

최 종
연구보고서

국내 실정에 적합한 돼지 질병 진단시스템의
개발과 체계화 및 상용화에 관한 연구

Optimization and Commercialization of
Diagnostic System in Porcine Diseases

연구기관
서울대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 실정에 적합한 돼지 질병 진단 시스템의 개발과 체계화 및 상용화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 채 찬 희

세부연구책임자 : 유 한 상

연 구 원 : 한 동 운

연 구 원 : 최 창 순

연 구 원 : 김 정 현

연 구 원 : 조 완 섭

연 구 원 : 정 한 국

연 구 원 : 정 권 일

연 구 원 : 하 승 권

요 약 문

I. 제 목

국내 실정에 적합한 돼지 질병 진단 시스템의 개발과 체계화 및 상용화에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

WTO 체제 출범이후 국제 무역의 분위기가 성숙해감에 따라 모든 산업전반에 있어 세계 분위기에 발맞출 수 있는 경쟁력이 요구되고 있으며, 농·축·수산 분야에서도 그러한 요구는 증대되고 있는 실정이다. 축산 분야에서는 항생제를 비롯한 약제에 오염되지 않은 청정육 및 고급육 개발이 요구되고 있다. 또한, 최근 축산물 수출의 장벽으로 작용하고 있는 돼지 콜레라와 구제역등은 축산 전반에 걸쳐 막대한 손실을 일으키는 질병으로 수의과학 검역원과 축산기술 연구소등 수많은 국가 기관이 질병의 박멸을 위해 물심양면으로 노력하고 있다. 따라서, 축산업에 있어 신속 정확한 질병 진단 서비스의 개발은 질병의 청정화에 기여할 수 있으며 항생제 및 백신의 오남용을 미연에 방지하여 청정육 생산에도 일조할 수 있을 것이다.

현재 국내에서 양돈 질병 진단 서비스는 10개 수의과대학을 비롯한 수의과학검역원과 축산기술연구소의 지원, 사료 및 동물 약품 업계에서 보유하고 있는 병성감정 실험실에서 제공하고 있으나, 각 실험실별로 채택하고 있는 실험법이 상이하여 동일 가검물에 대하여서도 그 결과가 상이한 문제점을 가지고 있다. 또한, 최근에 개발되고 있는 신속 정확한 질병 진단 기술의 보완이 요구되고 있는 현실이다. 따라서, 국내 실정에 적합한 현대화된 진단 기술을 개발하고 표준화된 질병진단 기법을 확립함으로써 양돈 질병진단에 있어 재현성 높은 진단 서비스를 제공할 수 있을 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 국내 실정에 적합한 양돈 질병 진단법을 개발하고자 하였다. 양돈 산업에서 큰 경제적 손실을 안겨주고 있는 소화기 질환에 대하여 중합효소 연쇄반응, 병리조직학적 검사, 면역조직 화학법, 조직내 교잡법을 이용한 진단법을 개발하고 체계화 하고자 하였다. 포유자돈의 소화기 질환으로는 돼지 콕시디움 설사병에 대한 병리조직 검사법을 체계화 하였으며, 포유자돈 과 이유자돈 설사병의 주된 원인체인 병원성 대장균에서 중합효소 연쇄 반응을 이용한 fimbriae와 enterotoxin의 표현형을 분석하였다. 육성·비육기에 주로 문제가 되고 있는 살모렐라 설사증은 질병 경과가 빠르고, 세균 분리율이 떨어지는 단점이 있어 폐사체로부터 얻어진 포르말린 고정조직으로부터 질병진단을 할 수 있는 조직내 교잡법을 개발 확립하였다. 또한, 최근 육성 비육기 설사에서 높은 비중을 차지하는 것으로 보고되고 있는 질환으로서 증식성 회장염에 대한 진단법을 확립하였다. *Lawsonia intracellularis*에 의해 유발되는 증식성 회장염은 균분리 배양이 오래 걸리고 어려워서 한국내 실험실에서는 진단법이 잘 확립되어 있지 않아, 본 연구에서 중합효소 연쇄반응 및 면역조직 화학법을 이용한 진단법을 확립하였다.

돼지 호흡기 질환은 육성 비육 단계에서 주로 문제시 되는 질환으로서 이에 대한 질병 진단법을 체계화 하고자 하였다. 양돈 호흡기 질환에서는 Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC)라고 불리는 세균과 바이러스의 혼합 호흡기 질환이 문제시 되고 있다. PRDC에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 세균인 마이코플라즈마 하이오뉴모니아 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)는 균분리 배양이 매우 어렵고 2-3주에서 1달 이상 시간이 소요되어 신속 정확한 질병 진단을 제공하는데 문제를 안고 있어, 본 연구에서는 비강면봉에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 진단법 개발과 포르말린 고정조직에서 진단할 수 있는 조직내 교잡법을 개발하였다. 위축성 비염 및 파스튜렐라성 폐렴을 유발하는 toxigenic *Pasteurella multocida*를 호흡기 면봉으로부터 진단할 수 있는 중합효소 연쇄반응을 개발하고, 고정 조직에서 마이코플라즈마 하이오뉴모니아균을 감염을 확진할 수 있는 조직내 교잡법을 수행하였다.

최근에 주목을 받고 있는 돼지 소모성 질환인 이유자돈 전신성 소모성 증후군 (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome : PMWS)과 돼지 콜레라 (Classical swine fever : CSF)에 대한 진단법 개발을 수행하였다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군은 돼지 썬코바이러스 2형에 의해 발병되는 신종 질병으로 조직상에서 그 핵산 또는 항원을 검출하는 진단법이 반드시 필요하여, 돼지 썬코바이러스 2형의 핵산을 조직상에서 특이적으로 검출하는 조직내 교잡법을 개발하였으며, 파라핀 포매 조직에서도 그 핵산을 검출할 수 있는 진단법의 최적화를 수행하였다. 또한, 이유자돈 전신성 소모성 증후군과 상관성이 높은 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 조직상에서 동시 진단할 수 있는 이중 조직내 교잡법과 다중 중합효소 연쇄반응을 개발하였다. 양돈 수출의 무역 장벽으로 작용하고 있는 돼지 콜레라를 돼지 정액으로부터 검출할 수 있는 중합효소 연쇄반응을 개발하였으며, 암·수 생식기 및 임파장기로부터 돼지콜레라 바이러스를 검출할 수 있는 조직내 교잡법을 확립하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스를 감별진단 할 수 있는 다중 역전사 중합효소 반응을 개발하였다. 돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스의 membrane(M) gene과 nucleotide(N) gene에서 각각 412 base pair, 612 base pair크기로 증폭되었으며 상호간의 교차반응은 관찰되지 않았다. 그 민감도 또한 10 TCID₅₀로서 매우 적은 양의 바이러스도 검출할 수 있었으며, RNase inhibitor들이 다량 포함되어 있는 분변 또는 장조직 샘플에서도 두 바이러스를 교차 반응 없이 검출할 수 있었다. 바이러스성 설사가 의심되어 의뢰된 포유자돈 및 분변 샘플 1258건 중에서 총 634건이 돼지 유행성 설사병 바이러스로 진단되었으며, 11건이 돼지 전염성 위장염 바이러스로 진단되었다. 그 질병 발생 분포는 일년 년중 발병하고 있었으며, 주로 11월 중순에서 3월 사이에 폭발적으로 발생하는 것으로 조사되었다. 이 연구를 통하여 밝혀진 돼지 바이러스성 설사병은 년중 발생하는 epizootic type과 계절적 발병 양상을 보이는 epidemic type이 있는 것으로 조사되었고, 포유자돈의 바

이러스성 설사에서 그 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었으며, 돼지 전염성 위장염 바이러스는 빈도가 매우 낮아 계절 백신에 대한 대책을 제고할 가치가 있다 하겠다. 또한, 돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스에 대한 조직내 교잡법을 개발하여 진단법으로 확립하였다. 두 바이러스는 공장과 회장부위의 장상피 표면에서 관찰되었으며, 전염성 위장염 바이러스의 경우 드물게 음와 부위에서 관찰되었다. 조직내 교잡법 결과를 바이러스 분리, 형광항체법, 전자현미경을 이용한 검사법과 비교한 결과 그 민감도와 특이도가 높아 진단법으로 매우 유용할 것으로 평가되었다. 7-21일령 사이에 다발하는 돼지 콕시듐 설사병을 진단하기 위한 병리조직 검사법을 확립하였다. 이는 여름철 다발하는 콕시듐 설사병 진단에 매우 유용하게 사용되었다. 육성·비육기 소화기 질환에서 큰 비중을 차지하는 증식성 회장염과 살모넬라증을 병리조직학적 검사, 중합효소 연쇄반응, 조직내 교잡법, 면역조직화학법을 이용한 진단법을 확립하였다.

만성적인 호흡기 질환을 유발하는 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴과 마이코플라즈마성 폐렴 진단을 위하여 다중 중합효소 연쇄반응을 개발하여 비강면봉을 이용하여 신속한 진단을 할 수 있게 되었다. 조직내 교잡법을 이용하여 포르말린 고정되고 파라핀 포매된 조직에서도 마이코플라즈마성 폐렴과 파스튜렐라성 폐렴에 대한 진단법을 확립하였다. 본 연구에서 개발된 호흡기 질환의 진단법은 매우 신속 정확하며 부검을 실시하지 않고서 비강면봉만으로도 진단할 수 있는 검사법으로 그 유용성이 크다고 하겠다. 돼지 호흡기 질환에 있어 상당한 비중을 차지하고 있는 돼지 파스튜렐라균 (*Pasteurella multocida*)을 임상 가검물로부터 분리하였으며, 230개의 분리주에 대하여 헵막 혈청형과 *toxA* 유전자의 보유여부를 조사하였다. 230개의 균주 중에서 30개의 균주가 *toxA* 유전자를 가지고 있었으며, 87%의 균주가 헵막 혈청형 A군에, 4%는 D군에 속하는 것으로 조사되었다. 호흡기 질환에 사용되는 11종의 대표적인 항생제에 대하여 항생제 감수성 검사를 수행하였으며, *ceftiofur*, *danofloxacin*, *gentamicin* 및 *penicillin*에 대하여 효과가 있는 것으로 나타났다. 항생제 감수성 결과는 질병 진단과 병행하여 질병 대책 수립에 있어서도 유용하게 사용될 것이다.

돼지 소모성 질환인 이유자돈 전신성 소모성 증후군과 양돈 산업에 있어 막대한 영

향력을 미치고 있는 돼지 콜레라를 대표적으로 들수 있다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 원인체인 돼지 썩코바이러스 2형과 이와 상관성이 있는 것으로 알려진 돼지 파보바이러스 및 돼지 콜레라 바이러스에 대한 중합효소 연쇄반응법, 조직내 교잡법, 면역 조직 화학법이 개발되었다. 또한, 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 경우 단독 감염보다 혼합감염의 예가 많아 복합감염 예를 조사하였으며, 그 주된 병원체로서는 *Haemophilus parasuis*, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Swine influenza virus의 순으로 빈도가 높게 조사되었다. 이는 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 진단 및 치료에 있어 혼합 감염의 차단이 매우 중요할 것으로 사료된다. 또한, 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 원인체로 부각되고 있는 돼지 썩코바이러스 2형과 상관성이 높은 것으로 알려지고 있는 새로운 증후군인 돼지 피부염 신부전 증후군(Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome: PDNS), 유산(Abortion), 삼출성 포피염(Exudative Dermatitis), 증식성 괴사성 폐렴(Proliferative and Necrotizing Pneumonia: PNP)에 대한 상관성 연구가 추가적으로 수행된다면, 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 대한 방역 수립에 대한 근거를 제공할 것이다. 본 연구에서 개발된 돼지 콜레라 진단법은 그 민감도가 높고, 검사의 신속성과 정확성을 기할 수 있게 되었다. 국내에서 돼지 콜레라에 대한 박멸 사업이후 돼지 콜레라의 발생 예가 급속히 감소하여 청청화 선언을 하기에 이르렀으나, 박멸사업에 성공한 선진국들의 예에 비추어 보았을 때 정확한 진단법을 바탕으로 한 질병 발생의 감시가 중요하다. 따라서, 종돈장을 비롯하여 무역시 거래되는 축산물에 대한 검역, 국내 질병의 감시에 본 진단법을 적용하는 것이 바람직하며, 이는 본 연구에서 수행된 임상가검물에 대한 진단 시스템 운영을 통해 검증되었다.

SUMMARY

In this project, diagnostic system of porcine diseases was developed and optimized for Korean swine industry. This project is consists of three main parts: diagnosis of porcine enteric diseases, diagnosis of porcine respiratory diseases, diagnosis of porcine wasting diseases.

A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed for the simultaneous detection of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in preweaning pigs with diarrhea. PCR products of PEDV and TGEV were 412 and 612 base pair, respectively. Diagnostic technique for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was developed by In situ hybridization with a non-radioactive digoxigenin-labeled probe. A 377 base pair cDNA probe for viral RNA encoding the membrane proteins of PEDV V215/78 was generated by the reverse transcription polymerase chain reaction. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues naturally infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) were examined by in situ hybridization for TGEV nucleic acid using a nonradioactive digoxigenin-labeled cDNA probe. In situ hybridization technique for TGEV were compared with virus isolation (VI), a fluorescent antibody test (FAT), and transmission electron microscopy (TEM). Among 21 ISH positive samples, 5 (24%) were positive for TGEV by all 4 tests, 15 (71%) were positive by FAT, 14 (67%) were positive by VI, and 6 (29%) were positive by TEM. In situ hybridization for detection of TGEV in formalin-fixed paraffin-embedded tissues provides a rapid means of confirmation of a histopathological diagnosis of TGEV without virus isolation. Detection method of *Lawsonia intracellularis* was studied in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissues from naturally infected pigs by immunohistochemistry with a monoclonal antibody against outer membrane

protein of *L. intracellularis*. Warthin-Starry silver stain revealed clusters of argyrophilic, slightly curved rod-shaped organisms in the apical cytoplasm of enterocytes. The presence of *L. intracellularis* in the ileum of pig with proliferative enteropathy was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) further on the basis of amplification of 319 base pair products specific for porcine *L. intracellularis* chromosomal DNA. Immunohistochemistry and PCR may be a complementary method to confirm the diagnosis of *L. intracellularis* infection in pigs. A total of 720 *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic piglets on 756 swine farms were screened for the presence of the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene by polymerase chain reaction (PCR). *Escherichia coli* strains that carried EAST1 genes were also tested by PCR for the presence of 4 fimbriae (F4, F5, F6, F41), 2 heat-stable enterotoxins (STa and STb), and 1 heat-labile enterotoxin (LT) gene. One hundred sixty-four (22.7%) of the 720 *E. coli* isolates carried genes for EAST1. Of these 164 isolates, 62 (37.8%) carried EAST1 genes only, 11 (6.7%) carried genes for at least 1 of the fimbrial adhesins, 51 (31.1%) carried genes for at least 1 of the enterotoxins, and 40 (23.8%) carried genes for at least 1 of the fimbrial adhesins and enterotoxins. Forty-six percent of strains that carried EAST1 genes carried STa genes, and 16% of strains that carried EAST1 genes carried F4. The isolation rate of enterotoxigenic *E. coli* strains carrying genes for EAST1 gene was 63%. The 6 major genotypes were EAST1+, EAST1+STa+, EAST1+STa+STb+, EAST1+STa+F5+, EAST1+STa+F4+, and EAST1+STb+F4+. EAST1 is widely prevalent among diarrheagenic strains of *E. coli* and may represent an important virulence determinant in the pathogenesis of enteric colibacillosis of preweaned pigs

Pasteurella multocida and *Mycoplasma hyopneumoniae* are major bacterial pathogens in porcine respiratory diseases. Although rapid diagnosis in respiratory diseases is the key to control disease, culture and isolation of

respiratory pathogens are difficult and time-consuming. So, rapid and efficient diagnostic tools are necessary. The nested polymerase chain reaction for toxigenic *Pasteurella multocida* was developed. This was a sensitive and reproducible technique and it represented a promising method to be used as a diagnostic tool for confirming the presence of toxigenic *P. multocida* directly from nasal swab without culture. The prevalence and relationship of capsular serotypes and *tox*A gene in *P. multocida* isolates were examined. The most prevalent capsular serotype was capsular serotype A and the majority (87%; 174 out of 200) of *P. multocida* isolates from pneumonic lungs were nontoxigenic. Moreover, multiplex nested polymerase chain reaction was optimized for the detection and differentiation of toxigenic *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA was detected in 20 naturally infected pigs by in situ hybridization using a nonradioactive digoxigenin-labeled DNA probe. A 520-base-pair DNA probe targeting a reiterative sequence of the *M. hyopneumoniae* genome was generated by the polymerase chain reaction. The in situ hybridization technique developed in this study was useful for detection of *M. hyopneumoniae* nucleic acids in tissues taken from naturally infected piglets and may be a valuable technique for studying the pathogenesis of *M. hyopneumoniae* infection.

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) associated with Porcine Circovirus 2 is an emerging disease in pig that characterized by emaciation, dyspnea, and lymph node enlargement. Natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), recorded from January 1999 to December 2000, were determined to determine the prevalence, microscopic lesions, and other coexisting pathogens associated with PMWS. One hundred and thirty three (8.1%) of the 1634 pigs submitted from 1243 pig farms were diagnosed for PMWS. The majority of cases (113 cases, 85.0%) was dual infection with other pathogens. The combination of

PCV2 and *Hemophilus parasuis* (43 cases, 32.3%) was shown to be the most prevalent followed by PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (39 cases, 29.3%). Optimized DNA extraction method and nested PCR were developed for the detection of PCV2 from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Conventional PCR, nested PCR, and in situ hybridization methods were also compared for the detection of PCV2 in archival tissues. A method based on xylene deparaffinization followed by proteinase K digestion yielded DNA of sufficient quality for PCR analyses reliably and consistently. A distinct positive signal for PCV2 was detected in spleen and lymph node from all 37 pigs through in situ hybridization. The nested PCR and in situ hybridization could be applied successfully to archival tissues for the detection of PCV2 DNA. Non-radioactive digoxigenin-labelled probes that can differentiate PCV1 from PCV2 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by in situ hybridization were developed. A 349 base pair DNA fragment from open reading frame 1 of PCV1 and a 481 bp DNA fragment from ORF 2 of PCV2 generated by PCR were used as PCV1 and PCV2 probes, respectively. Double in situ hybridization to simultaneously detect PCV1 and PCV2 or PCV2 and PPV in the same tissue section was developed. The combination of an alkaline phosphatase conjugated antidigoxigenin system with alkaline phosphatase or peroxidase conjugated streptavidin-biotin system allowed identification of PCV1 and PCV2 or PCV2 and PPV. This double labeling technique is suitable both for pathogenesis studies and for diagnostic applications. A seminested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed for the detection of classical swine fever virus (CSFV) in semen. CSFV from boar semen was infrequently identified by virus isolation compared with seminested RT-PCR. CSFV nucleic acid was detected in semen by seminested RT-PCR as early as 7 dpi in three infected boars and persistently thereafter in all five infected boars until 63 dpi. When separated fractions of CSFV-contaminated

semen were analyzed by the seminested RT-PCR, the CSFV nucleic acid was detected mainly in seminal fluid and occasionally in nonsperm cells. CSFV antigen was also detected in nonsperm cells from semen smear by immunohistochemistry. Thus, infection via semen, specially through CSFV-infected seminal fluid, seems to be a major route of transmission of CSFV. CSFV could be detected by in situ hybridization technique from reproductive organ tissues of boars and sows. The distribution of classical swine fever virus (CSFV) was determined in the testicular tissue of infected boars. Viral nucleic acid was localized to spermatogonia, spermatocytes and spermatids but not in the epithelia of the prostate, epididymis, or bulbourethral gland in boar. The demonstration that CSFV infects the spermatogonia and their progeny suggests that this may serve as a primary reservoir for the venereal spread of CSFV. The CSFV in their ovarian tissues was located almost exclusively with the cytoplasm of cells shown by HE-staining to be macrophages, which were numerous in atretic follicles. Small numbers of CSFV-nucleic acid-positive cells with distinctly round morphology and oval nuclei, resembling monocytes were also observed in the blood vessels in sows. The experiment suggested that CSFV replicate in circulating peripheral monocytes, at least to a limited extent, having gained access to ovarian tissues from bloodstream and that these contribute to the localization of CSFV in macrophages throughout the atretic follicle. CSFV nucleic acid and antigen were detected in pigs with chronic CSF by in situ hybridization and immunohistochemistry. The most consistent and prominent microscopic lesions are perivascular mononuclear cell infiltration gliosis in the central nervous system from pigs with chronic CSF. A positive signal for both in situ hybridization and immunohistochemistry was detected in mononuclear cells and lymphocytes of lymphoid tissues. However, viral nucleic acid was detected in some tissue sections in absence of viral antigen. The in situ hybridization technique

developed in this study was useful for the detection of CSFV RNA in tissues taken from chronically infected pigs.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Part 1. Objectives and the scope

Chapter 2. Diagnosis of Porcine Enteric Diseases

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction
2. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues
3. In situ hybridization for the detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs
4. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for the detection of Lawsonia intracellularis antigen in porcine intestinal tissues with proliferative enteropathy
5. Polymerase chain reaction and In situ hybridization for the detection of Salmonella choleraesuis
6. In situ hybridization for the detection of Isospora suis
7. Prevalence and relationship with fimbrial and enterotoxin genes in E. coli isolated from diarrheic piglets

Part 3. Results and Discussion

1. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction

2. In situ hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues
3. In situ hybridization for the detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs
4. Immunohistochemistry and polymerase chain reaction for the detection of *Lawsonia intracellularis* antigen in porcine intestinal tissues with proliferative enteropathy
5. Polymerase chain reaction and In situ hybridization for the detection of *Salmonella choleraesuis*
6. In situ hybridization for the detection of *Isospora suis*
7. Prevalence and relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets
8. Prevalence of diarrhea in preweaning pigs
9. Prevalence of diarrhea in postweaning, growing and finishing pigs

Chapter 3. Diagnosis of Porcine Respiratory Diseases

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Nested polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs
2. In situ hybridization for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*
3. In situ hybridization for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida*
4. Capsular serotype, *toxA* gene and antimicrobial susceptibility profiles of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with pneumonia

Part 3. Results and Discussion

1. Nested polymerase chain reaction for the detection of toxigenic

- Pasteurella multocida* directly from nasal swabs
2. In situ hybridization for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*
 3. In situ hybridization for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida*
 4. Capsular serotype, *toxA* gene and antimicrobial susceptibility profiles of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with pneumonia
 5. Prevalence of respiratory disease in pig

Chapter 4. Diagnosis of Porcine Wasting Disease

Part 1. Introduction

Part 2. Materials and Methods

1. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms
2. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR
3. Optimized Protocols for the detection of porcine circovirus type 2 from the formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction
4. Double in situ hybridization for simultaneous detection and differentiation of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome
5. Nested polymerase chain reaction for the detection of classical swine fever virus
6. Detection of the classical swine fever virus in chronically infected pigs using In situ hybridization

Part 3. Results and Discussion

1. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence,

- microscopic lesions and coexisting microorganisms
2. Simultaneous detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome by multiplex PCR
 3. Optimized Protocols for the detection of porcine circovirus type 2 from the formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain reaction
 4. Double in situ hybridization for simultaneous detection and differentiation of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome
 5. Nested polymerase chain reaction for the detection of classical swine fever virus
 6. Detection of the classical swine fever virus in chronically infected pigs using In situ hybridization

Chapter 5. Results and Applications

Chapter 6. Reference

- Part 1. Diagnosis of Porcine Enteric Diseases
- Part 2. Diagnosis of Porcine Respiratory Diseases
- Part 3. Diagnosis of Porcine Wasting Disease

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

제 2 장 돼지 소화기 질환 진단법 개발

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 다중 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법 개발
2. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 유행성 설사병 진단법 개발
3. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 전염성 위장병 진단법 개발
4. 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법을 이용한 증식성 회장염 진단법 개발
5. 중합효소 연쇄반응과 조직내 교잡법을 이용한 살모렐라증 진단법 개발
6. 병리조직학적 검사를 이용한 콕시디움 설사병의 진단법 체계화
7. 중합효소 연쇄반응을 이용한 대장균성 설사병 진단법 체계화

