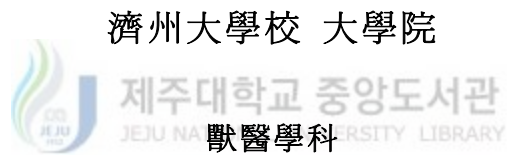


碩士學位論文

濟州에서 이유 후 전신소모성 증후군
돼지로부터 Circovirus의 分離와 同定



鄭 京 柱

2002年 2月

濟州에서 이유 후 전신소모성 증후군
돼지로부터 Circovirus의 分離와 同定

指導教授 李 斗 植

鄭京柱

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함



鄭京柱의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長_____ (印)

委 員_____ (印)

委 員_____ (印)

濟州大學校 大學院

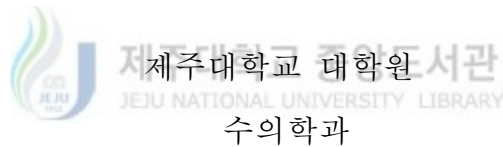
2002年 2月

초 록

제주에서 이유 후 전신소모성 증후군 돼지로부터 Circovirus의 분리와 동정

(지도교수 : 이 두 식)

정 경 주



이유 후 전신소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)은 전혀 새로운 질병으로 점진적인 체중감소, 호흡곤란, 설사, 황달, 림프절 종대와 간질성 폐렴을 특징으로 한다.

이 질병은 돼지 신장 세포주에서 처음 분리한 비병원성 돼지 썬코바이러스 type-I(PCV-I)과는 다른 strain인 병원성 type-II(PCV-II)에 의해 발생한다.

본 연구는 PCV 항원과 혈청 항체를 검출하여 제주 지역에서 PCV에 감염된 돼지의 실재를 조사하고자 실시하였다 .

1999년 1두와 2001년에 수집된 12두를 포함하여 총 13두의 다양한 장기를 가지고 면역조직화학(IHC), 복합중합효소연쇄반응(multiplex PCR)을 실시

하여 PCV 항원을 관찰하였으며, 건강한 돼지 200두로부터 PCV-I에 자연 감염된 PK-15 세포배양을 이용한 간접형광항체법(IFA)으로 PCV에 대한 항체를 조사한 결과 다음과 같았다.

1) PCV에 대한 항체 양성율은 평균 26%였으며, 2) IHC를 이용하여 편도, 간, 림프절, 소장에는 있는 macrophage모양의 세포에서 PCV-II 항원을 관찰했고, 3) PMWS는 1999년에 이미 존재했으며, 4) PCV-II만을 13두 중 11두(85%)에서 확인함으로써 PCV-II가 제주지역에서 PMWS를 일으키는 주요 원인체임을 알 수 있었다.

중심어 : 썬코바이러스, 면역조직화학, 복합중합효소연쇄반응, 간접형광항체법



목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법		4
III. 결	과	10
IV. 고	찰	16
V. 결	론	19
VI. 참 고 문 헌		21
VII. 영 문 초 록		25



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

돼지 썬코바이러스(porcine circovirus; PCV)는 바이러스 배양에 사용되는 돼지 신장 세포주(PK-15)에 오염되어 있는 바이러스로 Tischer 등 (1982)에 의해 처음으로 확인되었다. 이 바이러스는 정이십면체 구조를 가지는 single strain DNA 바이러스로 envelope가 없고, 다른 바이러스보다 가장 작은 직경이 약 17nm에 불과하며 산성조건(pH 3.0)이나 chloroform 또는 고온(56°C 및 70°C)에서도 불활화되지 않는 저항성을 가지고 있는 것으로 알려져있다 (Allan 등, 1994; Straw 등, 1999).

PCV는 Circoviridae (Lukert 등, 1995)에 속하며, 혈청학적 방법으로 검사한 결과 독일 (Tischer 등, 1982), 캐나다 (Dulac 과 Afshar, 1989), 뉴질랜드 (Horner, 1991), 영국 (Edwards 와 Sands, 1994), 북아일랜드 (Allan 등, 1994), 미국 (Hines 와 Lukert, 1995) 등의 돈군에서 20~80%의 항체 양성율이 확인되어 거의 전 세계적으로 감염되어 있을 것으로 추정되고 있다.

