

RT-PCR과 ELISA를 이용한 PRRS 진단 및 항체가 조사

추금숙, 한규삼, 한재철^{1*}, 송희중^{**}

전북축산진흥연구소장수지소, 축산진흥연구소익산지소*, 전북대학교 생체안전성연구소^{**}
(접수 2003. 1. 18, 게재승인 2004. 2. 25.)

Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and its serological survey using the reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and ELISA

Keum-Suk Chu, Keu-Sam Han, Jae-Cheol Han^{1*}, Hee-Jong Song^{**}

Jangsu-Branch, Jeonbuk Development & Livestock Research Institute, Jangsu, 597-841, Korea

^{1}Iksan-Branch, Jeonbuk Development & Livestock Research Institute, Iksan, 570-390, Korea*

*^{**}Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

(Received 18 January 2004, accepted in revised from 25 February, 2003)

Abstract

The studies were performed for the PRRS antigen and antibody detection from breeding farms, artificial insemination(AI) center and growing farms in Jeonbuk province.

1. Specific PRRS primers were successfully amplified ORF6 617 bp and ORF7 448 bp on agarose gel.
2. RT-PCR method has been establish by commercial kit and the thermal cycler program consisted of 30 cycles: 95°C for 30 sec, 45°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec.
3. The results of PRRS antibody test by ELISA method in AI centers were 6.6%, 53.3% and breeding farms 65%, 65% and 38.7%, respectively. The serological positive of the antibody in gilt higher than sow.
4. The sero-positive of the PRRS antibody showed average 21% in domestic farms, 56.2% in breeding farms, and 29.9% in AI center.

Key words : PRRS, RT-PCR, ELISA

¹Corresponding author

Phone : +82-63-220-6500, Fax : +82-63-220-6511

E-mail : jc5275@kornet.net

서 론

돼지생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)은 Arteriviridae에 속하며 피막이 있는 RNA 바이러스로 지속감염을 유발하고 바이러스가 백혈구(대식세포) 내에 살며 오랜 기간동안 조직부위에 은거한다^{1,2)}. PRRS 바이러스 유전자의 크기는 약 15kb로 8개의 opening reading frame(ORF)로 구성되어 있고, 증명된 3개의 중요한 구조적 단백질로 nucleocapsid protein ORF7은 14-15 kDa, membrane protein ORF6 18-19 kDa, envelope glycoprotein ORF5 24-25 kDa이 있고 다른 구조적 glycoprotein으로 ORF 4,3,2가 있다^{3,4)}. 또한 바이러스 strain 사이에 변이가 심한 것으로 알려져 있으며 감염여부를 진단하기 위해서는 바이러스의 분리·동정 또는 항원의 증명, 바이러스 특이항체의 검출 등이 있고, 백신을 실시하지 않은 돈군은 혈청학적 진단법인 혈청중화시험, 면역효소단층법, 간접형광항체법(indirect immunofluorescent antibody assay, IFA)⁵⁾, 효소면역법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^{6,7)} 등이 보고되었으며, 이중 IFA와 ELISA방법이 널리 사용되고 있다.

PRRS의 최초 보고는 1987년 미국에서 이루어졌으며, 그 후, 유럽에서는 1990년 독일, 영국, 네덜란드 등 세계 각국에서 확인되었다. 국내에서는 1993년 처음으로 바이러스가 분리되었으며⁸⁾, 혈청학적 검사결과에 따르면 1980년대 후반부터 발생되었던 것으로 추정되고 있다⁹⁾. 현재 국내에서는 IFA, ELISA법을 사용하여 전국적인 혈청학적 모니터링이 이루어지고 있다¹⁰⁻¹⁵⁾.

PRRS가 임신돈에 감염되면 태반을 통한 감염이 일어나며 감염부위에 따라 임상증상 정도의 차이가 있을 수 있으며, 임신말기의 유산·사산과 재발정 증가, 분만을 저하 등의 임상증상으로 엄청난 경제적인 피해를 초래하게 될 뿐 아니라, 인공수정(AI) 및 자연교배를 통하여 급속히 전파될 수 있는 질병으로 웅돈의 철저한 위생 및 질병관리가 요구되고 있는 실정이다.