제 3 절 결과 와 고찰

1. 다중 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법 개발
2. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 유행성 설사병 진단법 개발
3. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 전염성 위장병 진단법 개발
4. 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법을 이용한 증식성 회장염 진단법 개발
5. 중합효소 연쇄반응과 조직내 교잡법을 이용한 살모렐라증 진단법 개발
6. 병리조직학적 검사를 이용한 콕시디움 설사병의 진단법 체계화
7. 중합효소 연쇄반응을 이용한 대장균성 설사병 진단법 체계화
8. 포유자돈 설사병 발생분포
9. 이유자돈, 육성돈, 비육돈 설사병 발생분포

제 3 장 돼지 호흡기 질환 진단법 개발

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 비강 면봉에서 2단계 중합효소 연쇄 반응을 이용한 위축성 비염의 진단법
2. 병리조직학적 관찰과 조직내 교잡법을 이용한 마이코플라즈마성 폐렴의 진단법 개발
3. 조직내 교잡법을 이용한 파스튜렐라성 폐렴의 진단법 개발
4. 파스튜렐라균의 협막형 성장분석 및 항생제 감수성 검사

제 3 절 결과 와 고찰

1. 비강 면봉에서 2단계 중합효소 연쇄 반응을 이용한 위축성 비염의 진단법
2. 병리조직학적 관찰과 조직내 교잡법을 이용한 마이코플라즈마성 폐렴의 진단법 개발
3. 조직내 교잡법을 이용한 파스튜렐라성 폐렴의 진단법 개발
4. 파스튜렐라균의 협막형 성장분석 및 항생제 감수성 검사
5. 돼지 호흡기성 질병의 발생분포

제 4 장 돼지 소모성 질병 진단법 개발

제 1 절 서 설

제 2 절 재료 및 방법

1. 이유자돈 전신성 소모성 질환의 병리조직학적 검사법과 혼합 감염된 병원체
2. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 감별 진단법
3. 파라핀 조직으로부터 돼지 썬코 바이러스 2형 검출을 위한 2단계 중합효소 연쇄반응 진단법 최적화
4. 이중 조직내 교잡법을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 대한 동시 진단법

5. 2단계 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발

6. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발

제 3 절 결과 와 고찰

1. 이유자돈 전신성 소모성 질환의 병리조직학적 검사법과 혼합 감염된 병원체

2. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 감별 진단법

3. 파라핀 조직으로부터 돼지 썬코 바이러스 2형 검출을 위한 2단계 중합효소 연쇄반응 진단법 최적화

4. 이중 조직내 교잡법을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 대한 동시 진단법

5. 2단계 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발

6. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발

제 5 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 6 장 인용문헌

제 1 절 돼지 소화기 질환 진단법 개발

제 2 절 돼지 호흡기 질환 진단법 개발

제 3 절 돼지 소모성 질병 진단법 개발

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

본 연구의 목적은 양돈산업에 있어 막대한 손실을 일으키고 있는 소화기 질환, 호흡기 질환, 소모성 질병을 신속 정확하고, 효과적으로 진단할 수 있는 국내 실정에 적합한 진단 시스템을 개발하고 체계화하는데 있다. 현재는 수의과대학을 비롯 수의과학 검역원과 지방 축산 연구소 및 기업 산하 연구소에서 수행되고 있는 질병진단 서비스는 각 실험실별로 상이한 시험법에 의해 수행되고 있어 통일된 결과를 얻기를 어려운 단점이 있다. 경우에 따라서는 고전적 진단법을 통한 질병진단 서비스를 제공함으로써 신속 정확한 진단을 바탕으로 한 질병 방역을 어렵게 하는 문제점을 안고 있다.

진단 서비스의 체계화는 양돈 산업에 있어서 방역 및 신속 진단을 바탕으로한 초기 대응으로 양돈 사양가들의 피해를 최소화 할 수 있으며, 이는 양돈 산업 전반에 걸쳐 생산 단가를 낮추는 효과를 가져올 수 있다. 정확한 질병 진단을 바탕으로 불필요한 백신 접종 및 약제의 사용을 차단할 수 있으며, 이에 따른 노동력 절감 효과를 가져올 수 있다. 또한, 백신과 약제의 남용방지는 양질의 돈육 생산으로 이어져 국민 건강에 기여하고, WTO 체제 하에서도 돈육 수출에 차질을 빚지 않게 될 것이다.

본 연구를 통하여 얻어질 돼지 질병 진단 시스템의 체계화는 고전적인 검사방법과 첨단 진단기술을 접목하고, 진단 실험실에서 표준화 및 상용화된 질병 진단 시험법을 제공할 수 있을 것이다. 또한, 사양가들이 간편하게 가검물을 의뢰하고, 신속 정확한 질병 진단 결과를 받아볼 수 있는 서비스를 받을 수 있게 되어, 정확한 진단을 바탕으로한 전문 수의사와 방역 대책을 수립함으로써, 폐사로 인한 피해를 최소화하고 약제 및 백신의 오남용을 방지할 수 있을 것이다.

1차 년도에 중합효소 연쇄반응, 면역조직화학법, 조직내 교잡법등을 이용한 포유자돈 및 육성돈, 비육돈에서 경제적 피해를 주는 소화기계 질환의 질병 진단법 체계화를 수행하였다. 포유자돈과 이유자돈 설사에 있어 발병 빈도가 높은 대장균 설사증의 진단을

위한 중합효소 연쇄반응을 개발하여 상용화 하였으며, 포유자돈 대장균 설사증과 이유자돈 대장균 설사증 대장균에 대한 fimbriae와 장내독소형을 검사하므로써 국내에서 문제되는 대장균의 표현형을 확인하였다. 육성돈과 비육돈에서 문제시되는 살모넬라증과 증식성 회장염은 돼지 출하일령 지연과 생산성 저하와 상관성이 높은 질환으로서 신속한 진단에 의한 처방이 중요한 질병으로 본 연구를 통하여 진단법이 확립되었다.

2차 년도에는 돼지 호흡기계 질환 중에서 큰 비중을 차지하고 있는 돼지 유행성 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*과 파스튜렐라성 폐렴 및 위축성비염의 원인체인 toxigenic *Pasteurella multocida*에 대한 진단법을 개발하였다. 돼지를 부검하지 않고 가검물을 채취할 수 있는 호흡기 면봉에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 위축성 비염의 진단법을 개발하고, 호흡기 면봉을 이용한 독소형 파스튜렐라균과 마이코플라스마균을 감별 진단할 수 있는 다중 중합효소 연쇄반응을 개발하였다. 또한, 포르말린 고정되고 파라핀 고정되어 의뢰되는 가검물에 대한 진단을 위하여 조직내 교잡법을 이용한 진단법을 확립하고자 하였다. 또한, 분리된 파스튜렐라균은 협막형에 대한 조사와 항생제 감수성을 조사하여 임상에서 약제사용에 대한 기초자료로 활용코자 하였다.

3차 년도에는 최근 양돈 질병에서 주목을 받고 있는 돼지 소모성 질환의 진단법을 확립하였다. 최근에 와서 새롭게 주목을 받고 있는 이유자돈 전신성 소모성 증후군(Postweaning multisystemic wasting syndrome: PMWS)은 돼지 썬코바이러스 2형(Porcine circovirus type 2: PCV-2)에 의해 유발되는 것으로 보고되어 있으며, 돼지 파보바이러스(Porcine Parvovirus: PPV)와의 혼합 감염이 질병 경과를 악화시키는 것으로 알려지고 있다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 진단은 다음의 3가지 범주를 만족하여야 하는데, 첫째 임상증상으로 이유이후의 자돈에서 위축이 뚜렷하게 관찰되어야 하며, 둘째 병리조직학적 소견상 육아종성 염증을 관찰할 수 있어야 하며, 셋째 조직상에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 핵산 또는 항원을 검출할 수 있어야 한다. 그러나, 아직 세계적으로 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 연구가 초기단계에 있어 조직내에서 돼지 썬코바이러스의 핵산 및 항원을 검출하는 기법이 몇몇 연구 실험실에만 국한되어 국내 실정에 적합한 조직내 교잡법을 개발하였다. 또한, 이유자돈 전신성 소모성 증후

군의 원인체인 돼지 썬코바이러스 2형과 자주 혼합감염되는 것으로 알려진 돼지 파보 바이러스에 대하여 이중 조직내 교잡법 (Double In situ hybridizaation), 다중 중합효소 연쇄반응 (Multiplex polymerase chain reaction)을 이용한 감별 진단법을 확립하였다.

돈육 수출에 주요 장벽으로 작용하고 있는 돼지 콜레라(Classical swine fever: CSF)는 국내 양돈 산업의 상황에서는 질병의 박멸 및 예방이 가장 중요한 질병 중 하나이다. 따라서, 양돈 수의사들의 감시활동과 더불어 신속 정확한 질병 진단법 확립이 무엇보다 중요하다. 본 연구에서는 돼지 콜레라 바이러스에 대한 2단계 중합효소 연쇄반응을 개발하여 임상 가검물로부터 신속 정확한 진단을 수행할 수 있도록 하였으며, 조직내 교잡법을 이용한 진단법을 체계화하였다. 돼지 콜레라 박멸 사업의 일환으로 전국적으로 실시된 돼지 콜레라 백신 사업의 영향으로 심급성, 급성형 콜레라가 감소한 현재의 상황에서 존재할 수 있는 만성형 콜레라의 진단에도 본 연구에서 개발된 진단법이 매우 유용할 것이다.

제 2 장 돼지 소화기 질환 진단법 개발

제 1 절 서 설

본 연구는 1차 년도에 중합효소 연쇄반응, 면역조직화학법, 조직내 교잡법등을 이용하여 포유자돈 및 육성돈, 비육돈에서 경제적 피해를 주는 소화기계 질환의 질병 진단법 체계화를 수행하였다. 포유자돈과 이유자돈 설사에 있어 발병 빈도가 높은 대장균 설사증의 진단을 위한 중합효소 연쇄반응을 개발하여 상용화하고, 포유자돈과 이유자돈의 병원성 대장균에 대한 fimbriae와 장내독소형을 검사함으로써 국내에서 문제되는 대장균의 표현형을 확인하고자 하였다. 또한, 새롭게 알려지고 있는 Enter aggregative heat-stable toxin (EAST-1)는 transposon의 일종으로 chromosome과 plasmid 형태로 존재하며, 최초로 알려진 것과는 달리 Enter aggregative E. Coli (EaggEC) 외에도 Enteropathogenic E. coli (EPEC)과 Enterotoxigenic E. Coli (ETEC)에서도 그 유전자가 보고되고 있다.(Bertin *et al.* 1998; Bhan *et al.* 1989) 현재, 국내에서 보고되고 있는 돼지 대장균에서는 EAST-1 독소에 대한 분포가 알려진 바가 없어 그 양상을 조사하고 자돈 대장균 설사증에서 차지하는 비중을 확인하고자 하였다. 포유 자돈에서 심각한 문제를 야기하고 있는 바이러스성 설사병의 원인체인 돼지 유행성 설사병 바이러스와 전염성 위장염 바이러스는 *Coronaviridae*에 속하는 유사한 바이러스로 감별진단을 요하는 질병이다. 또한, 두 바이러스에 의한 질병 모두 전파속도가 빠르고 폐사율이 높아 신속 정확한 진단과 대책 수립이 질병 방제에 핵심이 된다. 돼지 유행성 설사병 바이러스의 경우 배양이 어렵고 많은 시간을 소모되며, 항원 또는 항체에 대한 검출은 교차반응 또는 비특인 반응에 의한 오진을 가능성을 가지고 있어 특이적이고 신속하게 진단할 수 있는 기술이 요구되고 있는 실정이다. 이에 발맞추어 중합효소 연쇄반응, 조직내 교잡법, 다중 역전사 중합효소 연쇄반응등 유전자적 기법을 적용한 진단법을 개발하고, 국내 실정에 적용, 실용화 하고자 하였다. 1주에서 3주령에 이르는 포유자돈에서 주로 문제를 일으키는 *Isospora suis*에 의한 콕시듐 설사병의 진단을 위한 조직검사법을 상

용화하고 조직내 교잡법을 개발하여 *I. suis*외에도 돼지에서 감염되는 원충성 질병 (Toxoplasmosis, Sarcosystis, Neosporosis)들과 감별 진단하고자 하였다. 그리고, 육성돈과 비육돈에서 유발되는 살모넬라증과 증식성 회장염은 돼지 출하일령 지연 과 생산성 저하와 상관성이 높은 질환으로서 신속한 진단에 의한 처방이 중요하다. 증식성 회장염의 병원체인 *Lawsonia intracellularis*의 경우 육성/비육돈에서 혈변과 함께 폐사를 일으키는 질병으로 세계적으로 미국과 영국 각각 1개 실험실에서만 배양이 가능하며, 배양시간도 수개월이 소요되어 진단에 많은 어려움을 겪고 있다. *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*등 다양한 종의 살모넬라균에 의해 유발되는 살모넬라증의 경우 혈변, 청색증, 급사, pot belly등의 임상증상을 보인다. 그러나, 정확한 균분리 동정에 많은 시간이 소요되며, 균분리가 어려운 단점이 있어 진단을 방해할 수 있다. 이러한 육성돈 설사의 진단에 면역조직화학적 기법, 조직내 교잡법, 중합효소 연쇄반응등 현대적인 검사법을 이용하여 국내 실정에 적합한 진단법을 체계화 하고자 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 다중 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법 개발

가. 프라이머 제작

돼지 유행성 설사병 바이러스 CV777 strain의 membrane(M) gene 부위에서 전방향 프라이머(PA) 5'-GGG CGC CTG TAT AGA GTT TA-3' (927-946)과 역방향 프라이머(PB) 5'-AGA CCA CCA AGA ATG TGT CC-3' (1319-1338)를 제작하였다. 돼지 전염성 위장염 바이러스의 경우 강독주인 Purdue strain (ATCC VR-763)의 염기서열을 기본으로 비교적 염기서열의 변이가 없는 nucleocapsid(N) gene 부위에 전방향 프라이머 (TA) 5'-GAT GGC GAC CAG ATA GAA GT-3' (1226-1245)와 역방향

프라이머 (TB) 5'-GCA ATA GGG TTG CTT GTA CC-3' (1818-1837)를 제작하였다. 각 프라이머는 다른 코로나 바이러스와 유사성을 가지지 않았다.

나. 중합효소 연쇄반응을 위한 RNA 추출

15ml Falcon tube에 PBS를 3ml 분주한 소장 유체 또는 분변 샘플 3g을 넣고 vortex하여 현탁(50%)하였다. 5,000rpm으로 5분간 원심하여 얻어진 상층액 500 μ l를 Trisol LS (Gibco BRL) 500 μ l가 담긴 eppendorf tube에 넣고 vortex하여 상온에 10분간 정체시켰다. 여기에 300 μ l의 chlorform을 첨가하여 다시 10분간 정체시킨 다음 4 $^{\circ}$ C 4,000g에서 15분간 원심하였다. 원심후 얻어진 상층액 500 μ l를 새로운 eppendorf tube에 넣고, Isopropanol 500 μ l를 추가하고 vortex하여 -20 $^{\circ}$ C에서 overnight 침전시켰다. 다음날 아침에 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm으로 30분간 원심한 후 상층액은 버리고 cold 70% ETOH 500 μ l로 세척 후 다시 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm 조건으로 30분간 원심하였다. 상층액을 제거하고 speed vacuum으로 건조시킨 후 30 μ l 멸균증류수로 부유하였다.

다. 역전사반응

조직 유체로부터 추출된 RNA 1 μ l, DEPC D.W. 3.5 μ l, 2.5mM dNTP 2 μ l, 10X PCR buffer (1.25mM MgCl₂) 2 μ l, oligo d(T) 0.5 μ l, RNase inhibitor(50U) 0.5 μ l, MuLV reverse transcriptase(200U) 0.5 μ l (Perkin Elmer)를 혼합하여 총반응량을 10 μ l로 맞춘 후에 42 $^{\circ}$ C에서 40분간 반응하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

라. 다중 중합효소 연쇄반응

역전사 반응을 마친 10 μ l의 cDNA template에 중합효소 연쇄반응을 위해서 PA, PB, TA, TB 프라이머 (25pmol/ μ l) 각 1 μ l, 5 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5 μ g/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50 μ l의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서

30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72°C 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 10 μ l를 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel에 전기영동 하였다.

2. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 유행성 설사병 진단법 개발

가. RNA 추출

세포배양에 적응된 돼지 유행성 설사병 바이러스 CV777를 Vero cell에 trypsin배양을 실시하여 거대다핵세포를 형성하는 cytopathic effect가 70-80% 형성되었을 때 freezing and thawing을 3회 반복 후 얻어진 세포배양액을 RNA 추출에 사용하였다. 세포배양액으로부터 RNA를 추출하는 방법은 실험 1. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법에서와 동일하게 사용하였다.

나. 역전사 중합효소 연쇄 반응

세포배양으로부터 얻어진 바이러스 RNA를 실험 1. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법과 동일한 방법으로 역전사반응을 수행하였다.

중합효소 연쇄반응을 위해 사용된 전방향과 역방향 프라이머는 membrane gene 부위에서 디자인된 5'- GGA CAC ATT CTT GGT GGT CT-3' (1318-1338)과 5'-GTT TAG ACT AAA TGA AGC ACT TTC-3' (1665-1688)을 사용하였다. 역전사 반응을 마친 10 μ l의 cDNA template에 중합효소 연쇄반응을 위해서 전방향과 역방향 프라이머 (25pmol/ μ l) 각 1 μ l, 5 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5 μ g/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50 μ l의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 1분간 40 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72°C 10분간 반응하였다.

다. 탐침자 제작

역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 얻어진 377bp의 특이적인 DNA 분절은 Wizard PCR preps (Promega Biotech)을 이용하여 정제하고, DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 digoxigenin으로 임의표지하여 탐침자로 이용하였다.

라. 조직내 교잡법

돼지 유행성 설사병에 이환된 자돈의 장조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 3 μ m 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 부착시켜 상온에 보관하였다. 조직 절편을 xylene에 탈파라핀 시키고 합수과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4)에 5분간 두었다. 표적핵산 노출을 위해 0.1 N HCl에 20분간 처리하고, 100 μ g/ml의 proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1M triethanolamine-HCl buffer (pH 8.0)에 0.25% acetic anhydride를 넣고 5분간 acetylation 시킨 후 0.25% acetic anhydride를 한 번 더 넣고 5분간 더 acetylation 시켰다. 2 \times saline sodium citrate (SSC) (1 \times SSC; 50mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)로 10분간 세척 후 교잡반응을 수행하였다. Digoxigenin으로 표지된 DNA probe를 0.1ng/ μ l의 농도가 되도록 standard hybridization buffer에 희석하여 50 μ l 정도를 slide 조직위에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮고 가장자리를 rubber cement로 잘 봉한 다음 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 45 $^{\circ}$ C에서 15시간 반응시켰다. 교잡반응 후 coverslip을 제거하고 상온의 4 \times SSC에 5분간 2회, 45 $^{\circ}$ C 2 \times SSC와 상온의 2 \times SSC에서 각각 10분씩 2회, 그리고 0.2 \times SSC에서 5분간 2회 세척 후 maleic acid buffer (Buffer 1; 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5)로 5분간 처리한 후 1 \times blocking buffer (Buffer 2)에서 40분간 처리하였다. 양성반응을 검출하기 위해 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin (Boehringer Mannheim)을 Buffer 2에 1:250으로 희석하여 조직 절편위에 잘 떨어뜨린 후 37 $^{\circ}$ C에

서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Buffer 1과 Buffer 2에서 각각 1회 처리 후 detection buffer (Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH 9.5)로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium 과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate를 Buffer 3에 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 상온에서 3-4시간 정도 반응시켰다. 발색이 끝난 후 tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 에 여러번 dipping하여 반응을 중지시킨 후 0.5% methyl green으로 대조염색한 후 증류수에 세척하여 완전히 말린 후 mounting하여 현미경으로 관찰하였다

3. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 전염성 위장병 진단법 개발

가. 돼지 전염성 위장염 바이러스 RNA 추출

Transmissible gastroenteritis virus Purdue strain (ATCC VR-763)를 구입하여 돼지 고환 세포주에 배양하고, cytopathic effect가 70-80% 형성되었을 때 freezing and thawing을 3회 반복후 얻어진 세포배양액을 RNA 추출에 사용하였다. 세포배양액으로부터 RNA를 추출하는 방법은 실험 1. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법에서와 동일하게 사용하였다

나. 역전사 중합효소 연쇄 반응

세포배양으로부터 얻어진 바이러스 RNA를 실험 1. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법과 동일한 방법으로 역전사 반응을 수행하였다.

중합효소 연쇄반응을 위해 사용된 전방향과 역방향 프라이머는 nucleocapsid gene 부위에서 디자인된 5'-GAT GGC GAC CAG ATA GAA GT-3' (1226-1245)과 5'-GCA ATA GGG TTG CTT GTA ACC-3' (1818-1837)을 사용하였다. 역전사 반응을 마친 10 μ l의 cDNA template에 중합효소 연쇄반응을 위해서 전방향과 역방향 프라이머 (25pmol/ μ l) 각 1 μ l, 5 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3),

400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5μg/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50μl의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72℃ 10분간 반응하였다.

라. 조직내 교잡법

실험 2의 조직내 교잡법을 이용한 돼지 전염성 위장병 진단법과 동일한 방법을 이용하여 수행하였다.

4. 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법을 이용한 증식성 회장염 진단법 개발

가. 공시 동물

서울대학교 수의과대학 병리학교실에 전형적인 증식성 회장염 증상을 보이는 5두 자돈을 공시 동물로 사용하였다. 각 공시동물로부터 채취한 회장 조직의 일부는 중합효소 연쇄반응에 사용하였으며, 일부 조직은 24시간 포르말린에 고정하고 일반적인 조직 처리과정을 통하여 파라핀 포매하였다. 파라핀 조직 샘플은 Hematoxylin and Eosin (H&E) stain 과 Warthin-Starry (WS) Silver stain을 실시하여 회장의 증식성 병변과 회장 음와(crypt) 상피세포내의 *Lawsonia intracellularis*를 확인하였다.

나. 중합효소 연쇄반응

증식성 회장염에 이환된 장상피 점막으로부터 commercial DNA isolation kit (Pharmacia-LKB Biotech)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 중합효소 연쇄반응에 전방향 프라이머(LI-1)와 역방향 프라이머(LI-2)로 5'-TAT GGC TGT CAA ACA CTC CG-3' (nucleotides 5-24) 와 5'-TGA AGG TAT TGG TAT TCT CC-3' (nucleotides 304-323)을 각각 사용하였다. 장상피 점막으로부터 추출한 DNA template 5μl, 전방향과 역방향 프라이머 (25pmol/μl) 각 1μl, 5μl 10×reaction buffer (100mM

Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5μg/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고 최종 volume이 50μl이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 반응액을 혼합하였다. 중합효소 연쇄반응은 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA)를 이용하여 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72℃ 10분간 반응하였다. 반응 후 반응산물 10μl를 채취하여 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel상에서 전기영동하였다.

나. 면역조직 화학법

면역조직 화학법을 위하여 준비된 파라핀 조직을 xylene에 10분간 2회 침적하여 탈 파라핀화 시키고, 알코올을 이용하여 함수과정을 수행하였다. Endogenous alkaline phosphatase를 제거하기 위하여 glacial acetic acid (20%)를 4℃에서 2분간 처치하였다. 이후 proteinase K (Gibco BRL)을 phosphate-buffered saline (PBS; 0.1M, pH 7.4)에 100μg/ml 되도록 하여 36℃ 20분간 반응시켰다. 비특이반응을 차단하기 위하여 10% normal goat serum을 PBS(0.1M, pH 7.4)에 희석하여 조직상에 적용하고, 상온에서 30분간 반응하였다. *Lawsonia intracellularis*의 25-27kD outer membrane protein과 반응하는 단크론 항체를 PBTS에 250배 희석하여 1차 항체로 적용하고 4℃에서 overnight incubation하였다. PBTS로 3회 세척하고, PBTS에 100배 희석한 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (Dako)를 2차 항체로 사용하였다. PBTS로 3회 세척하고, Tris buffer (pH 9.5)로 처리하였다. 발색반응은 alkaline phosphatase red substrate (Vector Laboratories)로 상온에서 20분간 수행하였고, 수세 과정을 거쳐 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 후 mounting하여 관찰하였다.