Circoviridae에 속하는 바이러스에는 거의 모든 종의 앵무새에서 깃털의 소실과 부리와 발톱의 기형을 유발하는 BFDV(beak and feather disease virus)바이러스, 닭에서 빈혈과 골수 이형성을 유발하는 CAV(chicken anemia virus)바이러스, PCV 등이 있으며, 기타 비둘기, 소, 말, 쥐 등에서도 보고된 바 있고 최근에는 TT virus(TTV)로 명명된 사람의 썬코 바이러스도 동정되었다 (Lukert 등, 1995; Nishizawa 등, 1997). 그러나 각각의 바이러스는 동질성이 없으며 교차반응도 하지 않는 것으로 알려져 있다.

PCV는 혈청학적 검사나 바이러스 분리 검사시 매우 흔하게 검출되고, 돼지에 실험적으로 감염시켰을 때 질병을 유발하지 않는 것으로 알려져 있던 중 이유 후 전신소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS)의 증상을 나타내는 돼지의 장기에서 기존의 바이러스

와는 다른 새로운 썬코바이러스를 검출하였다. 따라서 이들은 PK-15 세포에 오염되어 있던 비병원성 PCV-I과 구별하기 위하여 본 바이러스를 PCV-II로 구분하였다 (Allan 등, 1998; Meehan 등, 1998). PCV-II는 기존의 PCV-I과는 핵산 염기 서열이 80% 이하만 같고 혈청학적으로도 교차반응이 낮으며, 현재까지 밝혀진 바에 따르면 이 바이러스는 막 태어난 돼지가 앞뒤로 격렬하게 떠는 선천성 진전증 이외의 다른 어떤 질병과도 연관성이 없는 것으로 보고되고 있으며 PCV-II가 PMWS의 일차적인 원인으로 알려져 있다 (Dulac 과 Afshar, 1989; Hamel 등, 1998; Ellis 등, 1998).

PMWS는 대체적으로 4~14주령의 돼지에서 발생하며, 주로 이유 후 2~3주 또는 생후 5~6주에 다발하는 편이고 드물게 포유자돈에서 발생하는 경우도 있다. 이환율과 폐사율은 농장마다 다양하며 이유자돈에서 이환율은 낮은 편이지만 임상증상을 보인 경우에는 폐사율이 약 10~50%까지 높게 나타나기도 한다 (Harding, 1997; Meehan 등, 1998; Allan 과 Ellis, 2000).

최근들어 캐나다를 시점으로 아일랜드, 스페인, 프랑스 그리고 미국의 돼지들에게 PMWS와 유사한 증상이 보고되었고, 동양에서는 우리 나라를 비롯한 대만과 일본에서 발생이 확인되고 있다 (Onuki 등, 1999; Choi 와 Chae, 2000).

PMWS의 주요 임상증상은 육안적으로 점진적인 체중감소, 심한 호흡곤란, 또는 기침을 하다가 갑자기 폐사하고, 사료섭취 저하로 인해 현저하게 위축되어 털이 매우 거칠며, 등뼈 또는 갈비뼈가 외부로 노출되어 있다. 피부는 창백하거나, 담황색 또는 녹황색의 수양성 설사, 피부의 청색증, 황달 및 신경증상을 보이기도 한다. 부검시 가장 두드러진 병변은 전신 림프절이 유백색조를 띠고 정상 크기의 3~4배 정도로 커지는데, 특히 방광 옆에 있는 서혜부 림프절에서 이런 소견이 자주 관찰되며 때로는 이것을 축지할 수 있으며, 암적색조로 발적된 허탈(collaps)이 이루어지지 않는 폐장, 황색 반점의 위축된 간장, 장벽이 얇고 수양내용물이 있는 장을 볼 수 있

다. 조직학적으로는 림프구의 감소와 간장의 조직구성 침윤, 간질성 폐렴과 신염이 관찰된다.

PCV 진단방법은 바이러스 분리와 항원 검출에 의한 방법이 있다. 바이러스 분리를 위해서는 PCV-I에 감염이 안된 free PK-15 세포가 필요하고 보통 2~3대 계대할 필요가 있으며, 세포변성(CPE)을 일으키지 않으므로 다른 바이러스들과 감별하여 동정한다. 항원 검사법으로는 조직내 교잡법(in situ hybridization; ISH), 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 면역조직화학(immunohistochemical technique; IHC) 등이 있으며, 항체 검사법으로는 간접형광항체법(indirect immunofluorescent antibody test; IFA), 효소면역법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) 등이 있다.