바이러스는 보통 혈중 항체가 형성되면 바이

러스가 더 이상 존재하지 않는 것으로 알려져 있으나 PRRS는 항체 존재 유무와 관계없이 바이러스가 배출되는 것으로 보고되어 있다¹⁶⁾. PRRS는 호흡기로 감염되면 단독적으로 질병을 일으키는 경우는 드물고 이유자돈 및 육성돈에서 대부분 세균성질병이 이차적으로 감염되어 폐사율 증가, 사료효율 저하 등을 일으키는 경우가 많다¹⁷⁻²⁰⁾. 특히 호흡기형은 특별한 임상증상을 관찰할 수 없기 때문에 무심코 방치함으로써 잠재적인 피해가 클 것으로 추정되며, 농장의 기본적인 사양관리와 환경의 개선 및 단계별 분리사육 등을 병행한 백신의 접종으로 개선할 수 있다고 보고되어 있다²¹⁻²³⁾.

본 연구는 관내 종돈장 및 AI센터의 임신돈, 웅돈에 대하여 PRRS 바이러스 분리동정을 위해 역전사 효소중합연쇄 반응(reverse transcription and polymerase chain reaction, RT-PCR)과 항체가의 분포를 ELISA로 조사하여 질병예방 및 방역 지도의 기초자료로 활용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

관내 종돈장 3농가에서 분기별 20두(모돈 10, 후보돈 10)씩 240두, AI센터 2농가는 반기별 30두씩(웅돈) 60두, 일반양돈장 5농가의 52두를 채혈하여 실험에 사용하였고, PCR 실험을 위한 양성샘플로 국내에서 판매되는 베링거인겔하임(Ingelvac PRRS MLV)의 생독백신을 사용하였으며, 종돈장 후보모돈 30두의 전혈에서 백혈구를 분리하여 PCR을 실시하였다.

검사방법

RT-PCR : 국내에서 판매되는 생독백신(PRRS-ATCC VR 2332 strain)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 요약하면, RLT buffer 600 μ l와 샘플 300 μ l를 넣고 vortexing한 후 70% ethanol 600 μ l 첨가하여 다시 vortexing하고 mini column에 반응액 750 μ l를 넣고 13,000rpm 1분간 원심하여 튜브속 용액을 제거한 후 남은

Table 1. The primers used in RT-PCR

Primers	Sequences('5-3')	PCR production
PORF6F1	ggggATCCAgAgTTTCAGcGg	617 bp
PORF6R1	gggAATTCTggCACAgCTgATTgAC	
PORF7F1	ggggATCCTTgTTAAATATgCC	448 bp
PORR7R1	gggAATTCACCACgCATTC	

용액을 다시 원심후 용액을 제거하였다. 이어서 RW1 buffer 700 μ l 첨가한 후 13,000rpm에서 1분간 원심하고 column을 새로운 튜브에 놓고 이를 2번 실행한 후 column에 용액에 남지 않도록 완전히 제거하였다. Column을 새로운 에펜들프튜브에 넣고 50 μ l RNase-free water를 첨가하여 10분후 13,000rpm에서 2분간 원심하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 Bioneer kit 및 ONESTEP RT-PCR KIT(Cat. NO. 210210, Qiagen)를 사용하여 Table 1과 같이 ORF6 및 ORF7 유전자를 증폭하였다.

BIONEER : 추출한 RNA를 ORF 6, ORF7 reverse primer 1 μ l를 첨가하여 70 $^{\circ}$ C 5min 반응시킨 후(template mix) Bioneer사의 RT preMIX(Cat. K-2041)에 14 μ l RNAfree water를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C 60min, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성한 후 Bioneer PCR Premix (Cat. K-2013)에 반응산물 10 μ l, RNAfree water 39 μ l, ORF6, ORF7 primer를 각각 0.5 μ l씩 첨가하여 최종량 50 μ l가 되게 하였다. 증폭과정은 PCR Peltier thermal cycler(MJ Research PTC-2000)를 사용하여 predenaturation은 95 $^{\circ}$ C 10분, denaturation은 95 $^{\circ}$ C 30', annealing은 45 $^{\circ}$ C 30', extension은 72 $^{\circ}$ C 45'으로 하여 30회 반복 하고 최종적으로 95 $^{\circ}$ C 30', 45 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 5분간 반응시켰다.