5. 중합효소 연쇄반응과 조직내 교잡법을 이용한 살모넬라증 진단법 개발

가. 공시 동물

서울대학교 수의과대학 병리학교실에 전형적인 살모넬라증 증상을 보이는 10두 육성

돈을 공시 동물로 사용하였다. 각 공시동물로부터 채취한 대장 조직의 일부를 중합효소 연쇄반응에 사용하였으며, 장내용물에서 *Salmonella choleraesuis*를 분리 동정하였다. 일부 장조직은 24시간 포르말린에 고정하고 일반적인 조직 처리과정을 통하여 파라핀 포매하였다. 파라핀 조직 샘플은 Hematoxylin and Eosin (H&E) stain을 실시하였고, 조직내 교잡법을 위하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 4 μ m의 두께의 절편을 준비하였다.

나. 중합효소 연쇄반응

실험에 사용한 프라이머는 *Salmonella choleraesuis*의 *invasin* gene에서 디자인 하였다. 전방향 프라이머(Sal F)와 역방향 프라이머(Sal R)로 5'-TGC CTA CAA GCA TGA AAT GG-3' , 5'-AAA CTG GAC CAC GGT GAC AA-3'를 제작하였다. 실험 4. 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법을 이용한 증식성 회장염 진단법에서 사용한 DNA 추출법 및 중합효소 연쇄반응 조건을 이용하여 반응을 수행하였다.

다. 조직내 교잡법

탐침자는 본 실험실에서 보관하고 있는 *Salmonella choleraesuis* reference strain으로부터 추출한 DNA를 중합효소 연쇄반응을 거쳐 Digoxigenin으로 임의표지하여 제작하였다.

실험 2의 조직내 교잡법을 이용한 돼지 전염성 위장병 진단법과 동일한 방법을 이용하여 수행하였다.

6. 병리조직학적 검사를 이용한 콕시디움 설사병의 진단법 체계화

가. 공시동물

서울대학교 수의과대학 병리학교실에 설사 증상으로 의뢰된 7에서 21일령의 자돈 중 분변에서 충란검사를 통하여 콕시디움 설사병으로 진단된 10두의 포유자돈을 공시동물로 사용하였다. 포유자돈의 소장조직을 일반적인 조직처리 과정에 의해 준비하였으며,

H&E stain 하였다.

7. 중합효소 연쇄반응을 이용한 대장균성 설사병 진단법 체계화

가. 공시균주

서울대학교 수의과대학 병리학교실에 설사증상으로 의뢰된 자돈으로부터 분리된 포유자돈 대장균 720개와 이유자돈 대장균 230개를 사용하였으며, 5가지 fimbriae와 5가지 장내독소 (LT, STa, STb, EAST-1, Stx2e)에 대하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

다. 프라이머

5가지 fimbriae와 5가지 장내독소에 대한 특이적인 프라이머를 제작하여 실험에 사용하였으며, 다음과 같다.

Primer	Sequence	Product size
F4	5'-GGTGATTTCAATGGTTCGGTC-3'	704
	5'-ATTGCTACGTTTCAGCGGAGCG-3'	
F5	5'-TGCGACTACCAATGCTTCTG-3'	450
	5'-TATCCACCATTAGACGGAGC-3'	
F6	5'-TCTGCTCTTAAAGCTACTGG-3'	333
	5'-AACTCCACCGTTTGTATCAG-3'	
F18	5'-GTGAAAAGACTAGTGTTTATTTG-3'	510
	5'-CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC-3'	
F41	5'-GAGGGACTTTCATCTTTTAG-3'	431
	5'-AGTCCATTCCATTTATAGGC-3'	
LT	5'-ATTTACGGCGTTACTATCCTC-3'	280
	5'-TTTTGGTCTCGGTCAGATATG-3'	
STa	5'-TCCGTGAAACAACATGACGG-3'	244
	5'-ATAACATCCAGCACAGGCAG-3'	
STb	5'-GCCTATGCATCTACACAATC-3'	278
	5'-TGAGAAATGGACAATGTCCG-3'	
EAST-1	5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3'	111
	5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3'	
Stx2e	5'-AGGAAGTTATATTTCCGTAGG-3'	386
	5'-GTATTTGCCTGAACCGTAA-3'	

제 3 절 결과 와 고찰

1. 다중 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 유행성 설사병과 돼지 전염성 위장염의 감별 진단법 개발.

국내에서 분리한 돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스를 각각 Vero cell과 Swine testicular cell에 배양하여 RNA를 추출하고 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 각각 412 base pair (돼지 유행성 설사병 바이러스)와 612 base pair (돼지 전염성 위장염 바이러스)의 특이적인 유전자를 검출하였다. 또한 돼지 유행성 설사병 바이러스에 감염된 자돈으로부터 얻은 10개의 분변 및 소장 조직 샘플로부터 412 base pair의 유전자를 검출할 수 있었으며, 돼지 전염성 위장염 바이러스에 감염된 10두의 자돈으로부터 얻은 분변 및 소장조직으로부터 612 base pair의 유전자를 공히 검출할 수 있었다. (Figure 1)

개발된 다중 역전사 중합효소 연쇄반응의 민감도 및 특이도 검사를 수행하였다. 특이도 검사를 위해서 돼지 전염성 위장염 바이러스(TGEV)는 Miller strain, Purdue strain, 두 개의 야외분리주 SNUVR 980557, SNUVR 980483를 사용하였으며, 돼지 유행성 설사병 바이러스 CV777 strain, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지 로타 바이러스 A형과, B형을 사용하였다. 특이도 검사결과 돼지 전염성 위장염 바이러스 프라이머는 교차반응 없이 돼지 전염성 위장염 바이러스만 검출할 수 있었으며, 돼지 유행성 설사병 바이러스 프라이머도 동일하게 특이적으로 유전자를 검출할 수 있었다. 민감도 검사에서는 돼지 전염성 위장염 바이러스와 돼지 유행성 설사병 바이러스 공히 10 TCID₅₀/ml까지 검출할 수 있었다. (Figure 2)

본 실험에서 개발된 다중 역전사 중합효소 연쇄반응은 매우 민감도가 높아 자돈의 분변 및 소장조직에서도 바이러스를 교차반응없이 검출할 수 있었다. 분변이나 소장조직으로부터 추출되는 RNA에는 중합효소 연쇄반응을 방해하는 Inhibitor가 많이 포함되어 있어 검출이 어려운 것으로 알려져 있으나, 본 진단법은 민감도 검사 및 특이도 검사가 높아 임상 가검물에서 돼지 전염성 위장염 바이러스와 돼지 유행성 설사병 바이

러스를 감별 진단하는데 매우 유용할 것으로 사료된다.

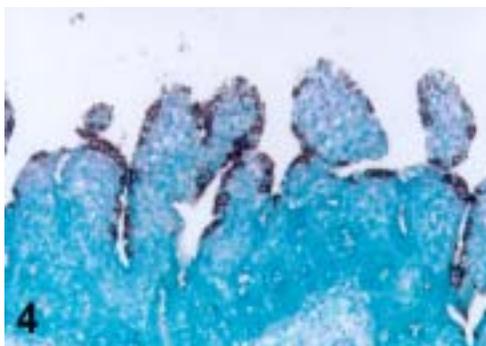
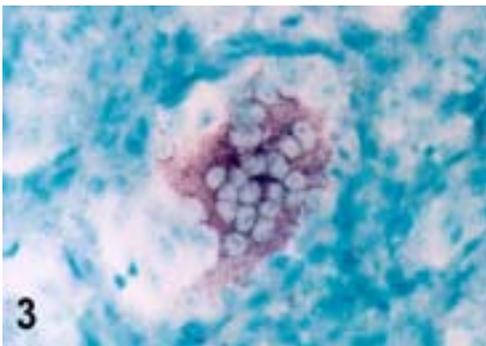
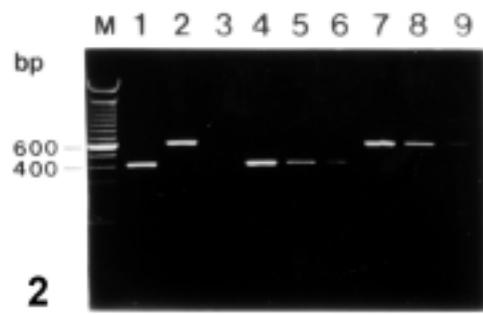
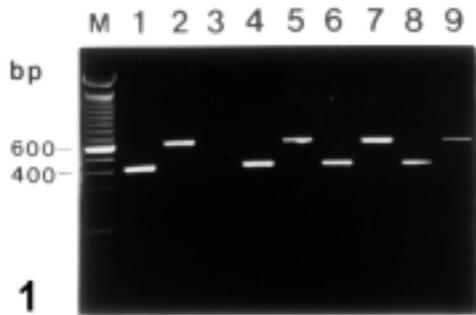
2. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 유행성 설사병 진단법 개발.

돼지 유행성 설사병으로 진단되어진 3-10일령의 자돈 10두를 공시 동물로 이용하였다. 10두 자돈의 십이지장, 공장, 회장 부위에서 조직내 교잡법을 수행하였다. (Table 1) 주로 자돈의 공장, 회장 부위의 장상피 세포에서 돼지 유행성 설사병 바이러스의 핵산을 검출할 수 있었으며, 1두 자돈은 십이지장부위에서도 핵산을 검출할 수 있었다. (Figure 3, 4, 5) 음성 대조군으로 사용된 돼지 전염성 위장염 바이러스 감염조직이나 돼지 로타바이러스 감염 조직에서는 양성반응이 관찰되지 않아 교차반응이 없음을 확인할 수 있었다. 조직내 교잡법은 유사한 소장 조직 병변을 일으키는 포유자돈 바이러스 감염증 중에서 돼지 유행성 설사병을 검출하는 진단법으로 유용할 것으로 사료된다. 또한, 돼지 유행성 설사병에 대한 병인론 연구에도 유용할 것이다.

Table 1. Results of in situ hybridization for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in the small intestinal villi of piglets naturally infected with PEDV.

Piglet No.	Age(days)	In situ hybridization*		
		Duodenum	Jejunum	Ileum
1	8	-	+	+
2	5	+	+	+
3	7	-	+	+
4	3	-	+	+
5	7	-	+	+
6	7	-	+	+
7	7	-	+	+
8	5	-	+	+
9	10	-	+	+
10	7	-	+	+

* Reaction: - = no hybridization signals; + = positive hybridization signals.



Legends of Figures

Figure 1. Ethidium bromide-stained 1% agarose gel electrophoresis showing detection of the PEDV and TGEV by multiplex RT-PCR. From left to right: lane M=100bp DNA ladder; lane 1=PEDV standard strain; lane 2=TGEV standard strain; lane 3=negative control; lane 4=PEDV field isolate; lane 5=TGEV field isolate; lane 6=PEDV-positive intestinal sample; lane 7=TGEV-positive intestinal sample; lane 8=PEDV-positive fecal sample; lane 9=TGEV-positive fecal sample.

Figure 2. Sensitivity of detection of the PEDV and TGEV by multiplex RT-PCR. From left to right: lane M=100bp DNA ladder; lane 1=PEDV standard strain; lane 2=TGEV standard strain; lane 3=negative control; lane 4= 10^3 TCID₅₀/ml of PEDV; lane 5= 10^3 TCID₅₀/ml of PEDV; lane 6= 10^2 TCID₅₀/ml of PEDV; lane 7= 10^2 TCID₅₀/ml of TGEV; lane 8= 10 TCID₅₀/ml of TGEV; lane 9= 10 TCID₅₀/ml of TGEV.

Figure 3. PEDV-infected Vero cells hybridized with a DIG-labeled cDNA probe (377 base pair). PEDV RNA (dark brown reaction) appears in the cytoplasm of a syncytial cell. In situ hybridization

Figure 4. Jejunum; Piglet No. 1. PEDV RNA (dark brown reaction) is present in the epithelium covering moderately atrophic villi. In situ hybridization

Figure 5. Ileum; Piglet No. 6. PEDV RNA (dark brown reaction) is present in the cytoplasm of villus enterocytes. In situ hybridization

3. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 전염성 위장병 진단법 개발.

형광항체 검사법, 바이러스 분리, 전자현미경등을 이용하여 돼지 전염성 위장염으로 진단된 21두의 자돈을 사용하였다. 21두 자돈의 십이지장, 공장, 회장에서 조직내 교잡법을 수행하였다. 음성대조군으로는 바이러스에 감염되지 않은 1일령 자돈의 소장조직과 돼지 유행성 설사병에 감염된 자돈의 장조직을 사용하였다. 조직내 교잡법 결과 음성대조군에서는 양성반응을 검출할 수 없었으며, 전염성 위장염 바이러스에 감염된 21두의 장조직에서 바이러스의 핵산을 검출할 수 있었다. (Table 2) 바이러스의 핵산은 공장과 회장의 장상피세포에서 주로 관찰되었으며, 1두에서는 십이지장에서도 핵산을 검출할 수 있었다. 또한, 지금까지 알려진 것과는 달리 돼지 전염성 위장염 바이러스의 핵산을 음와(Crypt)부위에서 검출할 수 있었다. (Figure 6, 7) 형광항체법, 바이러스 분리, 전자현미경 검사법등의 결과와 비교하여 보았을 때, 본 실험에 사용된 조직내 교잡법은 특이도와 민감도 매우 민감하여 돼지 전염성 위장병의 진단법으로서 유용할 것으로 사료된다.

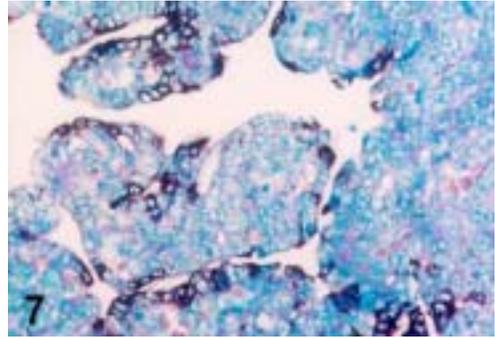
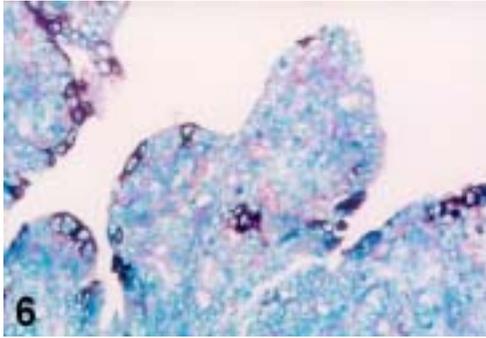


Figure 6. Jejunum; TGEV nucleic acid (dark brown reaction) is present in the epithelium covering moderately atrophic villi. In situ hybridization.

Figure 7. Jejunum; TGEV nucleic acid (dark brown reaction) is present in the epithelium covering moderately atrophic villi and cryptic epithelium. In situ hybridization.

Table 2. Detection of TGEV from naturally infected piglets

Piglet No.	Age	ISH			FAT			VI	TEM
		Duodenum	Jejunum	Ileum	Duodenum	Jejunum	Ileum		
1	3	-	+	+	-	+	+	+	-
2	5	-	+	+	-	-	-	+	-
3	4	-	+	+	-	-	-	+	-
4	3	-	+	+	-	-	-	-	-
5	3	-	+	+	-	+	+	+	+
6	5	-	+	+	-	+	+	-	-
7	4	-	+	+	-	-	-	+	+
8	4	-	+	+	-	-	-	+	-
9	5	-	+	+	-	-	-	-	-
10	6	-	+	+	-	+	+	-	-
11	7	+	+	+	-	+	+	+	+
12	3	-	+	+	-	+	+	+	+
13	3	-	+	+	-	+	+	-	-
14	5	-	+	+	-	+	+	+	+
15	5	-	+	+	-	+	+	+	-
16	6	-	+	+	-	+	+	+	-
17	5	-	+	+	-	+	+	+	-
18	3	-	+	+	-	+	+	+	-
19	3	-	+	+	-	+	+	-	-
20	6	-	+	+	-	+	+	-	-
21	5	-	+	+	-	+	+	+	+

* ISH - in situ hybridization; FAT - fluorescence antibody test; VI - virus isolation; TEM - transmission electron microscopy

4. 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법을 이용한 증식성 회장염 진단법 개발.

*Lawsonia intracellularis*에 자연 감염된 돼지 5두의 회장 조직에서 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 장조직 유제로부터 추출된 DNA에서 *Lawsonia intracellularis*에 특이적인 319 base pair 크기의 유전자를 증폭하였다. (Figure 8)

증식성 회장염에 자연 감염된 돼지의 회장 조직은 일반적인 조직처리과정을 통하여 제작되었으며 H&E stain 하였다. 또한, Warthin-Starry (WS) silver stain의 결과 검은색의 나선상 모양의 세균을 회장 음와(Crypt)의 상피내강에서 확인할 수 있었다. (Figure 9)

연속절편 조직상에서 실시한 면역 조직 화학법 결과는 WS silver stain에서 확인한 나선상 형태의 세균부위에서 *Lawsonia intracellularis*의 outer membrane protein을 확인할 수 있었다. (Figure 10)

증식성 회장염을 일으키는 *Lawsonia intracellularis*는 균분리 배양이 어렵고, 오랜 시간이 소요되는 단점이 있어 세계적으로도 영국과 미국 몇 개의 실험실에서만 연구가 되고 있다. 본 연구에서 개발된 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법은 세균의 분리 배양 없이 분변 또는 장조직 샘플로부터 증식성 회장염을 신속 정확하게 진단하는 진단법으로서 매우 유용할 것으로 사료된다.

5. 중합효소 연쇄반응과 면역 조직 화학법을 이용한 살모렐라증 진단법 개발.

살모렐라균 감염이 의심되는 돼지의 결장 궤양 조직에서 살모렐라에 특이적인 핵산을 검출할 수 있었다. 살모렐라가 감염된 결장 조직은 미란 또는 궤양이 형성되어 있었으며, 경계면에는 다수의 호중구가 침윤하여 대상으로 관찰되었다. 살모렐라에 대한 조직내 교잡법 결과 암갈색의 양성반응이 궤양의 경계부위에 위치한 호중구에서 관찰되었으며, 음성대조군에서는 살모렐라에 특이적인 핵산을 검출할 수 없었다. (Figure 11)

6. 병리조직학적 검사를 이용한 콕시디움 설사병의 진단법 체계화.

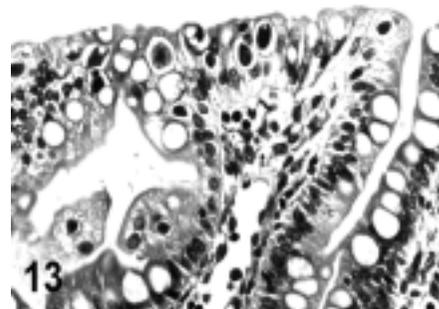
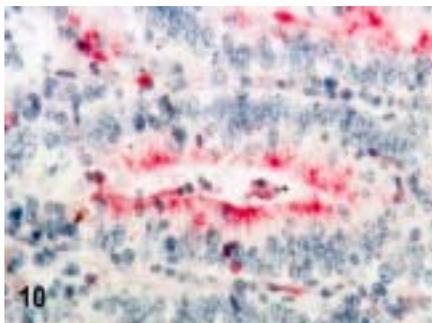
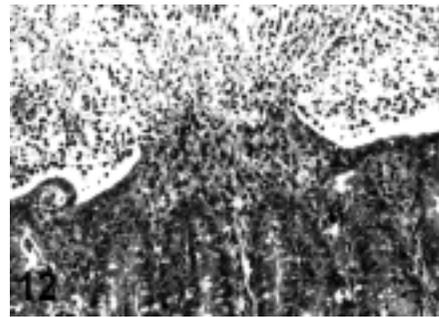
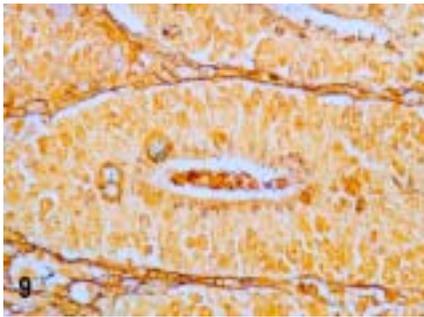
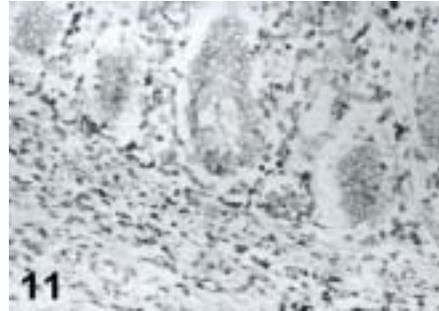
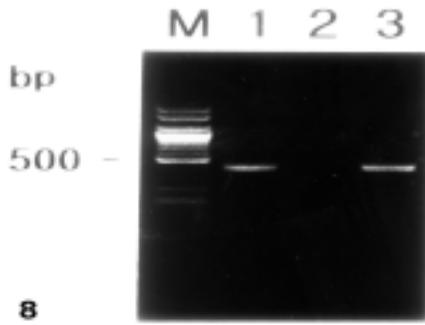
분변검사를 통하여 콕시디움 충란이 검출된 7-21일령의 자돈 10두에 대하여 병리조직학적 검사를 수행하였다. *Isospora suis*에 감염된 포유자돈의 소장 조직은 장용모가 위축되어 높이가 낮아지고 부위에 따라서는 융합된 형태로 관찰되었다. 또한, 탈락된 장 상피세포와 염증세포가 얽혀져 위막을 형성하고 있었다. (Figure 12) 특히, 장 상피세포의 내강에 한계 명료하게 존재하는 *Isospora suis*의 merozoites 또는 male / female gamonts를 확인할 수 있었다. (Figure 13)

7. 중합효소 연쇄반응을 이용한 대장균성 설사병 진단법 체계화.

설사증상으로 의뢰된 포유자돈 756두에서 분리한 대장균 720개에 대하여 4가지 종류의 fimbriae (F4, F5, F6, F41)와 4가지 장내독소 (LT, STa, STb, EAST-1)에 대한 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 검사결과 720개의 대장균 중에서 164 (22.7%) 개 대장균에서 EAST-1에 대한 유전자를 확인할 수 있었다. EAST-1을 보유하고 있는 대장균 중 11 (6.7%)개의 균은 한 개 이상의 fimbriae 만을 가지고 있었으며, 51 (31.1%)개의 균주는 한 개 이상의 장내독소 유전자를 보유하는 것으로 조사되었다. 40 (23.8%)개의 EAST-1 보유 균주는 fimbriae와 장내독소를 함께 보유하는 것으로 조사되었다. 또한, 최근에 확인된 대장균독소인 EAST-1 유전자만 가지고 있는 대장균도 62 (37.8%)개로 매우 높은 빈도로 검출되었다. EAST-1과 상관성있는 fimbriae와 장내독소는 F4 (16%) 와 STa (46%) 로 나타났으며, EAST1+, EAST1+STa+, EAST1+STa+STb+, EAST1+STa+F5+, EAST1+STa+F4+, EAST1+STb+F4+의 빈도로 유전자형이 조사되었다. (Table 3)

설사증상 또는 부종으로 의뢰된 이유자돈 476두에서 분리한 대장균 252개에 대하여 5가지 fimbriae (F4, F5, F6, F18, F41)와 5가지 장내독소 (LT, STa, STb, Stx2e, EAST-1)에 대한 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 검사결과 452개의 대장균 중에서 149 (31.3%)개 대장균에서 EAST-1에 대한 유전자를 확인할 수 있었다. 149개의

EAST-1을 보유하고 있는 대장균 중 66 (44.3%)개의 균은 EAST-1만을 가지고 있었다.