제주도는 양돈산업에 좋은 지리적 조건과 환경을 가지고 있으며 돼지콜레라와 구제역 청정화 이후 치명적인 질병은 발생되지 않고 있다. 그러나 증가 추세에 있는 외국 축산물의 수입과 매년 발생하는 황사 등으로 항시 외래성 질병 발생이 우려되며, 제주지역에서도 PMWS와 유사한 증상의 질병이 자돈에서 발병함에 따라 역학적인 원인체 규명이 필요하게 되었다.

본 연구의 목적은 도내 양돈장 돼지의 썬코 바이러스에 대한 항체 양성을 조사하고 제주 지역에서 PMWS로 의심되어 부검 의뢰된 가검물을 중심으로 PCV 감염 실태와 그 type을 확인하며, 이 지역에서 PCV의 항체 조사와 바이러스 분리를 통한 가축질병 관리의 기초자료와 최근 빈발하고 있는 이유자돈 폐사의 원인이 PMWS와 관련이 있는지에 대해 밝힘으로서 이에 대한 적절한 방역대책을 세우기 위해 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

국립수의과학검역원에서 분양 받은 PK-15 세포를 이용하여 바이러스 분리 및 증식, 간접형광항체법(IFA), 중합효소연쇄반응(PCR), 면역조직화학(IHC)의 실험에 사용하였다. PK-15 세포는 10% 우태아 혈청(FBS, Gibco, USA)이 첨가된 α -Minimal Essential Medium(α -MEM, Gibco, USA)을 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 배양하였다.

2. PCV에 대한 혈청 항체가 조사

1) 실험재료



2000년 6월부터 2001년 5월 사이 제주지역 10개 양돈장에서 사육중인 모든, 비육돈, 육성돈, 이유자돈(포유자돈 포함) 각 50두씩 총 200두의 혈청을 대상으로 하였으며 공시동물의 혈액은 무균적으로 채혈하여 3,000rpm에서 10~20분간 원심분리한 후 혈청을 분리하였고, 효소와 보체의 활성을 막기 위해 56°C에서 30분간 비동화 시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 혈청항체검사

PCV에 대한 항체검출을 위하여 근본적으로 PCV-I이 감염되어 있는 PK-15 세포주를 사용하였으며 간접형광항체법(IFA)을 위한 바이러스 접종 plate 제작 및 검사방법은 Tisher (1995) 등의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 세포배양용 96-well strip microplate(Costar, NY, USA)에 PK-15 세포 100 μ l/well을 분주하여 5% CO₂ incubator에서 monolayer가 형성될 때까지

배양한 다음 Hank's buffer salt solution(HBSS, Sigma)로 300mM glucosamine을 만들어 각 well 당 50 μ l을 가한 후 30분간 처리하였고, HBSS를 제거한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 세척한 후 α -MEM을 각 well에 다시 적당량 채워 24시간 이상 배양하였다. 그런 다음 80% cold acetone을 각 well에 100 μ l씩 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 고정시키고 아세톤을 제거한 후 PBS로 5회 세척한 다음 호일에 감아 -20 $^{\circ}$ C 이하에서 보관하였다. 이렇게 제작한 plate는 혈청내의 항체유무 확인실험에 사용하였으며 실험방법은 다음과 같다.

PBS로 10배 희석한 가검혈청 100 μ l를 IFA용 plate의 각 well에 첨가하였다. 양성대조혈청 및 음성대조혈청 역시 100 μ l씩 접종한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 plate는 PBS를 well당 300 μ l씩 첨가하여 5회 세척한 후 200배로 희석한 anti-swine IgG(whole molecule) FITC conjugate(Sigma, F1638, Lot 110K4886) 용액을 각 well에 50 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS를 각 well에 300 μ l씩 첨가하여 5회 세척한 다음 용액을 완전히 제거한 후 형광항체현미경(IX 70 Olympus, Japan)을 이용하여 판독하였다.

3. 바이러스 분리 및 동정

1) 재료

부검 후 실질장기(췌장, 임파, 편도, 폐, 간, 비장, 신장)를 1mM Na-pyruvate, 2mM L-glutamine, 100 U penicillin-100mg streptomycin을 첨가한 10% α -MEM에 넣고 균질화 시킨 후 5,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리 후 상층액을 0.45 μ m syringe filter(millipore membrane filter)를 사용하여 여과한 후 접종액으로 사용하였다.