Quiagen(one step) : PCR 반응은 RNase-free water 12 μ l, 5 \times onestep RT-PCR buffer 5 μ l, dNTP MIX 1 μ l, onestep RT-PCR Enzyme MIX 1 μ l, ORF6과 ORF7 primer pairs 각각 0.5 μ l 첨가 후 Template RNA 5 μ l 넣어 총25 μ l가 되게 하였다. 증폭과정은 PCR Peltier thermal cycler를 사용하였고, predenaturation은 57 $^{\circ}$ C 10분, 42 $^{\circ}$ C 60분, 94 $^{\circ}$ C 10분,

denaturation은 95 $^{\circ}$ C 30', annealing은 45 $^{\circ}$ C 30', extension은 72 $^{\circ}$ C 45'으로 하여 30회 반복 하고 최종적으로 95 $^{\circ}$ C 30', 45 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 10분 반응시켰다.

PCR이 완료되면 반응액 10 μ l와 loading dye 2 μ l를 1.2% agarose gel(ethidium bromide 1 μ g/ml, Bioneer)에 단편의 크기를 확인하기 위해 100bp DNA Marker와 함께 1 \times TAE buffer가 들어있는 전기영동 tank에 gel을 침적시킨 후 120V/cm, 60분간(Owl EasyCast Minigel system) 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel을 UV illuminator에서 RNA band 증폭유무를 확인하였다.

ELISA

시판되고 있는 PRRS 항체진단 ELISA kit (Herdcheck PRRS virus antibody test kit, IDEXX, USA)를 사용하였다. 비동화 혈청을 40배 희석하여 ELISA 검사용 plate에 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 세척액 300 μ l으로 5회 세척하여 anti-porcine HRPO conjugate를 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 후 plate를 5회 세척하고 TMB substrate를 100 μ l씩 첨가하여 실온에서 15분간 반응시키고, stop solution을 100 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시킨 후 흡광도를 측정하였다.

결 과

RT-PCR 결과

생독백신을 10^{4.6}TCID/ml, 10^{4.4}TCID/ml, 10^{4.3}TCID/ml, 10⁴TCID/ml, 10^{2.19}TCID/ml,

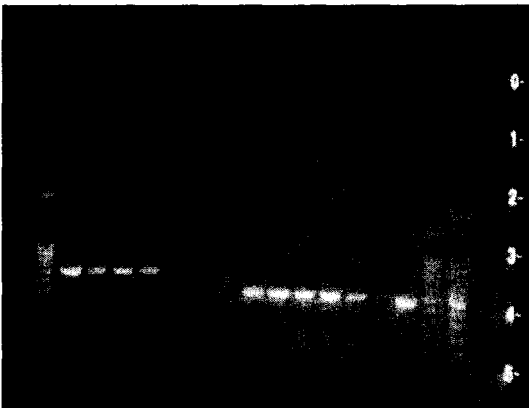
$10^{0.98}$ TCID/ml로 희석하여 RNA 분리 후 PCR 증폭결과 Bioneer사의 키트는 ORF6 primer에서는 $10^{2.19}$ TCID/ml까지, ORF7 primer는 $10^{0.98}$ TCID/ml까지 증폭산물을 확인할 수 있었고 (Fig 1), Quiagen kit를 사용한 One step PCR에서는 ORF6 primer에서는 10^4 TCID/ml, ORF7 primer는 $10^{0.98}$ TCID/ml(Fig 2)까지 미약한 증폭산물이 확인되었다.

종돈장 하반기 후보모돈 3농가 중 2농가에서 ORF6 primer가 증폭됨을 확인할 수 있었다.

ELISA 역가

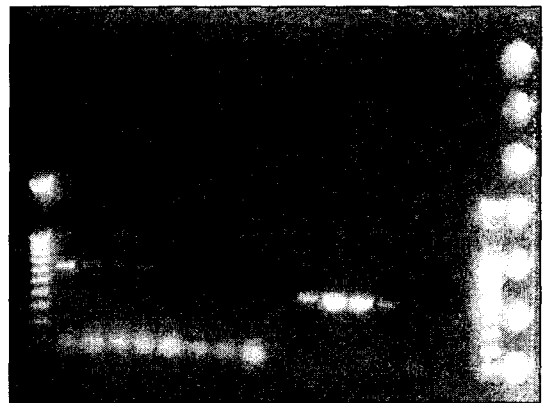
상반기 AI센터 항체가 검사결과 A농가는 양성율 13.3%, 0%로 평균 6.6%, B농가는 100%. 6.6%로 평균 53.3%로 15두 모두 양성이었으며, 이중 14두가 S/P ratio값 1.0 이상의 높은 결과를 보였으나, 사육환경의 개선 및 용돈 교체 등으로 하반기에는 15두중 1두 양성, S/P ratio 1.0 이하로 나타났다.