Legends of Figures

Figure 8. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified *L. intracellularis* DNA products. M=100bp DNA ladder; Lane 1=positive control; Lane 2=Negative control; Lane 3=a sample from a pig with proliferative enteropathy

Figure 9. Clusters of argyrophilic, slightly curved rod-shaped organisms are seen in the cytoplasm of hyperplastic cryptic epithelial cells. Warthin-Starry silver stain. × 200.

Figure 10. Clusters of immunopositive intracellular organisms are seen in the cytoplasm of hyperplastic cryptic epithelial cells. Immunohistochemistry, alkaline phosphatase, fast red, hematoxylin. ×200.

Figure 11. In situ hybridization in pig naturally infected with *Salmonella choleraesuis* ×200.

Figure 12. Severe necrosis of villous epithelium with adherent necrotic debris in jejunum from a seven-day-old piglet. HE ×200.

Figure 13. Atrophic villous with female gamont and merozoite of *Isospora suis* within villous epithelium and hyaline material at the apex of the villous in the ileum of a 14-day-old piglet. HE ×400.

또한, 하나 이상의 fimbriae만 가지고 있는 대장균은 6개, 하나 이상의 장내독소만 가지고 있는 대장균은 21개 였으며, 하나 이상의 fimbriae와 장내독소를 가지고 있는 균주는 58개로 조사되었다. fimbriae와의 상관성은 F4, F18, F5, F6의 순으로 높았으며, 장내독소와의 상관성은 STa, STb, LT, Stx2e의 순서로 높았다. (Table 4)

본 연구에서 확립된 중합효소 연쇄반응을 통한 대장균 진단법 실용화는 야외에서 분리되는 대장균 분리주에 대한 정확한 진단과 유전자형에 대한 정보를 제공할 수 있다. 또한, 이러한 진단법은 대장균의 표현형에 대한 정보를 제공하여 정확한 질병방역 대책 수립에도 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 3. Genotypic profiles of fimbriae and enterotoxins in preweaning *E. Coli*

Fimbrial adhesins	EAST1 only	EAST1 plus						
		STa	STb	LT	STa STb	STa LT	STb LT	STa STb LT
4F ^{-*}	62	33	5	0	9	1	0	3
F4	4	7	6	1	3	2	1	2
F5	3	9	0	0	0	0	0	0
F6	1	3	0	0	1	0	0	0
F41	3	0	0	0	0	0	0	0
F4 + F5	0	0	0	0	0	0	0	0
F4 + F6	0	0	1	1	2	0	0	0
F5 + F6	0	1	0	0	0	0	0	0

* 4F *E. coli* do not carry any genes of F4, F5, F6 or F41.

Table 4. Genotypic profiles of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* isolated from the postweaning piglets

Fimbrial Adhesins	EAST1 only	EAST1 plus									
		STa	STb	LT	Stx2e	STa STb	STa LT	STa Stx2e	STb LT	STa STb LT	STa STb Stx2e
5F ^{-*}	66	8	2	2	0	2	0	1	3	1	2
F4	4	4	0	1	0	1	8	0	3	9	0
F5	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F18	1	3	0	0	3	5	0	4	0	1	5
F5 + F6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F4 + F18	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1

* 5F do not carry any of F4, F5, F6, F18, F41.

8. 포유자돈 설사병 발생분포.

2차년도에 2,652건의 포유자돈 설사증을 의뢰받아 대장균설사증(1,618건), 돼지유행성설사병(583건), 콕시디움설사증(286건)과 돼지전염성위장염(77건)을 진단하였다. 대장균설사증의 경우 3월에서 6월까지 집중적으로 발병한 반면, 돼지유행성설사병의 경우 1월에서 4월에 집중적으로 발병하였다. 콕시디움설사증은 7월에서 9월에 집중적으로 발병하였다. 본 연구 결과 국내에서 가장 문제가 되는 포유자돈 설사병은 대장균설사증, 돼지유행성설사병과 콕시디움설사증으로 확인되었다. 또한 각각의 질병은 계절적으로 각각 특이적인 발병 양상이 나타나고 있다. (Table 5)

(기간:2000.11-2001.10)

월	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
대장균설사증	69	84	116	126	139	226	176	165	126	139	174	78
돼지유행성설사병	24	23	32	52	124	149	51	31	36	18	23	20
돼지전염성위장염	2	3	5	6	17	6	15	3	9	0	0	11
콕시디움설사증	7	15	6	11	17	37	31	28	24	71	28	11

Table 5. Prevalence of diarrhea in preweaning pig from 2000, 11 to 2001. 10

3차년도에 1,572건의 포유자돈 설사증을 의뢰받아 대장균설사증(1,043건), 돼지유행성설사병(463건), 콕시디움설사증(63건)과 돼지전염성위장염(3건)을 진단하였다. 대장균설사증의 경우 11월에서 1월중에 집중적으로 발병하였고, 돼지유행성설사병의 경우도 11월에서 1월 사이에 집중적으로 발병하였다. 콕시디움설사증은 7월에서 8월 사이뿐만 아니라 11월에서도 집중적으로 발병하였다. 본 연구 결과 국내에서 가장 문제가 되는 포유자돈 설사병은 대장균설사증, 돼지유행성설사병과 콕시디움설사증으로 확인되었다. 그리고 포유자돈 설사증이 2차년도와 달리 11월과 1월 사이에 집중되는 양상을 나타내고 있다. (Table 6)

(기간:2001.11-2002.10)												
월	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
대장균설사증	149	116	125	67	85	97	69	68	66	60	56	85
돼지유행성설사병	67	59	98	52	57	53	18	17	15	11	8	8
돼지전염성위장염	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
콕시디움설사증	13	5	0	7	8	2	3	5	5	8	3	4

Table 6. Prevalence of diarrhea in preweaning pig from 2001, 11 to 2002. 10

9. 이유자돈, 육성돈, 비육돈 설사병 발생분포

2차년도에 1,203건의 이유자돈, 육성돈, 비육돈 설사증을 의뢰받아 증식성회장염(376건), 살모렐라증(329건), 결장염(249건)을 진단하였다. 증식성회장염의 경우 2월에서 4월중에 집중적으로 발병하였고, 살모렐라증의 경우는 4월에서 6월사이까지 집중적으로 발병하였다. 결장염은 3월에서 4월 사이에 집중적으로 발병하였다. 본 연구 결과 국내에서 가장 문제가 되는 이유자돈, 육성돈, 비육돈 설사병은 증식성회장염, 살모렐라증, 결장염 순으로 확인되었다. (Table 7)

(기간:2000.11-2001.10)												
월	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
증식성회장염	46	32	10	65	33	30	14	40	16	43	32	15
살모렐라증	31	27	18	16	36	33	56	22	6	29	22	33
결장염	21	24	3	13	38	40	37	32	4	24	3	10

Table 7. Prevalence of diarrhea in postweaning, growing and finishing pig from 2000, 11 to 2001. 10

3차년도에 1,112건의 이유자돈, 육성돈, 비육돈 설사증을 의뢰받아 증식성회장염(252건), 살모렐라증(262건), 결장염(310건)을 진단하였다. 증식성회장염의 경우 4월에서 5월 중에 집중적으로 발병하였고, 살모렐라증의 경우는 4월에서 5월 사이에 집중적으로 발병하였다. 결장염은 3월에서 4월 사이에 집중적으로 발병하였다. 본 연구 결과 국내에서 가장 문제가 되는 이유자돈, 육성돈, 비육돈 설사병은 결장염, 살모렐라증, 증식성회장염 순으로 확인되었다. (Table 8)

(기간:2001.11-2002.10)

월	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
증식성회장염	20	35	18	13	14	40	36	25	10	15	12	14
살모렐라증	37	12	30	17	8	34	32	23	24	14	14	17
결장염	24	38	17	25	40	41	18	27	15	28	15	22

Table 8. Prevalence of diarrhea in postweaning, growing and finishing pig from 2001, 11 to 2002. 10

제 3 장 돼지 호흡기 질환 진단법 개발

제 1 절 서 설

돼지의 만성폐렴은 거의 100여년에 걸쳐 양돈 산업에 있어 심각한 경제적 손실을 일으키고 있으며, 그 중 유행성 폐렴은 돼지 질병 중 세계에서 가장 흔하고, 돼지를 주로 생산하는 국가에서 유행성 폐렴의 폐병변을 보이는 것이 35-50% 정도가 되기도 한다. *Mycoplasma hyopneumoniae*의 감염에 의해 돼지에서 유발되는 만성 폐렴을 유행성 폐렴 또는 마이코플라즈마성 폐렴이라 하며, 만성 기침과 성장 정체, 낮은 폐사율 및 높은 이환율이 특징인 질병이다. *M. hyopneumoniae*의 배양은 매우 까다로우나, Friis broth에서 잘 자란다. 배지에서 *M. hyopneumoniae*가 자라면 약간의 탁도를 보이며, 산성의 대사산물을 배출하기 때문에 phenol red가 첨가된 배지는 색조가 흐려지게 된다. 폐장에서 균을 분리할 때 직접 agar를 사용하면 잘 분리되지 않고, broth에 여러번 계대한 후 agar에 적응해야 colony가 잘 형성된다. 배양시에는 5-10% CO₂와 sterol 및 glucose가 필요하다. Broth에서 수 차례 계대한 후 agar에 접종하여 2-3일이 지나면 'fried egg' colony를 관찰할 수 있다.

*M. hyopneumoniae*의 전파경로는 여러 가지가 있는데, 먼저 감염된 모돈으로 부터 포유시기에 포유 자돈으로의 수직 전파가 일어난다. 일단 몇몇 자돈이 감염되면 돈군내의 전파는 쉽게 일어나게 되는데, 특히 이유시기에 다른 모돈으로부터 이유된 자돈들을 함께 모아둘 경우 감염된 자돈으로 부터 다른 자돈으로의 수평 전파가 쉽게 일어난다. *M. hyopneumoniae*의 전파에 있어서 보균돈이 가장 큰 감염원인 것으로 보고 되고 있다. 한 돈군에서의 전파는 공기중으로 혹은 직접 접촉에 의해 일어나며, 감염돈의 호흡기계 분비물에 의해 쉽게 전파된다. 유행성 폐렴은 여러 원인에 의한 질병이므로 여러 가지 환경조건과 사양관리가 본 질병의 발병과 정도에 큰 영향을 미친다. 불량한 질병의 방어조치, 많은 방문객, 대규모의 돼지거래, 돈군의 낮은 건강상태 그리고, 불량한 사료급식 및 사양관리가 이 질병의 발병을 증가시킨다. 특히 돈사내의 사육밀도, 암모

니아가스 농도, 그리고 먼지의 양이 중요한 발병 인자이다.

*M. hyopneumoniae*의 감염으로 인해 림프구가 항체를 생성하는 능력이 줄어들면서 체액성 면역반응이 저하되며, 대식구에 의한 탐식작용이 억제되면서 세포성 면역반응 또한 저하된다. 이러한 억제효과는 감염초기에 주로 발생하지만 초기감염 후 몇 주간 억압 상태가 지속될 수 있다. 상피세포의 손상, 기관지와 세기관지 주위의 림프구의 침윤, 점액 과분비, 그리고 면역상태의 억제 등으로 인해 2차 세균 감염이 주로 일어나게 된다. 대표적인 2차 감염균으로는 *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*가 있으며, 화농을 형성하는 세균인 *Actinomyces pyogenes*, Streptococci, Staphylococci등도 빈번히 감염된다. 이것들로 인해 화농성 삼출물이 많이 생기게 되어 임상증상과 병변이 더 심해지며 치사율이 증가하게 된다.

유행성 폐렴의 진단은 특징적인 육안적 병변 및 조직학적 소견을 토대로 *M. hyopneumoniae*의 감염에 의한 폐렴임을 의심할 수 있다. 하지만 육안소견만으로 확진을 하기는 어려우며, *M. hyopneumoniae*를 분리 동정하는 것이 가장 정확한 진단방법이나 열혈에서 삼십일 이상 걸리는 느린 성장과 특별한 선택배지가 필요하므로 대개 실험실에서 일상적으로 이용하기는 어려운 면이 있다. 또한 돼지 폐렴에서 흔하게 2차적으로 감염되는 *M. hyorhinis*, 그리고 폐조직에 흔히 존재하는 비병원성인 *M. flocculare*의 오염으로 인하여 순수 분리 배양이 어려운 경우가 흔하다. *M. hyopneumoniae*와 *M. flocculare*는 항원성, 형태학적 특성 및 성장 양상이 매우 유사하기 때문에 *M. hyopneumoniae*를 정확히 분리 동정 하기는 무척 어렵다.

대표적인 혈청학적 진단방법으로는 보체결합반응 (complement-fixation test), 간접혈구 응집반응 (indirect hemagglutination test), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 등이 있다. 보체결합반응은 유행성 폐렴을 진단하는데 있어서 비교적 민감하고 특이적이기는 하지만 *M. flocculare*나 *M. hyorhinis*와 교차반응이 일어난다. 마이크로플라즈마에 노출된 후 1-5주까지는 항체가 검출되지만 13-15주 정도가 되면 보체결합반응으로 음성이 되므로, 만성으로 진행되는 경우에는 정확한 진단을 내리기가 어렵다. 간접혈구 응집반응은 특이적이고 민감한 진단방법이지만 수행하기가 어렵기 때문에 널리 사용되고 있지는 않다. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 로 추출한 항원을 이용한

ELISA와 Tween 20으로 추출한 항원을 이용한 ELISA를 이용하기도 하였다. 이 방법은 민감도가 매우 높고 비교적 특이적이기는 하지만 보체결합반응과 마찬가지로 *M. hyorhinis* 및 *M. flocculare*와의 교차반응이 일어난다.

*Pasteurella multocida*에 의해 유발되는 파스튜렐라성 폐렴과 위축성 비염 또한 호흡기질환에서 큰 비중을 차지하고 있는 병원체이다. 파스튜렐라균은 협막의 성질에 따라 A, B, C, D, E로 보고되어 지고 있으며 이중에서도 D형 파스튜렐라균은 145kD의 dermonecrotic toxin(toxA)를 생성하여 위축성 비염 및 화농성 폐렴을 일으키는 것으로 조사되고 있고, A형 파스튜렐라 균은 폐렴에서 주로 분리가 되고 있다.

세균 분리배양에서 bipolar stain pattern을 보이는 파스튜렐라 균을 병변 부위에서 분리하는 것이 가장 확실한 방법이나 시간이 오래걸리는 단점이 있다. 또한, 혈청학적 검사방법의 경우 교차반응의 우려가 있어, 특이성 높은 진단법의 개발이 요구되고 있다. 진단법으로서 최근에 주목을 받고 있는 중합효소 연쇄반응 및 조직내 교잡법을 활용한 특이적이고 신속한 진단법이 요구된다.

따라서, 2차 년도에는 돼지 호흡기계 질환 중에서 큰 비중을 차지하고 있는 돼지 유행성 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*과 파스튜렐라성 폐렴 및 위축성비염의 원인체인 toxigenic *Pasteurella multocida*에 대한 진단법을 개발하고자 하였다. 돼지를 부검하지 않고 가검물을 채취할 수 있는 호흡기 면봉에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 위축성 비염의 진단법을 개발하고, 호흡기 면봉을 이용한 독소형 파스튜렐라 균과 마이코플라즈마 균을 감별진단할 수 있는 다중 중합효소 연쇄반응을 개발하였다. 또한, 포르말린 고정되고 파라핀 고정되어 의뢰되는 가검물에 대한 진단을 위하여 조직내 교잡법을 이용한 진단법을 확립하고자 하였다. 또한, 분리된 파스튜렐라균은 협막형에 대한 조사와 항생제 감수성을 조사하여 임상에서 약제사용에 대한 기초자료로 활용코자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 비강 면봉에서 2단계 중합효소 연쇄반응을 이용한 위축성 비염의 진단법.

가. DNA 추출

서울대학교 수의과대학에 호흡기 증상으로 의뢰된 자돈 및 호흡기 증상을 보이는 자돈으로부터 채취된 호흡기 면봉을 공시재료로 사용하였다. 호흡기 면봉은 실험실에 의뢰/채취된 후 가능한 빨리 시료 처치를 하였다. 300 μ l의 멸균증류수에 호흡기 면봉을 부유하고, 100 $^{\circ}$ C 물에서 10분간 중탕가열 한 후 5000g 5분간 원심하여 그 상층액을 중합효소 연쇄반응에 사용하였다

나. 프라이머 제작

프라이머는 위축성비염을 일으키는 *Toxigenic Pasteurella multocida* type D와 *Bordetella bronchiseptica*가 가지고 있는 *toxA* gene (Genbank Access Code : X51512)을 대상으로 프라이머를 제작하였다. 전방향 프라이머 (TA-1: 2096-2113 nucleotides) 5'-CTT AGA TGA GCG ACA AGG-3' 과 역방향 프라이머 (TA-2: 2942-2950 nucleotides) 5'-GAA TGC CAC ACC TCT ATA G-3'를 제작하여 각각 중합효소 연쇄 반응에 사용하도록 하였다. 또한 중합효소 연쇄반응의 검출감도를 높이기 위하여 (TA-3: 2270-2289 nucleotides) 5'-TAA CAA AGG TTC TGG TGC CG-3'을 전방향 프라이머로 추가적으로 제작하였다

다. 중합효소 연쇄 반응

중합효소 연쇄반응을 위해서 5 μ l DNA 상층액, 1 μ l TA-1, TA-2 프라이머 (25pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5 μ g/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50 μ l의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서

30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초간 40 cycle 수행하고, 마지막으로 72°C 10분간 반응하였다. 이후 1차 중합효소 연쇄반응에서 얻어진 산물을 2 μ l를 채취하고, TA-2 와 TA-3 프라이머를 이용하여 동일한 조건으로 2차 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 1, 2차 중합효소 연쇄반응의 산물은 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel에 전기영동하여 각각 846bp, 690bp의 특이적인 산물을 확인하였다.

2. 병리조직학적 관찰과 조직내 교잡법을 이용한 마이코플라즈마성 폐렴의 진단법 개발.

가. 공시 동물

서울대학교 수의과대학 병리학 교실에 부검 의뢰된 돼지 중 유행성 폐렴의 임상 증상과 특징적인 부검 소견 및 병리 조직학적 소견을 보인 20두의 돼지의 폐조직을 실험 재료로 사용하였다. 폐조직은 10% 중성 포르말린에 24-48시간 고정시킨 후 자동 조직 처리기를 이용하여 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 3 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin & eosin 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 양성 대조군은 University of Nebraska-Lincoln의 Dr. Alan Doster로부터 *M. hyopneumoniae*를 실험 감염시킨 돼지의 폐조직의 파라핀 block을 공급 받았으며, 음성 대조군은 감염되지 않은 1일령 자돈의 폐조직을 이용하였다.

나. 공시 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Mycoplasma hyopneumoniae* J strain이며, American Type Culture Collection (ATCC 25934)으로부터 구입하여 Friis medium에 배양하였으며, 계대는 4주마다 실시하였다. DNA 추출을 위해 마이코플라즈마 배양액을 20,000g로 원심한 후 Rapid prep microgenomic DNA isolation kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 를 사용하여 다음의 과정을 거쳐 *M. hyopneumoniae*의 DNA를 추출하였다.

다. 탐침자 제작

중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머는 *M. hyopneumoniae*의 유전자에 특이적인 pMhP38 plasmid의 1.8 kb *PstI-EcoRI* fragment의 nucleotides 중 일부를 취하여 PCR을 수행한 논문에 사용된 primer를 인용하였으며, 전방향 및 역방향 프라이머는 각각 5'-GGT TAT CAA AAT TGC CAA TC-3' (nucleotides 851 to 870) 과 5'-TCC CAT AAC CTT GTG TTC AG-3' (nucleotides 1351 to 1370) 이다. 중합효소 연쇄반응을 위한 반응액 조성은 1 μ l 전방향 및 역방향 프라이머 (20pmol/ μ l), 10 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5 μ g/ml activated BSA), 500 μ M deoxynucleotides, 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 100 μ l의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA)를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 35 cycle을 수행하였다.

PCR product는 1% agarose gel에 전기영동하여 520 bp의 band를 확인한 후 Wizard PCR preps (Promega Biotech, Madison, WI, USA) 를 이용하여 증폭된 DNA를 정제하고, DIG DNA labeling & detection kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 를 사용하여 random labeling 한 후, nylon membrane으로 labeling된 probe의 농도를 결정하였다.

라. 조직내 교잡법

조직 절편을 xylene에 탈과라핀 시키고 함수과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4) 에 5분간 두었다. 표적핵산을 노출시키기 위해 0.2N HCl에 20분간 처리하여 단백질을 제거한 후 200 μ g/ml의 proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 를 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1M triethanolamine-HCl buffer (pH 8.0) 에 0.25% acetic anhydride를 넣고 5분간 acetylation 시킨 후 0.25% acetic anhydride를 한 번 더 넣고 5분간 더 acetylation 시켰다. 2 \times saline sodium citrate (SSC) (1 \times SSC; 50mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0) 로 10분간 세척 후

digoxigenin으로 표지된 DNA probe를 500ng/ml의 농도가 되도록 standard hybridization buffer(2×SSC, 50% deionized formamide, 10mg salmon sperm DNA (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Denhart's solution, 50% dextran sulfate solution)에 희석하여 30 μ l 정도를 slide 조직위에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮고 가장자리를 rubber cement로 잘 봉한 다음 96 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 45 $^{\circ}$ C에서 15시간 교잡반응 하였다. 교잡반응 후 coverslip을 제거하고 상온의 4×SSC에 5분간 2회, 45 $^{\circ}$ C 2×SSC와 상온의 2×SSC에서 각각 10분씩 2회, 그리고 0.2×SSC에서 5분간 2회 세척 후 maleic acid buffer (Buffer 1; 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5) 로 5분간 처리한 후 1×blocking buffer (Buffer 2) 에서 40분간 처리하였다. 양성반응을 검출하기 위해 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin (Boehringer Mannheim) 을 Buffer 2에 1:500으로 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 반응하였다. 반응이 끝난 후 Buffer 1에서 2회, Buffer 2에서 2회 처리 후 detection buffer (Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH 9.5)로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate를 Buffer 3에 희석하여 조직 절편위에 잘 떨어뜨린 후 상온에서 3-4시간 정도 반응시켰다. 발색이 끝난 후 tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 에 여러번 침적하여 반응을 중지시킨 후 0.5% methyl green으로 대조염색한 후 증류수에 세척하여 완전히 말린 후 mounting하여 현미경으로 관찰하였다.

3. 조직내 교잡법을 이용한 파스튜렐라성 폐렴의 진단법 개발.

가. 공시동물

서울대학교 수의과대학 병리학교실에 호흡기 증상으로 의뢰된 자돈중에서 파스튜렐라성 폐렴으로 진단된 343건 중에서 10두의 자돈을 공시동물로 사용하였다. 각각의 공시동물은 부검하여 균분리 배양을 실시하고, 조직은 중성포르말린에

24-48시간 고정하고 자동조직처리기를 이용하여 파라핀 포매하였다.

나. 탐침자 제작

Probe 제작을 위하여 *toxA* gene에 특이적인 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 전방향 프라이머로 5'- CTT AGA TGA GCG ACA AGG -3'과 역방향 프라이머로 5'- GAA TGC CAC ACC TCT ATA G-3'를 각각 사용하였다. 94°C에서 5분간 반응시킨후 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초씩 40회 반복하고, 72°C 10분간 반응하여 중합효소 연쇄반응을 수행한 후, ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel상에서 특이적인 846 bp의 DNA산물을 확인하였다.

DNA fragment의 정제과정과 digoxigenin의 표지과정은 실험 3. 병리조직학적 관찰과 조직내 교잡법을 이용한 마이코플라즈마성 폐렴의 진단법과 동일하게 수행하였다.