2) 바이러스 분리

PK-15 세포는 96 well microplate에 100 μ l/well 분주하여 배양하거나 세

포배양용 75-cm² flasks에 배양하였다. 단층이 형성된 PK-15 세포에 일정량의 조직 유제액을 접종하여 3일 후 -70℃에 냉동하였다. 3회에 걸쳐 동결과 용해를 반복하여 녹인 상층액을 1,500rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리하고 3회 계대 접종하였다.

3) 면역조직학적 검사(IHC)

포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매한 실질장기 조직을 3~5 μ m 두께로 절편하여 일반적인 방법에 따라 Hematoxylin-Eosin(H&E)염색을 시행하였다.

면역조직학적 검사를 위하여 조직절편에서 파라핀을 제거한 후 내인성 인자를 제거하기 위해 0.3% 과산화수소가 포함된 증류수에 20분간 반응시켰으며, Histostain-Plus kit (Zymed, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 전반적인 염색을 실시하였다. 1차 항체로는 PCV-II형에 대한 토끼 항혈청 (1 : 2000, 대상미생물연구소)으로 37℃에서 60분간 반응시켰으며, 순서대로 biotinylated anti-rabbit IgG로 반응 후 avidin-biotin complex reagent를 처리하고 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride(DAB, 0.5mg/ml [Zymed, San Francisco, CA, USA])로 발색시켰다. 그리고 Mayer's Hematoxylin으로 대조염색하여 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입 후 광학현미경(CK-2 Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) Immunocytochemical staining

분리된 바이러스를 동정하기 위하여 6-well plate(Costar, NY, USA)에 넣은 coverslip 위에 PCV free PK-15 세포를 배양하여 세포단층이 형성되면 분리한 바이러스를 감염시켜 37℃에서 24시간 배양한 후 PBS로 3회 세척하고 80% cold acetone으로 15분간 고정하였다. blocking buffer 100 μ l를 넣고 10분간 incubation한 다음 이를 제거하고 1차 항체인 PCV-II형에 대한

토끼 항혈청(1 : 2000; 대상미생물연구소)을 첨가한 후 60분간 반응시켰다. PBS로 5회 세척 후, biotinylated anti-rabbit IgG로 반응시킨 다음 avidin-biotin complex reagent를 처리하고 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, 0.5mg/ml [Zymed, San Francisco, CA, USA])로 발색시킨 후 광학 현미경(CK-2 Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

5) PCR을 이용한 바이러스의 동정

DNA 바이러스인 PCV의 특이 유전자를 검출하기 위해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 실시하였다.

(1) 바이러스 DNA추출:

실질장기는 10% Antibiotic-antimycotic(Gibco, USA)이 첨가된 α -MEM에 넣고 균질화 시킨 후 상층액을 QIAamp[®] DNA mini kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 약술하면 시료 200 μ l에 proteinase K 20 μ l와 분주하고 Buffer ATL 200 μ l를 15초 동안 혼합한 다음 56 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하였다. 100% cold ethanol 200 μ l를 넣고 15초 동안 혼합 후 QIAamp spin column에 옮긴 다음 8,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 다시 Buffer AW-I 500 μ l를 첨가한 후 8,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. Buffer AW-II 500 μ l를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm에 3분간 원심분리 다음 DW 200 μ l를 첨가하여 8,000rpm에서 1분간 원심 분리 후 여과물을 1.5ml ependorf tube에 넣고 5분간 끓인 다음 4 $^{\circ}$ C에 정치하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

(2) Oligonucleotide primer 합성

PCR primers는 Larochelle 등(1999)이 보고한 DNA sequences (Gibco BRL)에 따라서 제작하였다.

Primer	Nucleotides sequence	Expected PCR product size
CF8	5' TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT 3'	263bp (PCV - II형)
CR8	5' CCGCACCTTCGGATATACTG 3'	
PF2	5' TTGCTGAGCCTAGCGACACC 3'	349bp (PCV - I형)
PR2	5' TCCACTGCTTCAAATCGGCC 3'	

(3) Multiplex PCR

가. 반응조건

PCV virus를 증폭하기 위한 PCR조건은 PCR 반응액의 최종용량이 50 μ l 되도록 하였다. 즉, PCR용 DNA Premix tube(BIONEER, Taq DNA polymerase 2.5U, dNTP 0.25mM, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), KCl 40mM, MgCl₂ 1.5mM)에 DEPC(diethyl pyro-carbonate) 43 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, 추출 DNA 5 μ l를 넣고 GeneAmp PCR System (Perkin-Elmer)을 이용하여 PCR를 실시하였다. PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 65 $^{\circ}$ C에서 1분간 primer annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 35회 반복하는 조건으로 수행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 extension을 실시하여 PCV 특이 유전자의 증폭을 시도하였다.