종돈장에 대한 항체가검사 결과 A농가는 모



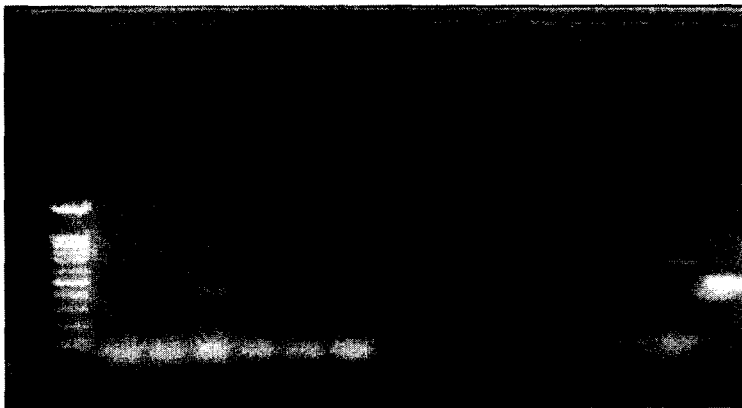
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig 1. Results of electrophoresis by Bioneer kit. M:100 bp ladder Lane, 1 to 6 ORF6, 7 to 12 ORF7



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Fig 2. Results of gel electrophoresis by Quiagen kit. M:100 bp ladder Lane, 1 to 7 ORF6, 8 to 14 ORF7



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Fig 3. Results of agarose gel electrophoresis from sample M : 100 bp ladder Lane, 1 to 2 Farm C, 3 to 4 Farm A, 5 to 6 Farm B : ORF6 7 to 8 Farm C, 9 to 10 Farm A, 11 to 12 Farm B : ORF7 13 to 14 Positive control

돈 57.5%, 후보모돈 72.5%로 평균 65%, B농가는 모돈 45%, 후보모돈 85%로 평균 65%, C농가는 모돈 10%, 후보모돈 67.5%로 평균 38.7% 양성율을 보였으며 3농가 모두 후보모돈에서 높은 양성율을 보였다. A종돈장은 백신을 실시하지 않았고 4분기 검사한 10두중 9두가 양성으로 S/P ratio값 1.0 이상은 5두였으며 항원이 확인되었다. B종돈장은 S/P ratio값 1.0이상인 모돈 18두중 13두로 72.2%, 후보모돈 34두중 29두로 85%으로 백신접종에 따른 항체가보다 높았으며 4분기 검사한 후보모돈에서 항원이 확인되었다. C종돈장은 4분기 검사한 결과 후

보모돈 양성10두가 S/P ratio값 1.0이상이었으나 항원은 확인되지 않았다. 양돈장 5농가에서는 0% ,10% 12%, 50%, 40%로 오히려 종돈장보다 양성율이 낮게 나타났으며 0%를 보인 A양돈장은 사양관리 및 방역관리가 철저하였으며, 50% 양성율을 보인 농장은 B종돈장에서 분양한 것으로 확인되었다(Table 2).

고 찰

PRRS 바이러스는 접촉감염, 공기감염, 웅돈을 통한 전파 등 전파경로가 다양하며 전파속

Table 2. Result of antibody to the PRRS virus in AI center, breeding and growing farms

Farms	Period (term)	No of samples	Percent of antibody positive	Positive / Tested (%)		Remarks S/P ratio 1.0>
				Boar, Sow	Gilt	
AI center	A	1	6.6	2/15 (13.3)		2
		3		0/15 (0)		0
	B	1	53.3	15/15 (100)		14
		3		1/15 (6.6)		0
Breeding farms	A	1	65	10/10 (100)		4, 3
		2		10/10 (100)		0, 5
		3		1/10 (10)		1, 3
		4		2/10 (20)		1, 5
	B	1	65	7/10 (70)		5, 9
		2		8/10 (80)		7, 3
		3		0/10 (0)		0, 7
		4		3/10 (30)		1, 10
	C	1	38.7	4/10 (40)		1, 5
		2		0/10 (0)		0, 0
		3		0/10 (0)		0, 2
		4		0/10 (0)		0, 8
Growing farms	A	14	0	0/14 (0)		-
	B	10	10	1/10 (10)		1
	C	8	12	1/8 (66)		-
	D	10	50	5/10 (50)		3
	E	10	40	4/10 (40)		4
Total		352	46.5	65	95	