다. 조직내 교잡법

조직내 교잡법은 파스튜렐라 탐침자를 이용하여 실험 3. 병리조직학적 관찰과 조직내 교잡법을 이용한 마이코플라즈마성 폐렴의 진단법과 동일하게 수행하였다.

4. 파스튜렐라균의 협막형 성장분석 및 항생제 감수성 검사.

가. 파스튜렐라균 배양

5% bovine blood agar를 이용하여 분리 배양된 균에 대하여 그람염색, oxidase, catalase, 인돌 검사, 운동성 검사, MacConkey agar 배양, mannitol 발효 유무 등을 검사하였다. 파스튜렐라 균의 특징인 그람음성 간균, oxidase, catalase, 인돌 양성반응, mannitol 분해능, 비운동성, MacConkey agar에서 자라지 않는 것을 확인하여 파스튜렐라 균임을 확인하였다.

나. 협막형 검사

분리된 세균들은 Bovine hyaluronidase (3 U; Sigma), Flavobacterium heparium chondroitinase AC (0.2 U; Sigma), Flavobacterium heparium heparinase III (0.4 U; Sigma) 의 세가지 효소를 이용하여 협막형에 대한 검사를 병행하였다.

나. 항생제 감수성 검사

NCCLS에서 정한 항생제 감수성 검사법에 준하여 agar dilution MIC procedure로 검사를 수행하였다. 검사에 사용한 항생제는 Ampicillin, Danofloxacin, Trimethoprim/sulfa, Tiamulin, Tylosin, Tetracycline, Penicillin, Spectinomycin, Lincomycin, Gentamicin, Ceftiofur를 사용하였다.

제 3 절 결과 와 고찰

1. 비강 면봉에서 2단계 중합효소 연쇄반응을 이용한 위축성 비염의 진단법.

중합효소 연쇄반응을 이용한 위축성 비염 진단법의 특이도를 확인하기 위하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus 2, porcine respiratory coronavirus를 검사하였으나, 교차반응은 관찰할 수 없었다.

민감도 측정은 독소형 파스튜렐라균에서 추출한 DNA를 10배 단계희석 하여 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다. 1단계 중합효소 연쇄반응에서 10^{-5} 단계까지 검출할 수 있었으며, 2단계 반응에서는 10^{-8} 단계까지 검출할 수 있었다. 이는 약 20 organisms까지 검출할 수 있어 민감도가 매우 높은 것을 확인할 수 있었다. (Figure 1)

위축성 비염이 의심되는 호흡기 면봉 중에서 세균분리를 시도하였던 23개 호흡기 면봉 중에서 10개의 파스튜렐라 균이 분리되었으며, 중합효소 연쇄반응에서는 21개가 양성반응을 나타내었다. (Table 1)

No. of samples	PCR		Isolation of toxigenic P. multocida
	Conventional	Nested	
7	+	+	+
8	+	+	-
3	-	+	+
2	-	+	-
3	-	-	-

Table 1. Detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal swabs using bacterial isolation, conventional and nested polymerase chain reaction.

균분리가 시도되지 못한 70개의 호흡기 면봉에서는 총 22개가 양성반응을 나타내었고 그 결과는 다음과 같다. (Table 2)

No. of nasal swabs	PCR	
	Conventional	Nested
6	-	+
16	+	+
48	-	-

Table 2. Comparison of conventional and nested polymerase chain reaction for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs.

본 실험에서 개발된 2단계 중합효소 연쇄반응은 돼지를 부검하지 않고 호흡기 면봉만을 이용하여 신속 정확하게 위축성 비염균을 검출하므로써 야외에서 문제시되고 있는 위축성 비염의 진단 및 청정화 대책 수립에 유용한 진단법으로 이용될 것으로 사료된다.

2. 병리조직학적 관찰과 조직내 교잡법을 이용한 마이코플라스마성 폐렴의 진단법 개발.

*M. hyopneumoniae*에 특이적인 DNA probe를 제작하여 조직내 교잡법을 수행한 결과 실험감염된 돼지의 폐조직에서 정도의 차이는 있으나 *M. hyopneumoniae*의 유전자를 검출할수 있었다. 양성 반응은 전형적인 암갈색으로 염색되었으며 배경은 염색되지 않았다.

뚜렷한 양성 반응은 기관지 및 세기관지 상피세포(Figure 2)와 내강, 폐포 대식구 및 간질성 대식구 그리고 폐포세포에서 확인할 수 있었다. 양성 반응은 기관지와 세기관지의 겨우 상피세포의 표면에서만 확인할 수 있었으며, 세포질 내에서는 관찰할 수 없었다 (Table 3).

양성 반응을 보인 기관지 및 세기관지 주위에는 대부분 다수의 림프구의 침윤을 관찰할 수 있었지만 이들 림프구에서는 양성 반응을 관찰할 수 없었다. 가끔 세기관지 내강에 침윤되어 있는 호중구와 대식구에서도 양성 반응을 관찰할 수 있었다. 폐포강에 침윤한 세포에서도 *M. hyopneumoniae*의 특이적인 유전자를 검출할 수 있었다. 이들 세포의 형태는 주로 큰 타원형의 핵과 풍만한 세포질을 가지고 있었으며, 같은 조직을 hematoxylin & eosin 염색하여 대조해본 결과 대부분의 양성 반응이 일어난 세포들은 주로 간질성 대식구과 폐포 대식구임을 알 수 있었다. 그리고 5두의 폐조직에서는 폐포강에 인접한 폐포세포에서 주로 양성반응을 확인 할 수 있었다.

Number of Pigs	DPI	Tissues				
		Bronchus	Bronchiole	Alveolar Macrophage	Interstitial Macrophage	Type I Pneumocyte
3	7	3	3	0	0	0
3	14	3	3	2	0	1
3	21	3	3	3	3	3
3	28	2	3	2	2	2
3	35	0	0	3	2	1

Table 3. In situ hybridization for lung tissues experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*.

3. 조직내 교잡법을 이용한 파스튜렐라성 폐렴의 진단법 개발.

Toxigenic *Pasteurella multocida*에 감염된 파스튜렐라균에 감염된 자돈의 폐장조직은 화농을 형성하는 특징을 가지고 있었다. 화농부위의 중심은 괴사된 세포와 염증삼출물로 구성되어 있었으며, 화농의 변연부에는 다수의 호중구가 침윤하고 있었다. 특이적

인 DNA probe를 제작하여 조직내 교잡법을 수행한 결과 자연 감염된 10두의 돼지 폐 조직에서 정도의 차이는 있으나 파스튜렐라균의 특이적인 유전자를 검출할 수 있었다. 양성반응은 전형적인 암갈색으로 염색되었으며 배경은 염색되지 않았다. 뚜렷한 양성반응은 주로 화농 부위에 침윤되어 있는 호중구에서 관찰되었다. 또한, 음성대조군인 정상 폐장에는 양성반응이 관찰되지 않았다. (Figure 3)

4. 파스튜렐라균의 협막형 정상분석 및 항생제 감수성 검사.

서울대학교 병리학교실에 의뢰된 가검물에서부터 230개의 파스튜렐라균을 현재까지 분리하였다. 230개의 균을 분석한 결과 capsular A type이 200개, D type이 9개로 분류되었으며, 230개의 균 중 30개가 *toxA* 유전자를 보유하고 있으며, 200개의 균은 *toxA* 유전자를 보유하고 있지 않았다 (Table 4).

toxA gene	Capsular serotypes		
	A	D	Untypable
positive	26 (11%)	2 (1%)	2 (1%)
Negative	174 (75.7%)	7 (3%)	19 (8.3%)
Total	200 (87%)	9 (4%)	21 (9.3%)

Table 4. Prevalence of relationship of capsular serotypes and *toxA* genotypes of 230 *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia.

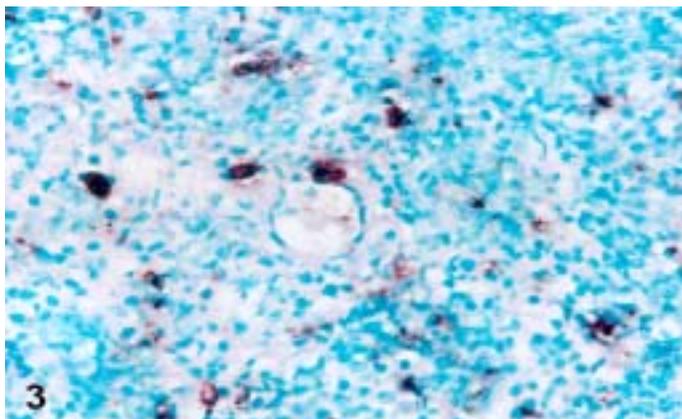
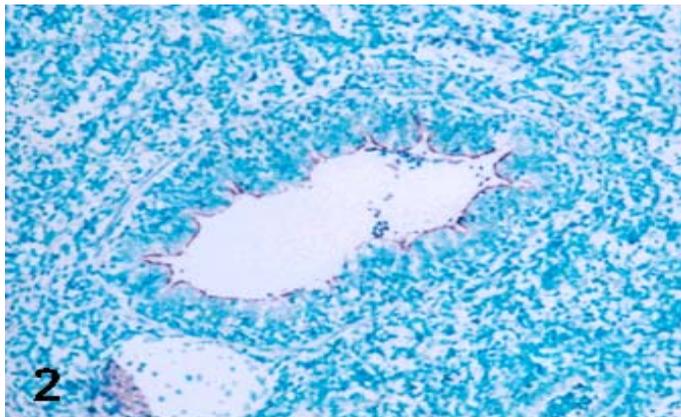
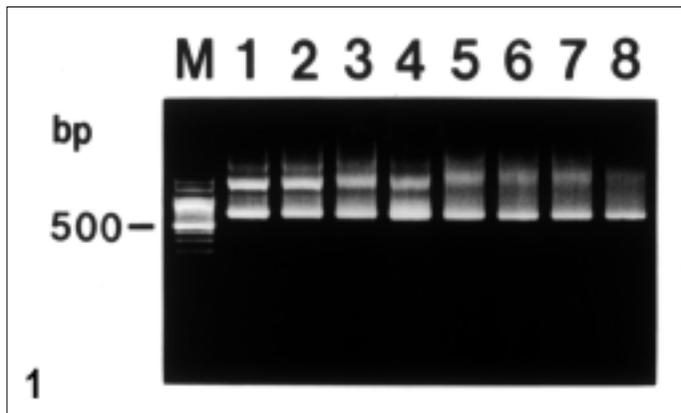
230개의 세균 중 134개를 선별해서 11개 항생제에 대한 감수성 검사를 실시한 결과 ceftiofur, danofloxacin, gentamicin 및 penicillin에 효과가 있는 것으로 판명되었다. (Table 5)

Antimicrobial agents	Range ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) breakpoint*			MIC ₅₀ [†] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ₉₀ [†] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
		S	I	R		
Ampicillin	0.25-8	0.25-2	4-16	≥ 32	0.5	4
Danofloxacin	0.5-256	≤ 2	-	≥ 8	0.125	2
Trimethoprim/sulfa	0.5-256	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$	256	256
Tiamulin	4-64	≤ 8	-	≥ 16	16	32
Tylosin	0.5-256	0.31-5	10	≥ 20	16	32
Tetracycline	0.5-256	≤ 4	8	≥ 16	32	64
Penicillin	0.25-64	≤ 2	-	≥ 4	0.5	1
Spectinomycin	8-128	0.75-12	24	≥ 48	32	64
Lincomycin	8-128	≤ 0.5	1-2	≥ 4	32	64
Gentamicin	0.5-32	≤ 4	8	≥ 16	4	4
Ceftiofur	0.06-8	≤ 2	4	≥ 8	0.06	1

Table 5. Antimicrobial susceptibility determinations (MIC₅₀ and MIC₉₀) of 134 *Pasteurella multocida* isolates from growing and finishing pigs with pneumonia.

* S = susceptible, I = Intermediate, R = resistant

[†] MIC₅₀ and MIC₉₀ refer to a cumulative percentage of susceptibility i.e. the concentration at which 50% and 90% of the isolates were found susceptible.



Legends of figure

Figure 1. Nested PCR Sensitivity. Ten-fold dilution of the extract toxigenic *Pasteurella multocida* DNA (0.1ug/ul) from 10^{-1} to 10^{-8} . Product was detected up to the 10^{-8} .

Figure 2. In situ Hybridization on lung tissue infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Positive signal (dark brown) was detected in the border of the bronchial epithelium.

Figure 3. In situ Hybridization for *toxA* gene on the lung tissue infected with *Pasteurella multocida* type D.

5. 돼지 호흡기성 질병의 발생분포

3차년도에 1,203건의 호흡기질병을 의뢰받아 마이코플라즈마성폐렴(371건), 파스튜렐라성폐렴(241건), 홍막폐렴(111건)을 진단하였다. 마이코플라즈마성폐렴의 경우 10월에서 12월중에 집중적으로 발병하였고, 파스튜렐라성폐렴의 경우도 10월과 12월사이에서 집중적으로 발병하였다. 반면 홍막폐렴의 경우 11월과 12월 사이에서 집중적으로 발병하였다. 본 연구 결과 국내에서 가장 문제가 되는 호흡기 질병은 마이코플라즈마성 폐렴, 파스튜렐라성폐렴, 홍막폐렴 순으로 확인되었으며, 대부분 10월과 12사이에 호흡기 질병이 집중하고 있음을 알 수가 있다. (Table 6)

(기간:2001.11-2002.10)

월	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
마이코플라즈마성폐렴	108	27	38	3	11	8	1	2	6	55	27	85
파스튜렐라성폐렴	34	23	28	10	18	17	6	9	11	31	18	36
홍막폐렴	19	23	13	9	9	5	7	3	2	6	8	7

Table 6. Prevalence of pneumonia in pig from 2001, 11 to 2002. 10

제 4 장 돼지 소모성 질병 진단법 개발

제 1 절 서 설

3차 년도에는 최근 양돈 산업에 있어 주목을 받고 있는 소모성 질환인 이유자돈 전신성 소모성 증후군과 대일 돈육 수출의 무역장벽으로 주목받는 돼지 콜레라에 대한 신속하고 정확한 진단법을 개발하고자 하였다.

1980년대 초에 돼지 신장세포주(Porcine kidney cell line: PK-15)에 지속 감염된 것으로 확인된 돼지 썩코바이러스 1형은 많은 연구자의 연구결과 비병원성 바이러스로서 주목을 받지 못 하였다. 그러나, 최근에 캐나다 연구팀의 조사결과 돼지 썩코바이러스 1형과 염기서열 및 항원성이 상이한 바이러스를 보고하고, 돼지 썩코바이러스 2형으로 언급하였다. 이후 세계 각국에서 이유자돈의 발육부진, 황달, 빈혈, 간질성 폐렴, 임파절의 종대등을 특징으로 하는 이유자돈 전신성 소모성 증후군에서 돼지 썩코바이러스 2형이 병원체로서 보고되었다.

이 밖에도 서혜부, 복부, 귀의 말단부에 심한 피부염과 간질성 신염을 특징으로 하는 돼지 피부염 신부전 증후군(Porcine dermatitis and nephropathy syndrome: PDNS)와 폐 기관지의 증식성 괴사성 병변을 보이는 증식성 괴사성 폐렴(Proliferative Necrotizing Pneumonia), 유산(Abortion), 삼출성 표피염(Exudative dermatitis)등과도 밀접한 상관성이 있는 것으로 보고되고 있어 돼지 썩코바이러스 2형의 진단 및 병인론 연구는 국내 양돈 산업에 있어서도 절실하게 요구되고 있다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군(Postweaning multisystemic wasting syndrome: PMWS)은 돼지 썩코바이러스 2형(Porcine circovirus type 2: PCV-2)에 의해 유발되는 것으로 보고되어 있으며, 돼지 파보바이러스 (Porcine Parvovirus: PPV)와의 혼합 감염이 질병 경과를 악화시키는 것으로 알려지고 있다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 진단은 다음의 3가지 범주를 만족하여야 하는데, 첫째 임상증상으로 이유 이후의 자돈에서 위축이 뚜렷하게 관찰되어야 하며, 둘째 병리조직학적 소견상 육아종성 염증 또는

특이적인 바이러스 봉입체를 관찰할 수 있어야 하며, 셋째 조직상에서 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 핵산 또는 항원을 검출할 수 있어야 한다. 그러나, 아직 세계적으로 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 연구가 초기단계에 있어 조직내에서 돼지 썬코바이러스의 핵산 및 항원을 검출하는 기법이 몇몇 연구 실험실에만 국한되어 국내 실정에 적합한 조직내 교잡법을 개발하고자 하였다.

돼지 콜레라를 일으키는 돼지 콜레라 바이러스(Classical Swine Fever Virus: CSFV)는 *Family Flaviviridae*, *Genus pestivirus*에 속하는 바이러스로 12.3 Kb 크기의 positive strand RNAvirus이다. 이와 유사한 바이러스로는 소에서 문제시 되고 있는 소 바이러스성 하리 바이러스(Bovine Viral Diarrhea Virus: BVDV)와 면양에서 문제시 되는 보더병 바이러스(Border Disease Virus: BDV)가 있다. 이들 바이러스가 속하는 *Flaviviridae*의 특징은 숙주 특이성이 적다는 것이다. 따라서, 소의 바이러스성 하리 바이러스가 또는 면양의 보더병 바이러스가 돼지에 감염을 일으킬 수도 있으며, 그 반대의 경우도 가능하다. 이러한 교차감염이 흔하지는 않지만, 무역 장벽으로 이용될 수 있는 돼지 콜레라의 경우 신속 정확한 진단의 필요성이 높다.

또한, 돼지 콜레라의 경우 크게 급성형과 만성형, 태반을 통한 불현성 감염으로 그 감염 형태를 나누어 볼 수 있다. 4주 미만의 진행을 보이는 급성형 돼지 콜레라의 경우 고열을 동반한 급사가 특징이며, 부검소견시 편도의 괴사, 신장의 출혈, 임파절의 종대 및 출혈, 전신 실질 장기의 출혈을 특징으로 하여 진단에 용이하다. 그러나, 4주 이상의 만성감염을 일으키는 만성형의 경우에는 그 임상증상이 경미하며, 부검소견에서도 돼지 콜레라의 특징적인 병변을 확인하기 어려워 정확한 진단에 어려움이 있다. 또한, 콜레라 박멸을 위한 전국적인 백신접종 사업이후에는 급성형 콜레라보다 만성형 콜레라의 발병과 분리가 많아지는 선진국의 사례에 비추어 보았을 때에도, 현재 콜레라 박멸 사업을 진행중인 국내 양돈 산업에서도 만성형 콜레라의 진단 및 박멸의 중요성이 높아질 것으로 사료된다. 이와 더불어 태반을 통해 감염된 자돈의 경우 감염시기에 따라 유·사산을 일으키기도 하지만, 정상적으로 분만된 자돈의 경우 체내의 바이러스를 면역체계가 감지하지 못 하는 면역내성 상태로써 만성적으로 돈군내에 바이러스를 전파하게 되는 Carrier로서 작용할 수 있어 중요하다.

돼지 콜레라의 감염형 뿐만 아니라 전파 경로 또한 매우 다양하다. 직접 접촉에 의한 감염, 태반을 통한 감염, 인공수정에 의한 감염, 공기전파에 의한 감염, 모기등 곤충에 의한 감염, 야생 멧돼지등 야생동물에 의한 감염등 그 전파 양상이 매우 다양하다. 영국, 독일, 스위스등을 포함한 유럽권에서도 드물게 발병보고가 있으며, 독일의 경우 야생 멧돼지의 감염이 전파하는 것으로 보고되고 있어 이에 대한 박멸 대책으로 미끼 백신(vaccine bait)이 시도되고 있다. 국내 양돈장내에서 이루어지는 감염 양상은 직접접촉에 의한 것이 주를 이루고 있지만, 야생동물의 감염 양상 조사 및 다른 전파경로에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 정액, 혈액, 고정조직을 포함하는 다양한 가검물에서 중합효소 연쇄반응, 면역조직화학법, 조직내 교잡법, 조직검사법을 이용한 돼지 콜레라를 신속 정확하게 진단하는 진단법을 개발하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 이유자돈 전신성 소모성 질환의 병리조직학적 검사법과 혼합 감염된 병원체.

가. 병리조직학적 검사

1999년 1월부터 2000년 12월까지 1243개 농장에서 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰되었던 이유자돈, 육성돈, 비육돈 1634두를 공시 동물로 사용하였다. 1634두 중 423두는 경기, 317두는 충청, 322두는 경상, 358두는 전라도에서 의뢰되었다. 위축을 주 증상으로 의뢰된 돼지로부터 채취된 조직 샘플은 실험실에 의뢰/채취된 후 가능한 빨리 시료 처치를 하여 균 분리동정을 수행하였다. 조직검사를 위하여 채취된 샘플은 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였으며, 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하고, hematoxylin and eosin (H&E) stain으로 염색하였다.

나. 바이러스 검사

돼지 썬코바이러스 1형과 2형 (Porcine circovirus type 1 and type 2; PCV1 & PCV2), 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV), 돼지 호흡기 코로나 바이러스 (Porcine respiratory coronavirus; PRCV), 돼지 인플루엔자 바이러스 (Swine Influenza virus; SIV), 돼지 오제스키 바이러스 (Porcine pseudorabies virus; PRV), 돼지 콜레라 바이러스 (Classical swine fever virus; CSFV)에 대한 조직 검사를 면역조직화학법, 조직내 교잡법, 면역 형광 항체법을 이용하여 바이러스의 혼합 감염여부를 확인하였다.

다. 세균분리 및 동정

의뢰된 자돈으로부터 얻어진 폐장조직 샘플로부터 호흡기 질환 세균인 파스튜렐라균 (*Pasteurella multocida*), 흉막폐렴균 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), *Hemophilus parasuis* 분리를 시도하였다. 파스튜렐라균, 흉막폐렴균의 분리동정을 위하여 5% sheep blood agar를 사용하여 호기배양 하였으며, *Hemophilus parasuis*는 chocolate

agar를 이용하여 혐기배양 하였다.

대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라(*Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*) 등 소화기 질환 세균의 분리를 위하여 5% 혈액배지와 Tergitol-7 agar를 사용하였다.

2. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 감별 진단법.

가. 돼지 썬코바이러스 2형의 DNA 추출

이유자돈 전신성 소모성 증후군증상으로 서울대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 50-70일령의 자돈 53두를 공시동물로 사용하였다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군이 의심되는 돼지의 서혜임파절 또는 비장을 채취하고, Qiagen[®]으로부터 구입한 Tissue DNA extraction kit를 이용하여 25 mg 조직으로부터 DNA를 추출하였다.

나. 프라이머 합성

다중 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위하여 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 특이적인 프라이머를 디자인 하였다. 돼지 썬코바이러스 프라이머는 Porcine circovirus type 2 (Genbank access code : AF465211)의 open reading frame 2 (ORF2) 부위에서 프라이머를 제작하였다. 돼지 썬코바이러스의 전방향 프라이머(AF)는 5'-CAG TTC GTC ACC CTT TCC C-3' (939-957 nucleotides), 역방향 프라이머(AR)는 5'-GGG GGA CCA ACA AAA TCT CT-3' (1466-1485 nucleotides)가 되도록 제작하였다.

돼지 파보바이러스 프라이머는 viral protein 2 (VP2)를 특이적으로 증폭할 수 있도록 디자인 하였다. 돼지 파보바이러스에 대한 전방향 프라이머(BF)는 5'-CAT ACA CTG GAC AAT CAC AAC AAA-3' (3451-3474: nucleotides), 역방향 프라이머(BR)는 5'-GCC TAA TG CTG TTG CTT CTG-3' (3760-3780: nucleotides)가 되도록 제작하였다.

다. 중합효소 연쇄반응

중합효소 연쇄반응을 위해서 $5\mu\text{l}$ DNA 상층액, $1\mu\text{l}$ AF, AR, BF, BR 프라이머 ($25\text{pmol}/\mu\text{l}$), $5\mu\text{l}$ $10\times$ reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl_2 , $5\mu\text{g}/\text{ml}$ activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, $50\mu\text{l}$ 의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94°C 에서 30초, 60°C 에서 30초, 72°C 에서 60초간 35 cycle 수행하고, 마지막으로 72°C 10분간 반응하였다. 중합효소 연쇄반응의 산물 $10\mu\text{l}$ 를 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에 전기영동하였다.