나. PCR products의 확인

PCR 증폭 산물 10 μ l를 1 μ l gel loading buffer와 혼합한 다음 2% agarose gel상에서 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA. pH 8.0)를 사용하여 100V에서 30분간 전기영동을 실시하고 ethidium bromide(EtBr)로 염색하였다. 증폭 산물의 크기를 확인하기 위해 100bp DNA Ladder(Gibco)를 molecular size marker로 사용하였고 전기영동 후 UV transilluminator로 PCV virus에 대한 특이적 band를 확인하였다.



III. 결 과

1. 임상 소견 및 부검소견

육안 소견은 일반적으로 위축, 피모 거침, 쇠약 등 다양하였으며 경우에 따라 PMWS에 대한 특이 소견이 없었다. 부검시 흔히 림프절(서혜부, 악하, 폐문, 장간막)의 종대를 볼 수 있었으며, 미만성 암적색 폐가 주로 관찰되었고 일부 폐장에서는 전복측 경화와 흉벽 유착 등이 보였다. 심한 경우는 다량의 흉수, 섬유소성 심낭염을 동반하고 있었다. 임상 및 부검 소견은 Table 1과 같다.

Table 1. Clinical signs and lesions of 25 pigs collected from 13 farms to be used. "Average age = 8 weeks old".

Parameters	No. tested(N=25)	No.(%)
<i>Clinical signs</i>		
Pale (Skin)	16	64
Weight loss (emaciation)	23	92
Jaundice	8	32
Respiratory signs (tachypnea, dyspnea)	15	60
Diarrhea	7	28
<i>Gross lesions</i>		
Enlarged and pale		
- inguinal lymph nodes	21	84
- mesenteric lymph nodes	23	92
- broncho-tracheal	14	56
Interstitial pneumonia	20	80
Pulmonary interlobular edema	14	56
Pleurisy	12	48
Pericarditis	13	52
Edema of colon	15	60
Dilatation & watery contents of Caecum	17	68
Spleen (Enlarged)	14	56
White foci and/or pale, enlargement of kidney	21	84

2. IFA를 이용한 항체 분포 조사

제주지역 10개 양돈농가에 대한 혈청항체검사 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 모돈, 비육돈, 육성돈, 이유돈에서 각각 24%, 16%, 30%, 34%의 양성율을 나타냈으며, 연령이 낮은 이유돈에서 가장 높은 양성율을 나타냈다.

Table 2. Distributions of antibodies to PCV following IFA

Ages group	No. of pigs examined	No. of positive	No.(%)
Sow	50	12	24
Fattening pig	50	8	16
Grower pig	50	15	30
Weaned pig	50	17	34
Total	200	52	26

3. Porcine circovirus 바이러스 분리 및 동정

1) 바이러스 분리

PCR확인 결과 양성으로 판정된 2개 농장 자돈의 림프 조직으로부터 2주의 바이러스를 분리하여 PCV free PK-15 세포에 접종한 다음 CPE를 보이지 않으므로 접종 3~4일 후 3회에 걸쳐 동결과 용해를 반복한 녹인 상층액의 DNA를 추출하여 PCR로 확인한 결과 항원 양성을 나타냈으며 면역세포화학염색에서도 PCR 결과와 일치함을 보여주었다.

2) 면역조직화학(IHC)을 이용한 바이러스 동정

PMWS로 의심되는 일반적인 조직학적 소견인 신장에서 간질성 신염의 국소적 단핵구 침윤과 신세관의 괴사가 관찰되었고, 폐 조직에서는 간질성

화농성 폐렴과 폐포 증격에서의 단핵구 침윤이 관찰되었다. 간에서는 괴사와 출혈소견을 보였으며, 림프조직에서는 림프구의 소실, 조직구 침윤과 합포체 형성 등이 관찰되었다.