도가 빨라서 일단 감염이 이루어지면 농장은 단시간에 바이러스가 만연되어 바이러스 배설이 장기간 지속되므로 근절이 용이하지 않은 것으로 알려져 있다. 이러한 피해를 줄이기 위해서는 예방접종, 조기이유방식, 성장단계별 분리사육 등 다양한 대책이 강구되어야 하며, 바이러스 진단은 세포배양을 통하여 바이러스를 확인하고 있지만 세포배양은 수일의 시간이 소요되고 숙련된 기술이 필요하므로 빠르게 진단할 수 있는 PCR 방법이 확립되어야 할 것이다. 국내 PRRS 분리주의 유전적 특징에 대한 연구에 따르면 미국 및 유럽분리주에 특이적인 primer를 이용해 PCR 반응을 실험한 결과 양성반응을 나타냄이 보고된 바 있어^{24,25)} 유전적 특징이 미국 분리주와 유사한 것으로 보여진다. 본 연구는 RT-PCR^{26,27)}을 통한 RNA 진단법을 상용화 되어있는 키트를 사용하여 진단 시간을 단축할 수 있었으며 ORF 6, ORF 7 primer를 사용한²⁸⁾ PCR 진단법으로 항체조사 농가 PRRS 증폭산물을 확인할 수 있었다.

실험결과에 따르면 백신을 실시하지 않은 두 농장 후보모든 양성율은 각각 72%, 66%이었고 모든 57%, 10%에 비해 높게 나타났으며, A종돈장은 정기적인 검사로 PRRS 항체 양성율이 높은 것을 인식하고 분리사육 등 PRRS 근절을 위해 사양관리 등을 개선함으로써 비육돈의 호흡기증상외에 유사산 증상은 없는 것으로 조사되었다. C종돈장은 1분기에 검사결과 66%의 양성율을 보였나 2,3분기에는 20%로 감소하는 경향을 보이다가 4분기에는 50%로 상승되었으나 모돈에서는 특이 증상이 관찰되지 않았고, 육성돈에서 호흡기증상이 증가하여 위생관리가 소홀해진 것으로 판단되었다. B종돈장은 비육돈의 호흡기 증상 및 임신돈의 유사산으로 인해 2분기에 PRRS백신을 접종하였고 백신 실시 시점을 고려하더라도 높은 항체가 및 항원의 존재가 확인되었으며 4분기에서 후보모든 S/P ratio가 평균 3.14로 백신접종에 의한 항체가보다 높게 나타나 야외균주에 노출된 것으로 판단되었으며, 본 질병을 근절을 위해서는 예방접종만으로는 어렵고, 항체가 검사결과 야외균주에 의한 감염으로 확인될 때에는 우선적으로

도태 처리하는 것을 권장한다.

AI center는 백신을 접종하지 않았으나 6.6%, 53.3%의 항체 양성율을 나타내 최근 인공수정이 증가추세를 감안할 때 정액으로 확산될 위험성이 있으므로 웅돈에 대한 정기적인 항체 및 항원검사가 철저히 이루어져야할 것으로 사료된다.

PRRS는 현재 양돈장 및 종돈장에 만연되어 있는 것으로 추정되며 특히, 종돈장 및 AI 센터는 항체 및 항원검사와 함께 사양관리 등 전반적인 점검이 요구되며, 무분별한 백신접종은 백신균주와 야외균주의 혼재에 따른 농장 상황의 악화를 초래할 수 있으므로 후보모든 선발 및 입식시 본 질병에 대한 점검이 철저하며 일괄적인 사양관리 체계를 확립하고 질병 차단을 위한 최선의 방역이 선행되어야 할 것으로 본다.

결 론

관내 종돈장 및 AI center, 양돈장에서 모든, 후보모든, 웅돈에 대한 PRRS 항체 및 항원검사 결과는 다음과 같다.

1. PRRS primer ORF6 617 bp, ORF7 448 bp 에서 유전자 증폭결과를 확인할 수 있었다.
2. 상용화 되어있는 두 회사의 키트를 사용하여 95°C 30', 45°C 30', 72°C 45'로 30 cycle로 PCR을 진행한 결과 다른 바이러스와 교차반응 없이 특이적인 증폭산물을 확인되었으며, 이러한 결과는 전혈에서도 동일하게 확인되었다.
3. ELISA 항체검사 결과 AI 센터에서는 각각 6.6%, 53.3%, 종돈장은 65%, 65%, 38.7%로 나타났으며, 후보 모든의 양성율이 모돈에 비해 높았다.
4. 양돈장, 종돈장, AI center의 평균 항체 양성율은 각각 21%, 56.2%, 29.9%로 나타났다.