3. 파라핀 조직으로부터 돼지 썬코바이러스 2형 검출을 위한 2단계 중합효소 연쇄반응 진단법 최적화.

가. 공시 재료

병리조직학적 소견 및 중합효소 연쇄반응, 면역조직화학법, 조직내 교잡법등을 이용하여 이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 37두로부터 얻어진 포르말린 고정되고 파라핀 포매된 조직의 임파장기를 검사에 사용하였다.

나. DNA 추출방법

파라핀 조직으로부터 $10\mu\text{m}$ 절편을 채취하여 eppendorf tube에 담아 조직을 준비하였으며, 각 샘플 채취시 조직 절편칼날과 기구등을 적절히 소독하였다. DNA 추출에 최적화된 조건을 찾기 위하여 다음과 같이 세가지 방법의 조합으로 탈파라핀 과정과 DNA추출과정을 수행하였다. 각각의 탈 파라핀 용액으로 10분간 처리하고 알코올로 세척을 수행한 후 $500\mu\text{l}$ 의 소화 용액으로 56°C overnight 처리하였다. 이후 100°C 8분간 가열하여 proteinase K를 불활화 시키고, phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 이용하여 DNA를 추출, 알코올로 침전하였다. (Table 1)

추출 방법	추출법 A	추출법 B	추출법 C
탈 파라핀 용매	Toluene	Xylene	Xylene
소화 용액 (Digestion buffer)	200 μ g/ml proteinase K 10mM Tris 1mM EDTA 0.5% Tween 20	200 μ g/ml proteinase K 10mM Tris 1mM EDTA	200 μ g/ml proteinase K 10mM Tris 1mM EDTA 0.5% SDS

Table 1. Solvents and Digestion buffer to extract DNA from paraffin-embedded tissue.

다. 1차 및 2차 중합효소 연쇄반응 프라이머 제작

1차 중합효소 연쇄반응에 사용할 프라이머로서 Ellis 등이 돼지 쉼코바이러스 2형의 open reading frame 2 (ORF2)부위에서 디자인한 특이 프라이머를 사용하였다. 전방향 프라이머(PCV2 F1)는 5'-CGG ATA TTG TAG TCC TGG TCG-3' (1095-1115 nucleotides)와 역방향 프라이머(PCV2 R1)는 5'-ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A-3' (1570-1549 nucleotides)로 제작되었다. 또한, 검출 감도를 증가시키기 위하여 2차 중합효소 연쇄반응에 이용할 프라이머를 추가적으로 제작하였다. 2차 반응의 전방향 프라이머(PCV2 F2)는 5'-GAT TGT ATG GCG GGA GGA GT-3' (1286-1305 nucleotides), 역방향 프라이머(PCV2 R2)는 5'-ATT GAC GAC TTT GTT CCC CC-3' (1510-1491 nucleotides)로 1차 반응부위의 내부에 위치하도록 디자인하고 제작하였다.

다. 민감도 및 특이도 검사

파라핀 조직으로부터 추출된 DNA에 대하여 10배 단계 희석을 거쳐 검출한도에 대한 민감도 검사를 수행하였으며, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지

파보바이러스, 돼지 썬코바이러스 1형의 핵산과 교차반응 여부를 확인함으로써 특이도 검사를 수행하였다.

라. 중합효소 연쇄반응

중합효소 연쇄반응을 위해서 10 μ l DNA 상층액, 1 μ l PCV2 F1, PCV2 R1 프라이머 (25pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5 μ g/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50 μ l의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 65 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72 $^{\circ}$ C 10분간 반응하였다. 이후 1차 중합효소 연쇄반응에서 얻어진 산물을 10 μ l를 채취하고, PCV2 F2 와 PCV2 R2 프라이머를 이용하여 동일한 조건으로 2차 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 각 단계별 중합효소 연쇄반응의 산물 10 μ l를 ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel에 전기영동하였다.

4. 이중 조직내 교잡법을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 대한 동시 진단법.

가. 공시 동물

이유자돈 전신성 소모성 증후군에 자연 감염된 20두의 자돈과 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스를 실험감염시킨 8두의 자돈을 공시 동물로 사용하였다. 실험감염을 위하여 12두의 자돈을 구입하였으며, 4두는 음성대조군으로써 돼지 썬코바이러스에 오염되지 않은 세포배양액을 접종하였으며, 8두의 실험군에는 돼지 썬코바이러스 2형의 바이러스 배양액 1ml과 돼지 파보바이러스 배양액 1ml을 비강을 통하여 접종하였다. 28일과 35일에 각각 4두씩 부검을 실시하고, 부검즉시 조직을 10% 중성포르말린에 24시간 고정하고 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매하였다.

나. 탐침자(Probe) 제작

돼지 썬코바이러스 2형의 open reading frame 2 (ORF2)에서 얻어진 481bp 크기의 DNA 분절을 탐침자 제작에 이용하였다. 전방향과 역방향 프라이머로서 5'-CGG ATA TTG TAG TCC TGG TCG-3' (1095-1115 nucleotides)와 5'-ACT GTC AAG GCT ACC ACA GTC A-3' (1570-1549 nucleotides)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 DNA를 정제하여 Biotin으로 임의 표지하여 돼지 썬코바이러스 탐침자를 제작하였다.

돼지 파보바이러스의 VP2 부위에서 증폭된 226bp 크기의 DNA 분절을 탐침자 제작에 이용하였다. 전방향과 역방향 프라이머로서 5'-CCA GCA GCT AAC ACA AGA AAA GGT TAT CAC-3' (3708-3737 nucleotides)와 5'-GTC CAT GTT GGT AAT CCA TTG TAA ATC T-3' (3906-3933 nucleotides)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 DNA는 정제과정을 거쳐 Digoxigenin으로 임의 표지하고 돼지 파보바이러스에 대한 탐침자로 이용하였다.

다. 이중 조직내 교잡법

임과절 및 비장 조직을 10% 중성 포르말린에 24-48시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4 μ m 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)에 부착시켜 상온에 보관하였다. 조직 절편을 xylene에 탈파라핀 시키고 합수과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4)에 5분간 두었다. Target nucleic acids를 노출시키기 위해 0.2N HCl에 20분간 처리하여 단백질을 제거한 후 200 μ g/ml의 proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1M triethanolamine-HCl buffer (pH 8.0)에 0.25% acetic anhydride를 넣고 5분간 acetylation 시킨 후 0.25% acetic anhydride를 한 번 더 넣고 5분간 더 acetylation 시켰다. 2 \times saline sodium citrate (SSC) (1 \times SSC; 50mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)로 10분간 세척 후 digoxigenin으로 표지된 돼지 파보바이러스 탐침자와 biotin으로 표지된 돼지 썬코바이러스 탐침자를 각각 1ng/ μ l의 농도가 되도록 standard hybridization buffer(2 \times SSC, 50% deionized formamide, 10mg

salmon sperm DNA (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Denhart's solution, 50% dextran sulfate solution)에 희석하여 30 μ l 정도를 slide 조직위에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮고 가장자리를 rubber cement로 잘 봉한 다음 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 45 $^{\circ}$ C에서 15시간 교잡반응 하였다.

돼지 파코바이러스를 검출하기 위해 교잡반응 후 coverslip을 제거하고 상온의 4 \times SSC에 5분간 2회, 45 $^{\circ}$ C 2 \times SSC와 상온의 2 \times SSC에서 각각 10분씩 2회, 그리고 0.2 \times SSC에서 5분간 2회 세척 후 maleic acid buffer (Buffer 1; 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5) 로 5분간 처리한 후 1 \times blocking buffer (Buffer 2) 에서 40분간 처리하였다. 양성반응을 검출하기 위해 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin (Boehringer Mannheim) 을 Buffer 2에 1:500으로 희석하여 조직 절편 위에 잘 떨어뜨린 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Buffer 1에서 2회, Buffer 2에서 2회 처리 후 detection buffer (Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH 9.5) 로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate를 Buffer 3에 희석하여 조직 절편위에 잘 떨어뜨린 후 상온에서 3-4시간 정도 반응시켰다. 발색이 끝난 후 tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 에 여러번 침적하여 반응을 중지하였다.

돼지 썬코바이러스의 검출을 위하여 조직상에 peroxidase-conjugated streptavidin (Boehringer Mannheim)을 1x blocking buffer에 1:300으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응하였다. 반응 후 Buffer 1과 Buffer 2에서 10분씩 1회 처리 후 detection buffer (Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH 9.5) 로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 peroxidase의 기질인 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) (Sigma Chemical Co.)을 조직상에 적용하여 적색으로 발색하였다. 발색 후 3차 증류수에 수회 세척하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색 하였다. 대조염색 후 Crystal/Mount (Biomedica)를 이용하여 wet mounting하였다.

5. 2단계 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발.

가. 공시 동물

돼지 콜레라 바이러스에 감염된 수퇘지의 혈액과 정액을 채취하였다. 혈액 샘플은 채취 후 원심하여 혈장과 혈구를 분리하고, Ficoll을 이용하여 buffy coat를 분리하여 각각에서 RNA분리와 바이러스 분리를 시도 하였다. 정액 또한 각종 버퍼를 처치하여 seminal fluid, non-sperm cell, spermatic head로 분획하고 각각에서 RNA 추출과 바이러스 분리를 시도하였다.

나. RNA 추출법

유체의 상층액 500 μ l를 채취하여 Trizol LS (Gibco BRL) 500 μ l와 혼합하여 10분간 정제하였다. 이후 300 μ l의 chlorform를 추가하여 vortex하고, 10분간 정제하였다. 두 개의 층으로 분리가 되기 시작하면 4000g 15분간 원심하였다. 분리된 상층액 500 μ l를 채취하여 isopropanol과 동량 혼합하여 -20 $^{\circ}$ C 2시간 이상 침전시킨다. 14000g 30분간 원심을 실시하고 상층액을 버리고, 70% Ethanol 500 μ l 으로 세척하고 14000g 30분간 원심을 실시하였다. 원심이 끝난 후 에탄올을 버리고 말려서 30 μ l DEPC D.W.에 부유하였다.

다. 프라이머 제작

1단계 중합효소 연쇄반응에 사용할 프라이머로서 돼지 콜레라 바이러스(Classical swine fever virus Alfort strain)의 5' 부위에서 특이 프라이머를 디자인하였다. 전방향 프라이머(HCV F1)는 5'-AGA CGG CCT GTA CCA TAA TA-3' (1062-1081 nucleotides)와 역방향 프라이머(HCV R1)는 5'-GTA TAA GAT GTC CTC CAC GG-3' (1671-1652 nucleotides)로 제작되었다. 또한, 검출 감도를 증가시키기 위하여 2단계 중합효소 연쇄반응에 이용할 프라이머를 추가적으로 제작하였다. 2단계 반응의 전방향 프라이머(HCV F2)는 5'-GAC AAC GGC ACT AAT GGT AT-3' (1201-1220 nucleotides)를 제작하고, 역방향 프라이머는 HCV R1을 이용하였다.

다. 민감도 및 특이도 검사

표준 바이러스의 Tissue culture infectious dose (TCID₅₀)를 측정하고, 각 농도별로 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA에 대하여 10배 단계 희석을 거쳐 검출한도에 대한 민감도 검사를 수행하였으며, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus), 돼지 파보바이러스 (Porcine parvovirus), 돼지 썬코바이러스 1형 및 2형 (Porcine circovirus type 1 & type 2)의 핵산과 교차반응 여부를 확인하였다.

라. 역전사 중합효소 연쇄반응

조직 유제로부터 추출된 RNA 1 μ l, DEPC D.W. 3.5 μ l, 2.5mM dNTP 2 μ l, 10X PCR buffer (1.25mM MgCl₂) 2 μ l, random hexamer 0.5 μ l, RNase inhibitor(50U) 0.5 μ l, MuLV reverse transcriptase(200U) 0.5 μ l (Perkin Elmer)를 혼합하여 총반응량을 10 μ l로 맞춘 후에 42°C에서 40분간 반응하여 역전사 반응을 수행하여 cDNA를 합성하였다.

역전사 반응을 마친 10 μ l의 cDNA template에 중합효소 연쇄반응을 위해서 1 μ l HCV F1, HCV R1 프라이머 (25pmol/ μ l), 5 μ l 10 \times reaction buffer (100mM Tris-HCl (pH 8.3), 400mM KCl, 15mM MgCl₂, 5 μ g/ml activated BSA), 0.2mM deoxynucleotides(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5U Taq polymerase를 각각 넣고, 50 μ l의 reaction volume이 되도록 멸균된 증류수를 첨가하여 섞은 후 Thermocycler (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 를 이용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분간 35 cycle 수행하고, 마지막 단계에서 72°C 10분간 반응하였다. 이후 1단계 중합효소 연쇄반응에서 얻어진 산물을 5 μ l를 채취하고, HCV F2 와 HCV R2 프라이머를 이용하여 동일한 조건으로 2단계 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 각 단계별 중합효소 연쇄반응의 산물 10 μ l를 ethidium bromide로 염색된 1% agarose gel에 전기영동 하였다.

6. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발.

가. 공시 동물

서울대학교 수의과대학 병리학교실에서 병리조직검사, 바이러스 분리, 형광 항체법, 면역조직 화학법등을 이용하여 돼지 콜레라로 진단된 12두의 자돈을 공시 동물로 사용하였다. 실험에 사용된 자돈은 돼지 콜레라 바이러스에 만성 감염되어 폐사율이 높지 않았다. 채취된 자돈의 입과 장기를 포르말린 고정하고 파라핀 포매하여 Superfrost/Plus slide에 4 μ m 두께의 조직절편을 준비하여 조직내 교잡법에 사용하였다. 또한, 탐침자 제작을 위한 표준 바이러스는 돼지 콜레라 백신 바이러스로 사용되는 Classical swine fever virus Lome strain을 사용하였다.

나. 탐침자(Probe) 제작

돼지 콜레라 바이러스의 5' region에서 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 얻어진 471bp크기의 DNA 분절을 탐침자 제작에 이용하였다. 전방향과 역방향 프라이머로서 5'-GAC AAC GGC ACT AAT GGT AT-3' (1201-1220 nucleotides), 5'-AAA GTT TTT CCC TTT CTT GC-3' (1605-1586 nucleotides)를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 DNA를 정제하여 Digoxigenin으로 임의 표지하여 돼지 콜레라 바이러스 탐침자를 제작하였다.

다. 조직내 교잡법

병변 부위의 입과장기 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정시킨 후 일반적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀 포매 후 4 μ m 두께로 절편하여 Superfrost/plus slide (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 에 부착시켜 상온에 보관하였다. 조직 절편을 xylene에 탈파라핀 시키고 흡수과정을 거친 후 phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M, pH 7.4) 에 5분간 두었다. Target nucleic acids를 노출시키기 위해 0.2N HCl에 20분간 처리하여 단백질을 제거한 후 200 μ g/ml의 proteinase K (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 를 37 $^{\circ}$ C에서 25분간 처리한 후 4% paraformaldehyde로 상온에서

10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 0.1M triethanolamine-HCl buffer (pH 8.0)에 0.25% acetic anhydride를 넣고 5분간 acetylation 시킨 후 0.25% acetic anhydride를 한 번 더 넣고 5분간 더 acetylation 시켰다. 2×saline sodium citrate (SSC) (1×SSC; 50mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)로 10분간 세척 후 digoxigenin으로 표지된 돼지 콜레라 바이러스 탐침자를 각각 1ng/μl의 농도가 되도록 standard hybridization buffer(2×SSC, 50% deionized formamide, 10mg salmon sperm DNA (Oncor, Gaithersburg, MD, USA), 0.02% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Denhart's solution, 50% dextran sulfate solution)에 희석하여 30μl 정도를 slide 조직 위에 떨어뜨린 후 coverslip을 덮고 가장자리를 rubber cement로 잘 봉한 다음 94°C에서 10분간 가열하여 45°C에서 8시간 교잡반응 하였다. 교잡반응 후 coverslip을 제거하고 상온의 4×SSC에 5분간 2회, 45°C 2×SSC와 상온의 2×SSC에서 각각 10분씩 2회, 그리고 0.2×SSC에서 5분간 2회 세척 후 maleic acid buffer (Buffer 1; 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7.5)로 5분간 처리한 후 1×blocking buffer (Buffer 2)에서 40분간 처리하였다. 양성반응을 검출하기 위해 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin (Boehringer Mannheim)을 Buffer 2에 1:500으로 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Buffer 1과 Buffer 2에서 10분씩 1회 처리 후 detection buffer (Buffer 3; 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 0.05M MgCl₂, pH 9.5)로 5분간 처리하였다. 발색을 위하여 alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate를 Buffer 3에 희석하여 조직절편 위에 잘 떨어뜨린 후 상온에서 3-4시간 정도 반응시켰다. 발색이 끝난 후 tris-ethylenediamine tetraacetic acid buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 여러번 침적하여 반응을 중지하였다. 0.5% methyl green으로 대조염색한 후 증류수에 세척하여 완전히 말린 후 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다.

제 3 절 결과 와 고찰

1. 이유자돈 전신성 소모성 질환의 병리조직학적 검사법과 혼합 감염된 병원체.

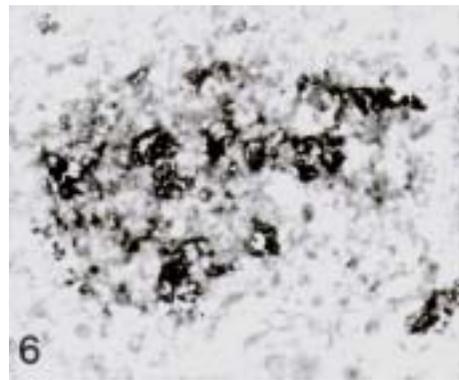
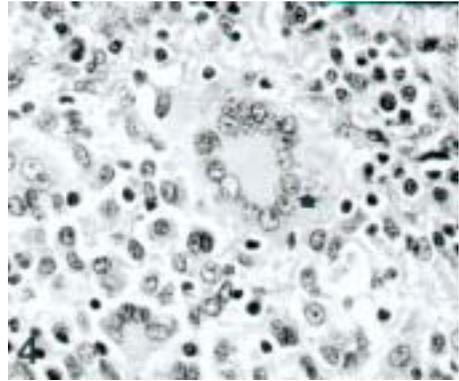
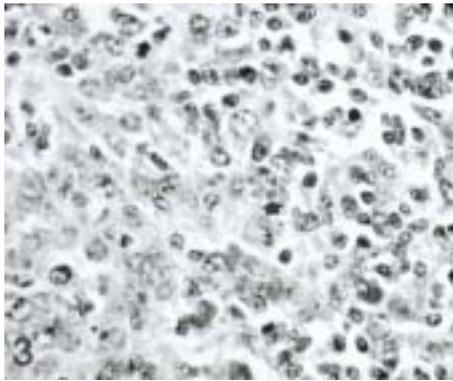
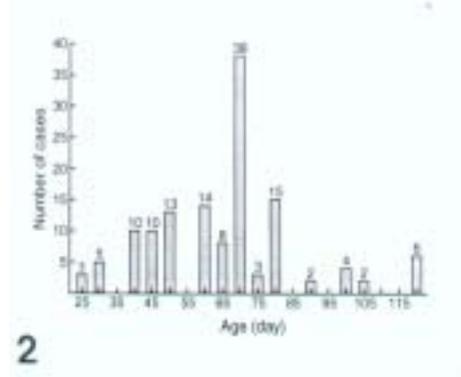
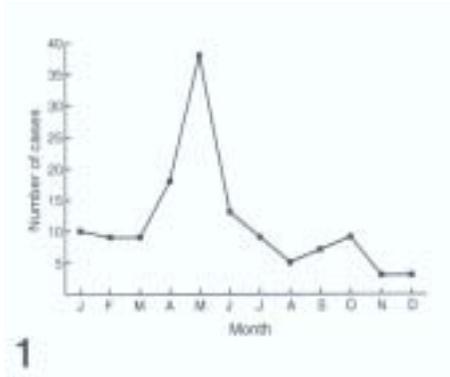
이유자돈 전신성 소모성 증후군 (Postweaning multisystemic wasting syndrome : PMWS)를 일으키는 돼지 썬코바이러스 2형에 감염된 조직의 검사결과 임파장에서 거대다핵세포 (Multinucleated giant cell)를 형성하거나 포도송이 모양의 봉입체를 형성하는 질병 특이적인 육아종성 염증을 확인할 수 있었다. 또한, 본 실험실에 의뢰된 자돈 1634두에 대한 검사한 결과 133 (8.1%)두에서 이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 확인되는 병변을 확인할 수 있었다.

이에 대한 월별 분포는 그림 1과 같이 년중 고르게 발생하고 있었으며, 4월에서 6월 사이에 그 발생이 집중하는 것으로 조사되었다. 일령별 발생분포는 그림 2와 같이 이유 이후 25-120일 사이의 일령에서 확인할 수 있었으며, 60-80일령 사이의 자돈이 그 발병 빈도가 높았다. (Figure 1,2) 이유자돈 전신성 소모성 증후군 진단에 핵심이 되는 임파장의 육아종성 염증이 관찰되었으며, 거대다핵세포, 세포질내 또는 핵내 봉입체가 관찰되었고, 전형적인 병변을 보이는 조직에 대하여 면역조직화학법 또는 조직내 교잡법을 실시하여 확진하였다. (Figure 3,4,5,6)

이유자돈 전신성 소모성 증후군에 이환된 돼지에서 바이러스 검사 및 세균 검사를 병행하여 혼합 감염된 병원체를 검사하였다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 이환된 자돈 대부분이 세균 또는 바이러스에 복합 감염되어 있었으며 그 비율은 85%에 달하였다. 주된 혼합감염 병원체는 *Haemophilus parasuis*, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Swine influenzavirus의 순으로 높았다. (Table 2)

	Viral pathogens						Bacterial pathogens			
	PCV2	PCV1	PRRSV	PPV	SIV	PRV	CSFV	APP	PM	HPS
No. of	133	21	39	34	20	0	0	38	33	43
cases (%)	100	15.8	29.3	25.6	15.0	0	0	28.6	24.8	32.3

Table 2. Prevalence of porcine circovirus-2 and other infectious pathogens in 133 pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome from 1634 pigs examined between January 1999 and December 2000.



Legends of figure

Figure 1. Cases of postweaning multisystemic wasting syndrome diagnosed by month from January 1999 to December 2000 (n=133).

Figure 2. Cases of postweaning multisystemic wasting syndrome diagnosed by age from January 1999 to December 2000 (n=133).

Figure 3. Lymph node, pigs with multisystemic wasting syndrome. Multiple, grape-like intracytoplasmic inclusion bodies (arrow) were often seen in the cytoplasm of histiocytic cells. HE. $\times 400$.

Figure 4. Lymph node, pigs with multisystemic wasting syndrome. Multiple, grape-like intracytoplasmic inclusion bodies (arrow) were often seen in the cytoplasm of multinucleated giant cells. HE. $\times 400$.

Figure 5. Liver, pigs with multisystemic wasting syndrome. Several multinucleated giant cells were seen. HE. $\times 200$.

Figure 6. Lymph node, pigs with multisystemic wasting syndrome. Positive hybridization signals for porcine circovirus-2 nucleic acid occurred in the germinal center. In situ hybridization, methyl green counter stain. $\times 400$.

2. 다중 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스 감별 진단법.

돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 대한 양성 대조군으로는 서울대학교 수의과대학 병리학교실에서 분리한 SNUVR000463과 SNUVR000464를 사용하였다. 또한 음성 대조군으로는 돼지 썬코바이러스와 돼지 파보바이러스에 오염되지 않은 돼지 신장세포주(Circovirus free-porcine kidney (PK) 15 cells)를 캐나다 Saskachwan 대학으로부터 분양 받아 사용하였다.

돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 대한 다중 중합효소 연쇄반응 결과 각각 547bp와 330bp의 크기를 보이는 특이적인 산물을 확인하였다. (Figure 7) 돼지 썬코바이러스 1형, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지 유행성 설사병 바이러스, 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 호흡기 코로나바이러스의 핵산과는 교차반응이 없음을 확인하였다. 53개 임상가검물에 대하여 다중 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 12두에서 돼지 썬코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스가 동시 검출되었으며, 이 중에서 6개의 바이러스가 분리되었다. 나머지 41개 가검물에서는 돼지 썬코바이러스 2형만 검출되었으며, 이 중에서 36개의 바이러스가 분리되었다. (Table 3)

	Virus isolation	In situ hybridization	Multiplex PCR
PCV-2 and PPV	6	12	12
PCV-2 only	36	41	41
PPV only	0	0	0

Table 3. Results from 53 pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome of virus isolation, in situ hybridization, and multiplex PCR of porcine circovirus type 2 (PCV-2) and porcine parvovirus (PPV)

3. 파라핀 조직으로부터 돼지 썬코바이러스 2형 검출을 위한 2단계 중합효소 연쇄반응 진단법 최적화.

이유자돈 전신성 소모성 증후군으로 진단된 자돈의 파라핀 조직 37개에 대하여 3가지 추출법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 이용하여 돼지 썬코바이러스 2형에 대한 2단계 중합효소 연쇄반응을 수행하여 바이러스를 검출하고자 하였다. 중합효소 연쇄반응 결과 xylene을 이용하여 탈파라핀화 시키고, proteinase K, Tris, EDTA 등으로 소화용액을 조제한 추출법 B는 조직내 교잡법과 동일하게 37(100%)개로 가장 좋은 결과를 나타내었다. Tween 또는 SDS등이 포함된 추출법 A와 C는 그 검출율이 각각 91.9%, 18.9%를 나타내었다. (Table 4)

	DNA extraction methods (%)		
	추출법 A	추출법 B	추출법 C
1차 PCR	17 (45.9)	26 (70.3)	4 (10.8)
2차 PCR	34 (91.9)	37 (100)	7 (18.9)

Table 4. Comparison of PCR between extraction methods from paraffin tissues.

파라핀으로부터 추출한 DNA를 10배 단계 희석하여 민감도 검사를 수행하였다. 민감도 검사결과 1차 PCR에서는 10^{-3} 까지 검출할 수 있었으며, 2차 PCR결과에서는 100배 민감한 10^{-5} 까지 검출할 수 있었다. (Figure 8,9)



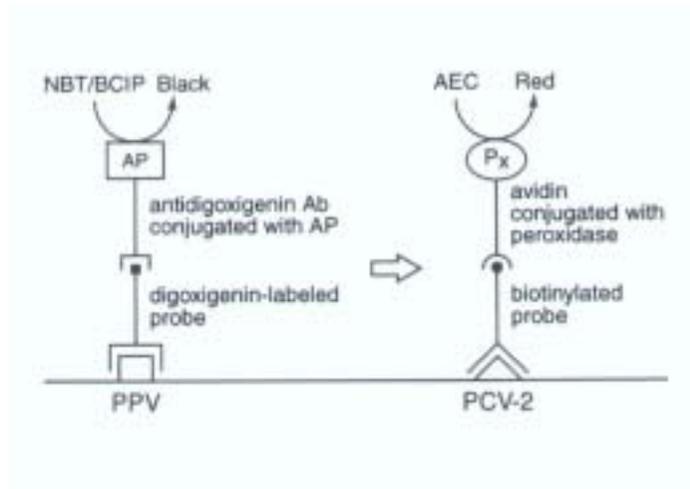
Legends of figure

Figure 7. Detection of porcine circovirus type 2 (PCV-2) and porcine parvovirus (PPV) using multiplex PCR. Lane M; 100bp DNA ladder, Lane 1; Negative control, Lane 2; PCV-2 standard strain, Lane 3; PPV standard strain, Lane 4; PCV-2 and PPV standard strain, Lane 5; PCV-2 positive sample, Lane 6; PPV positive sample, Lane 7; PCV-2 and PPV positive sample

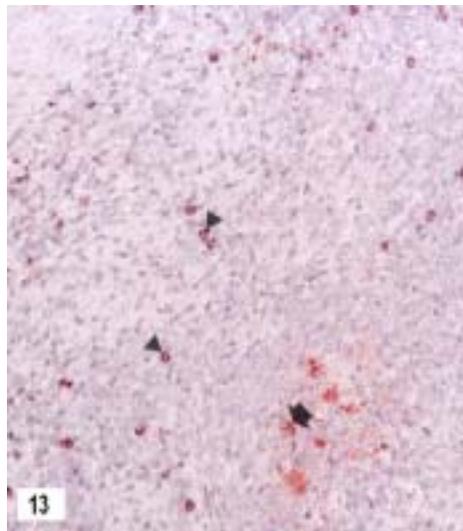
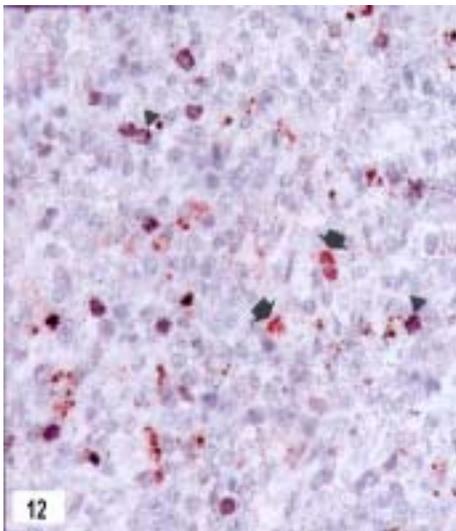
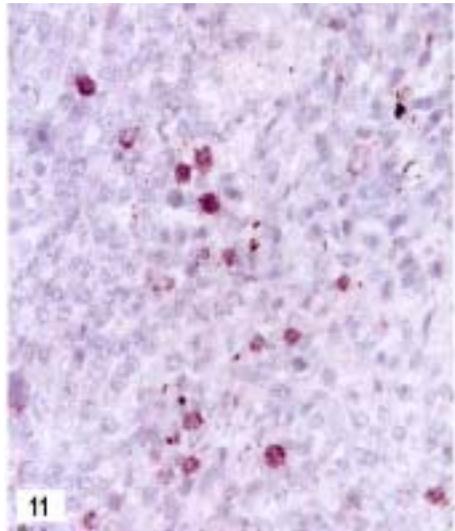
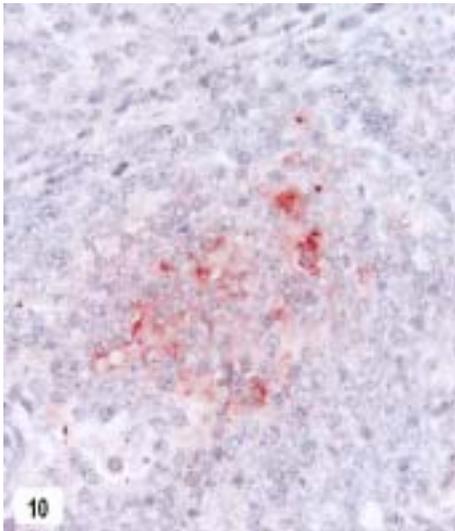
Figure 8. Conventional and nested PCR sensitivity. Tenfold dilutions of the extracted PCV2 DNA from 10^{-1} to 10^{-4} were used. Lane M = 1-kb DNA ladder; lane 1 = conventional PCR for 10^{-1} dilution; lane 2 = conventional PCR for 10^{-2} dilution; lane 3 = conventional PCR for 10^{-3} dilution; lane 4 = conventional PCR for 10^{-4} dilution; lane 5 = nested PCR for 10^{-1} dilution; lane 6 = nested PCR for 10^{-2} dilution; lane 7 = nested PCR for 10^{-3} dilution; lane 8 = nested PCR for 10^{-4} dilution.

Figure 9. Comparison of three DNA extracted methods by conventional PCR and nested PCR. Lane M = 1-kb DNA ladder; lane 1 = positive conventional PCR; lane 2 = positive nested PCR; lane 3 = conventional PCR using method A; lane 4 = nested PCR using method A; lane 5 = conventional PCR using method B; lane 6 = nested PCR using method B; lane 7 = conventional PCR using method C; lane 8 = nested PCR using method C.

4. 이중 조직내 교잡법을 이용한 돼지 쉼코바이러스 2형과 돼지 파보바이러스에 대한 동시 진단법.



이중 조직내 교잡법은 위의 모식도와 같이 돼지 파보바이러스의 핵산을 NBT/BCIP로 검출한 후 돼지 쉼코바이러스 2형을 AEC를 이용하여 검출하였다. 이중 조직내 교잡법 결과 임파절과 비장에서 조직학적 구조간에 강도의 차이는 있으나 돼지 쉼코바이러스와 돼지 파보바이러스에 대한 양성반응을 모두 관찰할 수 있었다. 돼지 쉼코바이러스 2형은 주로 germinal center 부위에서 강한 양성 반응을 적색으로 관찰할 수 있었다. 양성반응은 세포질이 풍부하며 하나 또는 두 개의 큰 핵을 가지는 구형 또는 다각형의 형태를 가지는 세포에서 관찰되었으며, 형태적으로 대식구계 세포로 추정된다. 돼지 파보바이러스에 대한 양성반응도 주로 대식구계 세포에서 관찰되었으며, 임파절에서는 산발적으로 분포되어 있었으며, 적수(red pulp)에서 주로 관찰되었다. 또한 자연 감염된 20두의 자돈에서도 동일한 양상을 확인할 수 있었다.



Legends of figure

Figure 10. Lymph node; pigs experimentally infected with both PCV2 and PPV at 28 dpi. Positive hybridization signal for PCV2 in the germinal center. Single in situ hybridization; x400.

Figure 11. Lymph node; pigs experimentally infected with both PCV2 and PPV at 28 dpi, Positive hybridization signal for PPV in macrophages. Single in situ hybridization; x400.

Figure 12. Lymph node; pigs experimentally infected with both PCV2 and PPV at 35 dpi, Positive hybridization signal for PCV2 (arrows) and for PPV (arrowheads) in macrophages. Double in situ hybridization; x400.

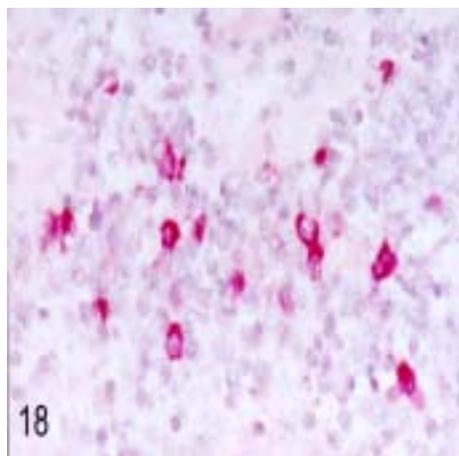
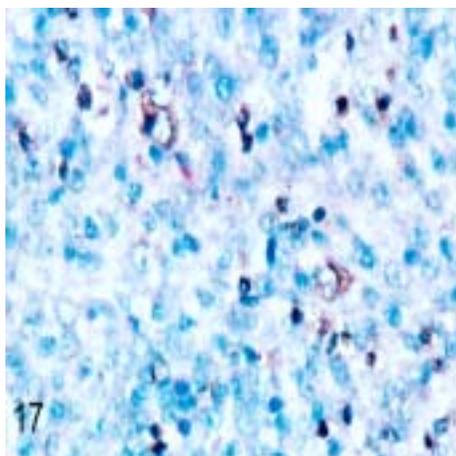
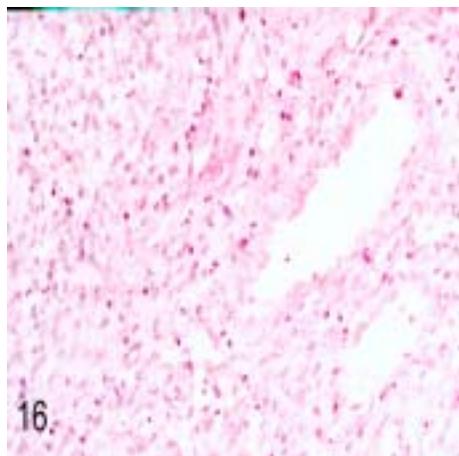
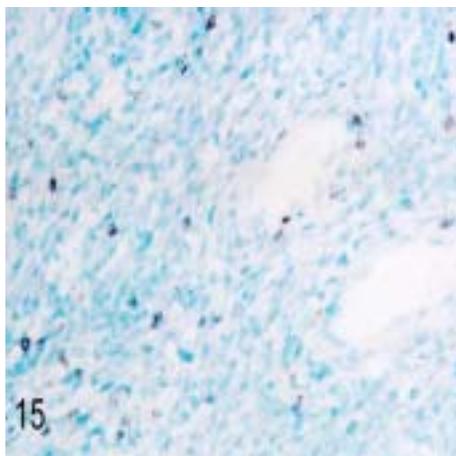
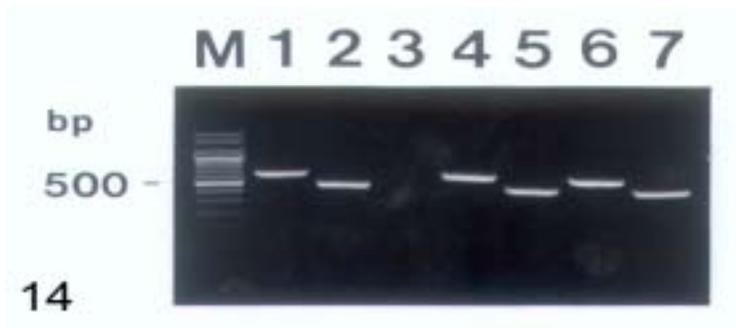
Figure 13. Spleen; pigs experimentally infected with both PCV2 and PPV at 35 dpi, Positive hybridization signal for PCV2 (arrow) in the white pulp and for PPV (arrowheads) in the red pulp. Double in situ hybridization; x200.

5. 2단계 중합효소 연쇄반응을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발.

제작된 프라이머를 이용한 2단계 중합효소 연쇄반응에 대한 반응 조건을 조사한 결과 annealing 55℃와 denaturation 94℃로 35 cycle을 수행하는 것이 가장 적합하였으며, 혈액의 혈장과 정액의 경우 PBS로 20배 희석한 샘플에서 RNA를 분리하는 것이 가장 유용한 것으로 확인되었다. 본 연구에서 개발된 2단계 중합효소 연쇄 반응은 그 민감도가 기존의 중합효소 연쇄반응보다 100배 높게 검출할 수 있었다. (Figure 14) 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지 파보바이러스, 돼지 썬코바이러스 1형 및 2형을 이용한 교차반응 검사에서는 어떠한 양성반응도 검출되지 않아 그 특이도 또한 높은 것으로 확인하였다. 채취된 혈액으로부터의 항체가 검사결과와 비교한 결과에서도 항체 검출 이전 2-7일 이전에 검출할 수 있었다.

6. 조직내 교잡법을 이용한 돼지 콜레라 바이러스 진단법 개발.

돼지 콜레라에 만성 감염된 12두의 자돈 조직에서 교잡내 교잡법을 수행하였다. 12두의 자돈 모두에서 양성반응의 분포와 강도는 차이가 있으나 임파절 및 비장, 편도, Peyer's patch등에서 암갈색의 양성반응을 확인할 수 있었다. 양성반응을 보이는 세포는 세포질이 풍부하고 핵이 큰 대식구계 세포에서 관찰되었으며, 세포질이 적고 핵이 진하게 관찰되는 임파구계 세포에서도 양성 반응을 다수 관찰할 수 있었다. 만성 감염된 12두 자돈 조직에서 수행한 면역 조직화학법에서는 장기에 따라 차이가 있으나 4-5두에서만 양성반응이 검출되었다. 이는 만성감염된 돼지콜레라의 진단에 있어서 조직내 교잡법이 매우 유용함을 확인할 수 있었다. 조직내 교잡법과 면역 조직화학법이 수행된 장기 중에서 뇌조직에서는 병변은 확인할 수 있으나 항원이나 핵산을 검출할 수 없었고, 임파절, 편도, Peyer's patch, 비장등 임파장기에서만 일관되게 양성반응을 검출할 수 있었다. 따라서, 돼지 콜레라의 진단에 있어서 임파장기의 검사가 필수적이라 하겠다. (Figure 15, 16, 17, 18)



Legends of figure

Figure 14. Agarose gel electrophoresis of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and seminested RT-PCR products of classical swine fever virus detected in serum and semen samples collected from experimentally infected boars. lane 1, RT-PCR from positive control; lane 2, seminested RT-PCR from positive control, lane 3, seminested RT-PCR from negative control, lane 4, RT-PCR from serum at 11 days postinoculation (dpi); lane 5, seminested RT-PCR from serum at 11 dpi; lane 6, RT-PCR from semen at 7 dpi; lane 7, seminested RT-PCR from semen at 7 dpi.

Figure 15. Lymph node; Classical swine fever virus RNA (dark brown reaction) is detected in the lymphocytes. In situ hybridization.

Figure 16. Lymph node; Classical swine fever virus antigen (red reaction) is not detected in the lymphocytes of lymph node. Immunohistochemistry.

Figure 17. Lymph node; Classical swine fever virus RNA (dark brown reaction) is detected in the cytoplasm of mononuclear cells and lymphocytes. In situ hybridization.

Figure 18. Spleen; Classical swine fever virus antigen (red reaction) is detected in the cytoplasm of mononuclear cells. Immunohistochemistry.

제 5 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

*Family Coronaviridae*에 속하는 돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스를 감별진단 할 수 있는 다중 역전사 중합효소 반응을 개발하였다. 돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스의 membrane(M) gene과 nucleotide(N) gene에서 각각 특이적인 412 base pair, 612 base pair크기로 증폭되었으며 상호간의 교차반응은 관찰되지 않았다. 그 민감도 또한 10 TCID₅₀로서 매우 적은 양의 바이러스도 검출할 수 있었으며, RNase inhibitor들이 다량 포함되어 있는 분변 또는 장조직 샘플에서도 두 바이러스를 교차반응 없이 검출할 수 있었다. 바이러스성 설사가 의심되어 의뢰된 포유자돈 및 분변샘플 1258건 중에서 총 634건이 돼지 유행성 설사병 바이러스로 진단되었으며, 11건이 돼지 전염성 위장염 바이러스로 진단되었다. 그 질병 발생 분포는 일년 년중 발병하고 있었으며, 주로 11월 중순에서 3월 사이에 폭발적으로 발생하는 것으로 조사되었다. 이 연구를 통하여 밝혀진 돼지 바이러스성 설사병은 년중 발생하는 epizootic type과 계절적 발병 양상을 보이는 epidemic type이 있는 것으로 조사되었고, 포유자돈의 바이러스성 설사에서 그 빈도가 높은 것을 확인할 수 있었으며, 돼지 전염성 위장염 바이러스는 빈도가 매우 낮아 계절 백신에 대한 대책을 제고할 가치가 있다 하겠다. 또한, 돼지 유행성 설사병 바이러스와 돼지 전염성 위장염 바이러스에 대한 조직내 교잡법을 개발하여 진단법으로 확립하였다. 조직내 교잡법 수행결과 실험감염된 자돈의 소장에서 감염후 12-24시간부터 바이러스의 존재를 확인할 수 있었다. 두 바이러스는 공장과 회장부위의 장상피 표면에서 관찰되었으며, 전염성 위장염 바이러스의 경우 드물게 음와(crypt) 부위에서 관찰되었다. 조직내 교잡법 결과를 바이러스 분리, 형광항체법, 전자현미경을 이용한 검사법과 비교한 결과 그 민감도와 특이도가 높아 진단법으로 매우 유용할 것으로 평가되었다.

생후 7-21일령 사이의 자돈에서 다발하는 돼지 콕시듐 설사병을 진단하기 위한 병리 조직 검사법과 조직내 교잡법을 확립하였다. 이는 여름철 다발하는 콕시듐 설사병 진단에 매우 유용하게 사용되었다. 자돈의 콕시듐 설사병의 원인체인 *Isospora suis*에 대한 탐침자를 18S ribosomal DNA에서 제작하여 조직내 교잡법을 수행하였으며, 장상피세

포 내강에 위치하고 있는 tachyzoite와 garmont에서도 동일하게 특이적인 양성 반응을 확인할 수 있었다. 이와 유사한 원충성 질병, 톡소플라즈마(Toxoplasmosis), 사르코시스티스(Sarcosystis), 네오스포라(Neosporosis)와도 감별하는데 유용할 것으로 평가 되었다.

육성·비육기 소화기 질환에서 큰 비중을 차지하는 증식성 회장염과 살모넬라증을 병리조직학적 검사, 중합효소 연쇄반응, 조직내 교잡법, 면역조직화학법을 이용한 진단법을 확립하였다. 육성·비육기의 소화기 질환은 양돈 산업의 생산성에 많은 영향을 미치므로 신속한 진단과 정확한 치료가 중요하다. 본 연구에서 개발된 진단법을 임상가검물에 적용하여 본 결과 222건의 육성·비육 설사에서 증식성 회장염과 살모넬라증을 각각 110건, 44건을 검출할 수 있었으며, 나머지는 결장염을 포함한 다른 질병으로 진단되었다. 본 연구에서 개발된 진단법은 민감도가 높을 뿐 아니라 실험절차를 단순화하여 진단법을 상용화하는데도 유용할 것으로 판단되었다.

만성적인 호흡기 질환을 유발하는 위축성 비염, 파스튜렐라성 폐렴과 마이코플라즈마성 폐렴 진단을 위하여 다중 중합효소 연쇄반응을 개발하여 비강면봉을 이용하여 신속한 진단을 할 수 있게 되었다. 조직내 교잡법을 이용하여 포르말린 고정되고 파라핀 포매된 조직에서도 마이코플라즈마성 폐렴과 파스튜렐라성 폐렴에 대한 진단법을 확립하였다. 본 연구에서 개발된 호흡기 질환의 진단법은 매우 신속 정확하며 부검을 실시하지 않고서 비강면봉만으로도 진단할 수 있는 검사법으로 그 유용성이 크다고 하겠다. 돼지 호흡기 질환에 있어 상당한 비중을 차지하고 있는 돼지 파스튜렐라 균(*Pasteurella multocida*)을 임상 가검물로부터 분리하였으며, 230개의 분리주에 대하여 협막 혈청형과 toxA 유전자의 보유여부를 조사하였다. 230개의 균주 중에서 30개의 균주가 toxA 유전자를 가지고 있었으며, 87%의 균주가 협막 혈청형 A군에, 4%는 D군에 속하는 것으로 조사되었다. 호흡기 질환에 사용되는 11종의 대표적인 항생제에 대하여 항생제 감수성 검사를 수행하였으며, ceftiofur, danofloxacin, gentamicin 및 penicillin에 대하여 효과가 있는 것으로 나타났다. 항생제 감수성 결과는 질병 진단과 병행하여 질병 대책 수립에 있어서도 유용하게 사용될 것이다.

이유자돈 전신성 소모성 증후군의 원인체인 돼지 쉼코바이러스 2형과 이와 상관성이

있는 것으로 알려진 돼지 파코바이러스에 대한 중합효소 연쇄반응법, 조직내 교잡법, 면역 조직 화학법이 개발되었다. 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 진단하는 범주에 있어서 임상증상과 조직소견이 있어야 하며, 최종적으로 바이러스의 핵산과 항원을 검출하는 것이 필수적이므로 본 연구에서 개발된 진단법은 이유자돈 전신성 소모성 증후군을 포함한 돼지 썬코바이러스 2형과 상관된 질병 진단에 필수적이라 하겠다.

