM, Baszler TV (2000) *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet Parasitol* 90 :15-24.
- Son ES, Ahn HJ, Kim JH, Kim DY, Nam HW. (2001) Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p43). *The Korean J of Parasitol* 39 : 241-246.
- Swada M, Park CH, Kondo H, Morita T, Shimada A, Yamane I, Umemura T (1998). Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs *J. Vet. Med. Sci* 60 :853-854.
- Thurmond MC, Hietala SK (1997) Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cow. *J Am Vet Med Assoc* 86 : 49 -57.
- Thurmond, M.C. and J.P. Picanso. 1990. A surveillance system for bovine abortion. *Prev. Vet. Med.* 8 : 41-53.
- Thurmond, M.C. et al. 1990. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *JAVMA* 197 : 1305-1312.
- Uchida K, Murakami t, Sueyoshi M, Tsuda T, Inai K, Acorda JA, Yamaguchi R, Tateyama S (2000) Detection of Akabane viral antigens in spontaneous lymphohistiocytic encephalomyelitis in cattle. *J Vet Diagn Invest* 12 :518-524
- Underwood, E.J. and N.F. Suttle. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. CABI Publ.

- Van horn, H.H. and C.J. Wilcox. 1999. Trace minerals. In: Large Dairy Herd Management. Am. Dairy Sci. Ass.
- Weaver, L.D. 1987. Effects of nutrition on reproduction in dairy cows. Vet. Clin. Nor. Am. Food Anim. Prac. Vol. 3 : 513-532.
- Wonda W. Dijkstra TH, Kramer AMH, van Maanen C, Brinkhof JMA. (1999). Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infection in dogs and cattle. Int J Parasitol 29 : 1677-1682.
- 김대용, 황우석, 김재훈 등 (1997). *Neospora*에 의한 소 유산 발생. 대한수의학회지 37 :607-612
- 김재훈, 황의경, 손현주 등 (1998). *Neospora caninum*에 의한 젖소의 반복유산. 대한수의학회지 38 : 853-858.
- 배지선, 김재훈, 허권, 김기석, 황우석, 최양규, 현병화, 김대용. (2000). *Neospora caninum* 국내 분리주의 마우스 감염실험. 대한수의학회지. 40 : 138 -144.
- 배지선, 김재훈, 이증근, 이병천, 최양규, 현병화, 김대용. (2000). *Neospora caninum* 국내 분리주의 마우스 경시적 변화. 대한수의학회지. 40 : 145 -152.
- 이병천, 김대용, 유한상, 김성기 등 (1999) 국내 소 유산에 관한 임상학적고찰 I. 경기지역을 중심으로한 임상학적 고찰. 한국수정란이식학회지 14 : 211-217.
- 이증근, 김재훈, 김진현, 이병천, 황우석, 김영찬, 김대용. (2001) 소 유산태아에서의 림프육종 발생 증례. 대한수의학회지 41 : 85-87.
- 이증근, 김재훈, 김진현, 이병천, 황우석, 윤희정, 남호우, 진영화, 김대용. (2001) 파라핀 블록 PCR을 이용한 소 네오스포라 감염증의 진단법 확립. 대한수의학회지 41 : 381-385.
- 정순옥, 윤순식, 황우석, 진영화, 주이석, 문운경, 김재훈, 이병천, 장정호, 정석찬, 장환, 최상호, 이재진. 국내 번식 장애우의 발생상황에 관한연구. 농업과학논문집. 38, 825-829, 1996.
- 정석찬등. *Leptospira* 속균에 대한 가축 혈중 항체 조사. 농업과학논문집, 32,

1-8, 1990.

허권, 김재훈, 황우석등. (1998) 간접형광항체법을 이용한 국내 젓소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청역학적 연구. 대한수의학회지, 38 : 859-866.

阿部和司, 菅原 伯. 1994. 家畜の生産性ならびに生理機能に及ぼす騒音の影響. 畜産の研究. 48 : 689-692.