참고문헌

1. Conzelman KK, Visser N, Van Woensel P, et al. 1993. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus, a member of arterivirus group. *Virology* 193 : 329-339.
2. Cavanagh D. 1997. Nidovirales : A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 142 : 629-633.
 3. Snijder E, Meulenberg JJM. 1998. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 79 : 961-979.
 4. Meulenberg JJM, Hulst MM, De Meijer EJ, et al. 1993. Lelystad virus, the causative antigen of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 192 : 62-72.
 5. Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al. 1992. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J Vet Diagn Invest* 4 : 144-147.
 6. Albina E, Leforban Y, Baron T, et al. 1992. An enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Ann Res Vet* 23 : 167-176.
 7. Houben S, Callebaut P, Pensaert MB. 1995. Comparative study of a blocking enzyme linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J Virol Methods* 51 : 125-128.
 8. 권창의, 권병준, 이항정 등. 1994. 돼지생식기 및 호흡기증후군 바이러스의 국내 분리주 작성에 관한 연구, *대한수의학회지* 34(1) : 77-83.
 9. Shin JH, Kang YB, Kim YJ, et al. 1993. Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. *RDA J Agri Sci* 35(2) : 572-576.
 10. 김현수, 공신국. 1999. 야외농장으로부터 수집된 돼지혈청가검물에서 돼지생식기 호흡기바이러스 항체검사. *한가위지* 22(4) : 371-375.
 11. 김현수, 공신국. 1999. 돼지 농장으로부터 수집한 혈청가검물에서 돼지생식기호흡기 바이러스 분리 및 동정. *한가위지* 22(4) : 363-370.
 12. 박최규, 류영수, 권창희 등. 1998. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스 항체 검색에 있어 간접형광항체법(IFA)과 효소면역법(ELISA)의 진단효율 비교. *대한수의학회지* 38(2) : 314-318.
 13. 박최규, 장정호, 강영배 등. 1999. 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스의 항체분포 및 역학조사. *대한수의학회지* 39(1) : 111-117.
 14. 한경수, 류광수, 박봉균. 1999. 한국의 돼지 생식기호흡기증후군 발생경향. *대한수의학회지* 39(1) : 133-137.
 15. 공신국, 이견택, 이관복 등. 2003. 당진지역 돼지생식기호흡기증후군 항체가 조사. *한가위지* 26(3) : 227-231.
 16. Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, et al. 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *JAVMA* 104 : 1943-1948.
 17. Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, et al. 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Routes of excretion. *Vet Microbiol* 57 : 69-81.
 18. Zimmerman JJ, Yoon KJ, Wills RW, et al. 1997. General overview of PRRSV: A perspective from the United States. *Vet Microbiol* 55 : 187-196.
 19. Christianson WT, Joo HS. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome : a review. *Swine Health Prod* 2 : 10-28.
 20. Benfield DA, Collins JE, Dee SA, et al. 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Disease of swine*.

- 8th ed, Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA : 201-232.
21. Park CK, Lyoo YS, Choi SH, et al. 1996. An elimination of microbiological pathogens in the newly established swine herd from contaminated farm by modified medicated early weaning. *Proc 14th IPVS* : 486.
 22. Christianson WT, Connor JC, Crowe CK, et al. 1994. Elimination of PRRS virus with isowean. *Proc 13th IPVS* : 68.
 23. Dee SA, Joo HS. 1994. Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet Rec* 135 : 6-9.
 24. 류영수, 박최규, 이창희. 1998. Nested PCR 및 RT-PCR기법을 이용한 PRRSV의 정액 내 신속감별진단법. *대한수의학회지* 38(1) : 77-83.
 25. Christopher-Hennings J, Nelson JK, Hines RJ, et al. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol* 33 : 1730-1734.
 26. 박최규, 류영수, Paul PS. 1998 RT-PCR기법을 이용한 돼지 로타바이러스 주요 혈청형 감별진단. *대한수의학회지* 38(1) : 85-89.
 27. 안재문, 조우영, 이종인 등. 1999. RT-PCR 기법을 이용한 분변내 소 코로나바이러스 검출. *한가위지* 22(3) : 239-245.
 28. 황의경, 김재훈, 김병한 등. 1998. 돼지 유사산증의 발병요인. *수의과학논문집* 40(1) : 48-53.