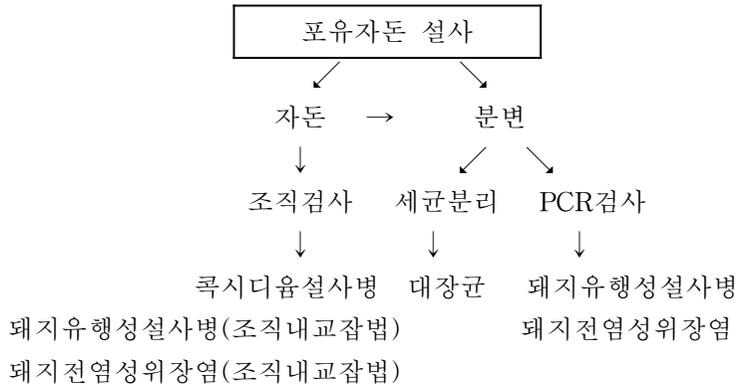
또한, 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 경우 단독 감염보다 혼합감염의 예가 많아 복합감염 예를 조사하였으며, 그 주된 병원체로서는 *Haemophilus parasuis*, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Swine influenza virus의 순으로 빈도가 높게 조사되었다. 이는 이유자돈 전신성 소모성 증후군의 진단 및 치료에 있어서 바이러스의 감염 방제와 더불어 혼합 감염의 차단이 질병 치료에 매우 중요할 것으로 사료된다. 또한, 돼지 썬코바이러스 2형과 상관성이 높은 것으로 알려지고 있는 새로운 증후군인 돼지 피부염 신부전 증후군(Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome: PDNS), 유산(Abortion), 삼출성 표피염(Exudative Dermatitis), 증식성 괴사성 폐렴(Proliferative and Necrotizing Pneumonia: PNP)에 대한 상관성 연구가 추가적으로 수행된다면, 이유자돈 전신성 소모성 증후군에 대한 방역 대책 수립에 유용할 것으로 사료된다.

본 연구에서 개발된 2단계 중합효소 연쇄반응, 조직내 교잡법, 면역 조직 화학법을 이용한 돼지 콜레라 진단법은 그 민감도가 높고, 검사에 소요되는 시간을 단축할 수 있어 검사의 신속성과 정확성을 기할 수 있게 되었다. 뿐만 아니라, 본 연구 수행을 통하여 돼지 정액의 정장액(Seminal fluid)와 비정자세포(Nonsperm cell)에서 돼지 콜레라가 분비되는 것으로 확인되었으며, 암·수 생식기 모두에서 감염이 이루어지는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 연구에서 얻어진 결과를 토대로 국내 종돈장의 인공수정센터와 수입되는 정액에서 돼지 콜레라에 대한 검사를 지속적으로 수행한다면, 돼지 콜레라 검역에 아주 유용할 것으로 사료된다. 또한, 만성 돼지 콜레라의 경우 정확한 기전 연구는 안 되어 있지만, 면역 조직 화학법에 의한 검출율이 저하되는 것으로 본 연구에서 확인되었다. 따라서, 만성형 돼지 콜레라의 경우 조직내 교잡법을 통한 확진이 필요하다 하겠다.

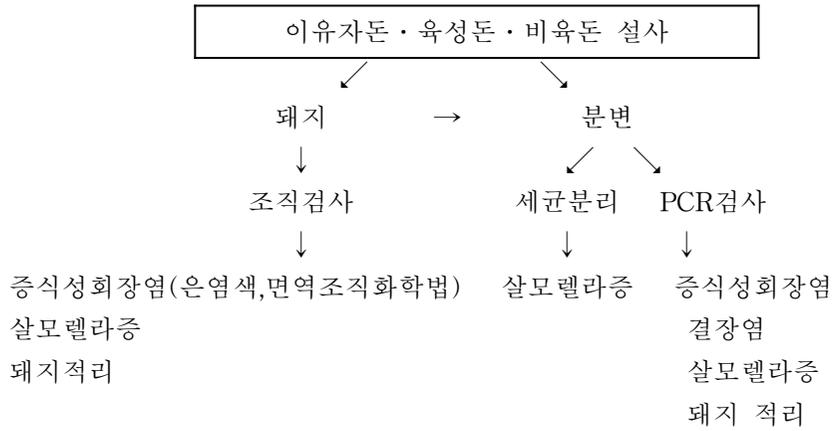
국내에서 돼지 콜레라에 대한 박멸 사업 이후 돼지 콜레라의 발생 예가 급속히 감소하여 청정화 선언을 하기에 이르렀으나, 박멸사업에 성공한 선진국들의 예에 비추어 보았을 때 정확한 진단법을 바탕으로 한 질병 발생의 감시가 중요하다. 이밖에 양돈 질병의 경우도 마찬가지라 하겠다. 따라서, 종돈장을 비롯하여 양돈장에 대한 검역, 질병의 감시에 본 진단법을 적용함으로써 신속한 진단과 처방으로 질병 청정화에 기여할 수 있다고 생각된다. 이는 본 연구에서 수행된 임상가검물에 대한 진단 시스템 운영을 통해 검증되었으며, 각계 축산관계 기관으로의 보급이 용이할 것으로 사료된다.

최종적으로 3년간 본 연구를 통하여 국내 질병 발생 양상을 근거로 국내체계에 적합한 체계도를 작성하였다.

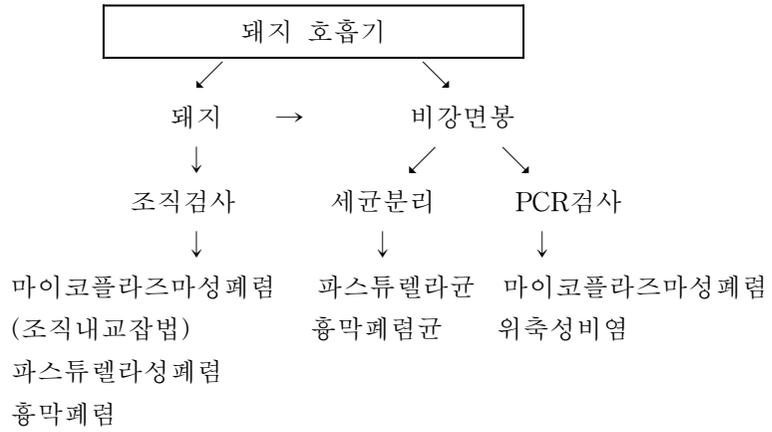
설사병 진단 체계도 I



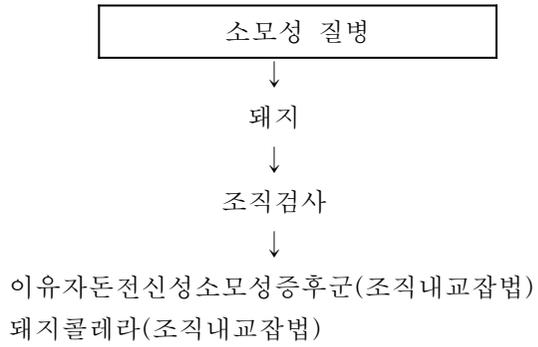
설사병 진단 체계도 II



호흡기 진단 체계도Ⅲ



만성 소모성 질병 진단 체계도Ⅳ



제 6 장 인용문헌

제 1 절 돼지 소화기 질환 진단법 개발

Bertin Y, Martin C, Girardeau J-P, Pohl P, Contrepois M (1998) : Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 235-239.

Bhan MK, Raj P, Levine MM, Kaper JB, Bhandari N, Srivastava R, Kumar R, Sazawal S (1989) : Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* 159, 1061-1064.

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

Bridgen, A., Kocherans, R., Tobler, K., Carvajal, A., Ackermann, M.(1998) : Further analysis of the genome of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 440, 781-786.

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

Chu, R. M., Li, N. J., Glock, R. D. and Ross, R. F. (1982). Applications of

peroxidase-antiperoxidase staining technique for detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 77-81.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. (1979) : Adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotype. *Curr. Microbiol.* 3, 95-99.

Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafan H, Uribe F, Estava C.(1991) : Association of *Escherichia coli* HEp-2 cell adherence patterns with type and duration of diarrhea. *Lancet.* 337, 262-264.

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

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

Cubero MJ, Bernard S, Leon L, Berthon P, Contreras A. (1992) : Pathogenicity and antigen detection of the Nouzilly strain of transmissible gastroenteritis coronavirus, in 1-week-old piglets. *J. Comp. Pathol.* 106 61-72.

Dean AG, Ching Y-C, Williams RG, Hardeen LB. (1972) : Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mouse: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125, 407-411.

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

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

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

Duarte, M. (1993) : Genome organization of porcine epidemic diarrhoea virus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 342, 55-60.

Elder RO, Duhamel GE, Mathiesen MR, Erickson ED, Gebhart CJ, Oberst RD (1997) : Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, and salmonellae in porcine intestinal specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 281-286.

Girardeau JP, Der Vartanian M, Ollier JL, Contrepolis M (1988) : CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 56, 2180-2188.

Henry FJ, Udo AS, Wanke CA, Aziz KMA. (1992) : Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Acta. Pediatr. Scand.* 381, S27-S31.

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

Kapke, P. A., Brian, D. A. (1986) : Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene. *Virology*, 151, 41-49.

Kubota, S., Sasaki, O., Amimoto, K., Okada, N., Kitazima, T., Yasuhara, H. (1999) : Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 827-830.

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

Kwon D, Kim O, Chae C (1999) : Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *J Vet Diagn Invest*, 11, 146-151.

Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea (1987) : Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 55, 377-389.

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial PA, Levine MM. (1987) : Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Ped. Infect. Dis.* 16, 829-831.

Nataro JP, Yikang D, Giron JA, Savarino SJ, Kothary MH, Hall R. (1993) : Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect. Immun.* 61, 11236-1131.

Nataro JP, Yikang D, Cookson S, Cravioto A, Savarino SJ, Guers LD, Levine MM, Tacket CO. (1995) : Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* 171, 465-468.

Ojeniyi B, Ahrens P, Meyling A. (1994) : Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J. Vet. Med. B.* 41, 49-59.

Pensaert, M B. (1992) : Porcine epidemic diarrhea, In : *Disease of swine*, 7th ed. (Ed. Leman A. D., Straw, B. E., Mengeling, W. L., D'Allaire, S., Taylor, D. J.), Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA, pp293-298.

Saif LJ, Wesley RD.(1999) : Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, eds. 8th ed. *Disease of Swine*: Iowa State Press, pp295-325.

Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM.(1991) : Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vivo rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87, 1450-1455.

Savarino SJ, Fasano A, Watson J, Martin BM, Levine MM, Guandalini S, Guerry P.(1993) : Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin 1

represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 3093-3097.

Savarino SJ, McVeigh A, Watson J, Cravioto A, Molina J, Echeverria P, Bhan MK, Levine MM, Fasano A (1996) : Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. J. Infect. Dis. 173, 1019-1022.

Tzipori S, Montanaro J, Robind-Browns RM, Vial P, Gibson R, Levine MM. (1992) : Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. Infect. Immun. 60, 5302-5306.

Utiger, A., Tobler, K., Bridgen, A., Ackermann, M. (1995) : Identification of the membrane protein of porcine epidemic diarrhoea virus. Virus Genes, 10, 137-148.

Wanke CA, Schorling JB, Barrett LJ, Desouza MA, Guerrant RL. (1991) : Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. Pediatr. Infect. Dis. J. 10, 746-751.

Witte KH. (1971) : Isolation of the virus of transmissible gastroenteritis (TGE) from naturally infected piglets in cell culture. J. Vet. Med. B. 18, 770-778.

Woodward MJ, Carroll PJ, Wray C. (1992) : Detection of entero- and verocytotoxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 31, 251-261.

Yamamoto T, Echeverria P. (1996) : Detection of the enteroaggregative *Escherichia*

coli heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic E. coli strains pathogenic for humans. *Infect. Immun.* 64, 1441-1445.

Yamamoto T, Wakisaka N, Sato F, Kato A. (1997) : Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 147, 89-95.

Yamamoto T, Nakazawa M. (1997) : Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic E. coli strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35, 223-227.

제 2 절 돼지 호흡기 질환 진단법 개발

Amanfu W, Weng CN, Ross RF, Barnes HJ (1984) : Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: Sequential study by direct immunofluorescence. Am. J. Vet. Res. 45, 1349-1352.

Antonio Amigot J, Torrellorell M, Pijoan C (1998) : Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 10, 169-173.

Artiushin S, Stipkovits L, Minion FC (1993) : Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol. Cell. Probes. 7, 381-385.

Baskerville A (1972) : Development of the early lesions in experimental enzootic pneumonia of pigs: An ultrastructural and histological study. Res. Vet. Sci. 13, 570-578.

Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Lannic JL, Gouranton J, Kobisch M (1992) : Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30, 329-341.

Bölske G, Strandberg ML, Bergström K, Johansson KE (1987) : Species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* and cross-reactions with other porcine mycoplasmas. Curr. Microbiol. 15, 233-239.

Brunnert SR, Dai Y, Kohn DF (1994) : Comparison of polymerase chain reaction

and immunohistochemistry for the detection of *Mycoplasma pulmonis* in paraffin-embedded tissue. Lab. Anim. Sci. 44, 257-260.

Buttenschon J, Rosendal S (1990) : Phenotypical and genotypical characteristics of paired isolates of *Pasteurella multocida* from the lungs and kidneys of slaughtered pigs. Vet. Microbiol. 25, 67-75.

Caruso J, Ross RF (1990) : Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infection on alveolar macrophage functions in swine. Am. J. Vet. Res. 51, 227-231.

Cheon DS, Chae C, Lee YS (1997) : Detection of nucleic acids of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of naturally infected piglets as determined by in situ hybridization. J. Comp. Pathol. 117, 157-163.

Choi C, Kim B, Cho WS, Kim J, Kwon D, Cheon DS, Chae C (2001) : Capsular serotype, *toxA* gene, and antimicrobial susceptibility profiles of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with pneumonia in Korea. Vet. Rec. 149, 210-212.

De Jong MF, Oei HL, Tetenburg GI (1980) : Atrophic rhinitis pathogenicity test for *Pasteurella multocida* isolates. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. 6. 211.

DeBey MC, Jacobson CD, Ross RF (1992) : Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 53, 1705-1710.

Doster AR, Lin BC (1988) : Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in

formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res. 49, 1719-1721.

Foged NT, Nielsen JP, Pedersen KB (1988) : Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 26, 1419-1420.

Friis NF (1975) : Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. Nord. Vet. Med. 27, 337-339.

Goodwin RFW, Pomeroy AP, Whittlestone P (1965) : Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. Vet. Rec. 77, 1247-1249.

Gutierrez MCB, Rodriguez FEF (1993) : In vitro susceptibility of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* strains isolated from swine to 42 antimicrobial agents. Zentral. Bakteriologie 279, 387-393.

Harasawa R, Koshimizu K, Takeda O, Uemori T, Asada K, Kato I (1991) : Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 5, 103-109.

Iwamatsu S, Sawada T (1988) : Relationship between serotypes, dermonecrotic toxin production of *Pasteurella multocida* isolates and pneumonic lesions of porcine lung. Jpn. J. Vet. Sci. 50, 1200-1206.

Kamp EM, Bokken GCAM, Vermeulen TMM, De Jong MF, Buys HECM, Reek FH,

Smits MA (1996) : A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 8, 304-309.

Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER (1996) : Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Clin. Microbiol. 34, 3055-3059.

Livingston CW Jr., Stair EL, Underdahl NR, Mebus CA (1972) : Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. Am. J. Vet. Res. 33, 2249-2258.

Mattsson JG, Bergström K, Wallgren P, Johansson KE (1995) : Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 33, 893-897.

Messier S, Ross RF (1991) : Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. Am. J. Vet. Res. 52, 1497-1502.

Min K, Chae C (1998) : Detection and distribution of DNA of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the lungs of naturally infected pigs by in situ hybridization. J. Comp. Pathol. 119, 169-175.

NCCLS (1997) : Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard M7-A4. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1-63.

Pennings AMMA, Strom PK (1984) : A test in Vero cell monolayers for toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs suspected of

having atrophic rhinitis. *Vet. Microbiol.* 9, 503-508.

Pijoan C, Lastra A, Ramires C, Leman AD (1984) : Isolation of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* from lungs of pneumonic swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 185, 522-523.

Rimler RB (1994) : Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsular depolymerization with mucopolysaccharidases. *Vet. Rec.* 134, 191-192.

Ross RF (1992) : Mycoplasmal disease. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DI, eds. *Diseases of Swine*, 7th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 537-551.

Rutter JM, Luther PD (1984) : Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.* 114, 393-396.

Rutter JM, Rojas X (1982) : Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.* 110, 531-535.

Salmon SA, Watts JL, Case CA, Hoffman LJ, Wegener HC, Yancey RJ Jr. (1995) : Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2435-2444.

Stemke GW, Phan R, Young TF, Ross RF (1994) : Differentiation of *Mycoplasma*

hyopneumoniae, *M flocculare*, and *M hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. Am. J. Vet. Res. 55, 81-84.

Stephen CP, Gibson JA, Richardson L (1995) : Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolates from cases of pneumonia in slaughter swine from south-east Queensland. Aust. Vet. J. 72, 156.

Zhang Q, Young TF, Ross RF (1994) : Glycolipid receptors for *Mycoplasma hyopneumoniae* adherence to swine respiratory epithelium. Infect. Immun. 62, 4367-4373.

Zielinski GC, Ross RF (1993) : Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. Am. J. Vet. Res. 54, 1262-1269.

제 3 절 돼지 소모성 질병 진단법 개발

Allan, G.M. and Ellis, J.A. (2000) : Porcine circoviruses: a review. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 3-14.

Allan, G. M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J. C., Ellis, J. A., Krakowka, S. J., Meehan, B. M. and Adair, B. M. (1999) : Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. J. Comp. Pathol. 121, 1-11.

Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., Reilly, G.A.C., Adair, B., Ellis, J.A. and McNulty, M.S. (1995) : Pathogenesis of porcine circovirus, experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 44, 49-64.

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E.G., Ellis, J.A., Haines, D.M., Meehan, B.M. and Adair, B.M. (1998) : Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. J. Vet. Diagn. Invest. 10, 3-10.

Allan, G., Meehan, B., Todd, D., Kennedy, S., McNeilly, F., Ellis, J., Clark, E.G., Harding, J., Espuna, E., Botner, A. and Charreyre, C. (1998) : Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. Vet. Rec. 142, 467-468.

Allan, G.M., and Phenix, K.V., Todd, D. and McNulty, M.S. (1994) : Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. J. Vet. Med. B. 41, 17-26.

An, S.F., and Fleming, K.A. (1991) : Removal of inhibitor(s) of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin wax embedded tissues. *J. Clin. Pathol.* 44, 924-927.

Balash, M., Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A. and Plana-Duran, J. (1999) : Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 121, 139-148.

Bascunana, C.R., and Belak, K. (1996) : Detection and identification of *Mycobacteria* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2351-2355.

Brahic, M., Haase, A.T., and Cash, E., (1994) : Simultaneous in situ hybridization of viral RNA and antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 5445-5448.

Cheon, D.-S., and Chae, C., (1999) : Distribution of a Korean strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs, as demonstrated immunohistochemically and by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 120, 79-88.

Cheon, D.-S., and Chae, C. (1999) : Distribution of a Korean strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in experimentally infected pigs, as demonstrated immunohistochemically and by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 129, 79-88.

Choi, C., Chae, C., and Clark, E.G. (2000) : Porcine postweaning multisystemic

wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 151-153.

Choi, C., and Chae, C. (2000) : Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 123, 302-305.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Nelson, J.K., Hines, R.J., Swenson, S.L., Hill, H.T., Zimmerman, J.J., Katz, J.B., Yaeger, M.J., Chase, C.C.L., and Benfield, D.A., (1995) : Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1730-1734.

Clark, E. G., (1997) : Post-weaning wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine. Prac.* 28, 499-501.

Dulac, G.C. and Afshar, A., (1989) : Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 53, 431-433.

Edwards, S., and Sands, J.J., (1994) : Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet. Rec.* 134, 680-681.

Ellis, J.A., Bratanich, A., Clark, E.G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D.M., Harding, J., West, K.H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K. and McNeilly, F., (2000) : Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn.*

Invest. 12, 21-27.

Ellis, J.A., Hassard, L., Clark, E., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D., and Haines, D., (1998) : Isolation of circovirus-like virus from lesions with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39, 44-51.

Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Brantanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S., and McNeilly, F., (1999) : Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 3-14.

Greer, C.E., Peterson, S.L., Kiviat, N.B., and Manos, M.M., (1991) : PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am. J. Clin. Pathol.* 95, 117-124.

Goelz, S.E., Hamilton, S.R., and Vogelstein, B., (1985) : Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 130, 118-126.

Haines, D.M. and Chelack, B.J., (1991) : Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 101-112.

Hamel, A.L., Lin, L.L., and Nayar, G.P.S. (1998) : Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J.*

Viol. 72, 5262-5267.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Sachvie, C., Grudeski, E., and Nayar, G.P.S., (2000) : PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can. J. Vet. Res.* 64, 44-52.

Harding J.C., and Clark E.G., (1997) : Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod.* 5, 201-203.

Harding, M.J., and Molitor, T.W., (1988) : Porcine parvovirus replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Arch. Virol.* 101, 105-117.

Hines, R.K., and Luckert, P.D., (1995) : Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States. *Swine Health Prod.* 3, 71-73.

Imai, K., Mase, M., Yamaguchi, S., Yuasa, N., and Nakamura, K., (1998) : Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 64, 205-208.

Kennedy, S., Allan, G., McNeilly, F., Adair, B.M., Hughes, A., and Spillane, P., (1998) : Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 142, 495-496.

Kerstens H.M., Poddighe P.J., and Hanselaar A.G., (1994) : Double-target in situ hybridization in brightfield microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1071-1077.

Kiupel, M., Stevenson, G. W., Mittal, S. K., Clark, E. G., and Haines, D. M., (1998)

: Circovirus-like viral associated disease in weaned pigs in Indiana. *Vet. Pathol.* 35, 303-307.

Krakovka S., Ellis J. A., McNeilly F., Ringler S., Rings D. M., and Allan G., (2001) : Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet. Pathol.* 38, 31-42.

Krakovka, S., Ellis, J. A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., and ALLAN, G., (2000) : Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet. Pathol.* 37, 254-263.

Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., and MAGAR, R., (1999) : Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods.* 80, 69-75.

Larochelle, R., Bielanski, A., Muller, P., and Magar, R., (2000) : PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4629-4632.

Larochelle, R., Morin, M., Antaya, M., and Magar, R., (1999) : Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet. Rec.* 145. 140-142.

LeCann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., and Jestin, A., (1997) : Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 141, 600.

LeCann, P., Blanchard, P., Arnauld, C., Albina, E., Hutet, E., Madec, F., Morvan, P.,

Eveno, E., Cariolet, R., and Jestin, A., (1998) : Identification of porcine circovirus associated with piglet wasting disease. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong.* 15, 402.

Magar, R., Muller, P. and Larochelle, R., (2000) : Retrospective serological survey of antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2. *Can. J. Vet. Res.* 64, 184-186.

McNeilly, F., Allan, G. M., Foster, J. C., Adair, B. M., McNulty, M. S., and Pollock, J., (1996) : Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 295-306.

McNeilly, F., Kennedy, S., Moffett, D., Meehan, B. M., Foster, J. C., Clark, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Adair, B. M., and Allan, G. M., (1999) : A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J. Virol. Methods.* 80, 123-128.

Meehan, B. M., Creelan, J. L., McNulty, M. S. and Todd, D., (1997) : Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 78, 221-227.

Meehan, B. M., McNeilly, F., Todd, D., Kennedy, S., Jewhurst, V. A., Ellis, J. A., Hassard, L. E., Clark, E. G., Haines, D. M., and Allan, G. M., (1998) : Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171-2179.

Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Morgan, M. K., Yoon, K.-J., and PAUL, P. S., (1998) : Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36,

2535-2541.

Nawagitgul, P., Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S. D., and Paul, P.S., (2000) : Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization. *Vet. Microbiol.* 75, 83-89.

Onuki, A., Abe, K., Togashi, K., Kawashima, K., Taneichi, A. and Tsunemitsu H., (1999) : Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 1119-1123.

Ranz, A. I., Manclus, J. J., Diaz-Aroca, E., and Casal, J.I., (1989) : Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J. Gen. Virol.* 70, 2541-2553.

Studdert, M. J., (1993) : Circoviridae: new viruses of pigs, parrots and chickens. *Aust. Vet. J.* 4, 121-122.

Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., and Greim, W., (1986) : Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91, 271-276.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.