PCV-II형 항원에 대한 면역조직학적 염색 결과 편도에서 많은 항원양성을 확인하였고, 소장 용모에서도 양성세포가 확인되었다(Fig. 1).

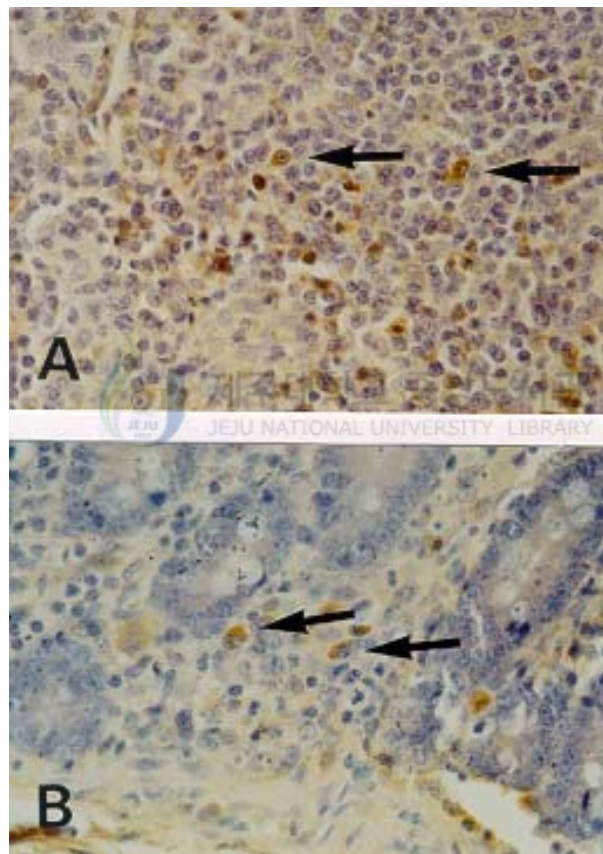


Fig. 1. Immunohistochemical detection of PCV-II in tonsil(A), small intestine(B). There is intense labeling of PCV-II antigen (arrows). Optimized Immunohistochemical technique: x 300. Counterstained with hematoxylin.

3) Immunocytochemical staining을 이용한 바이러스 동정

분리된 바이러스 유제액을 PCV free PK-15 세포에 감염시킨 결과 짙은 갈색으로 염색된 많은 수의 양성 세포를 볼 수 있었다(Fig. 2).

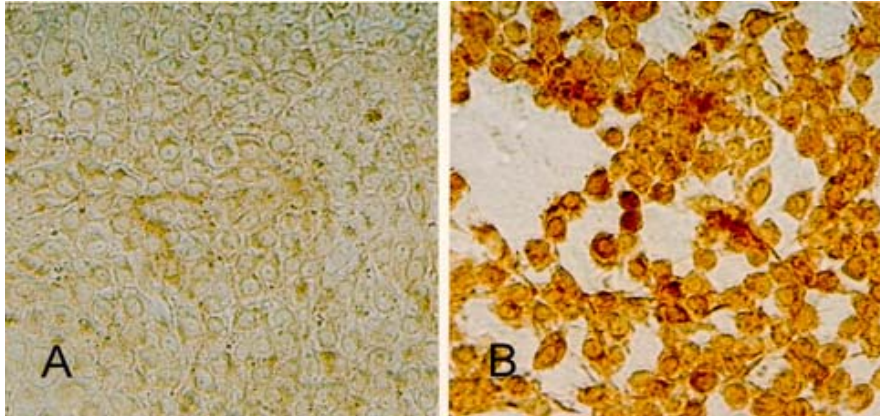


Fig. 2. Immunocytochemical staining of cells in microplates, the tissue culture. PCV free PK-15 cells (A), PCV free PK-15 cells infected with the PCV-II (B)

4) Multiplex PCR을 이용한 바이러스 동정

PMWS로 의심되어 부검한 실질장기의 조직유제액에서 DNA를 추출한 다음 PCR을 실시한 결과 총 13두 중 11 sample에서 PCV-II형의 band(263bp)가 확인되었으며(Fig. 3), PCV free PK-15 세포에서 배양한 분리바이러스의 배양상층액과 PCV free PK-15 세포, PCV-I persistently-infected PK-15 세포를 PCR한 결과 각각의 특이 band를 확인하였다(Fig. 4).

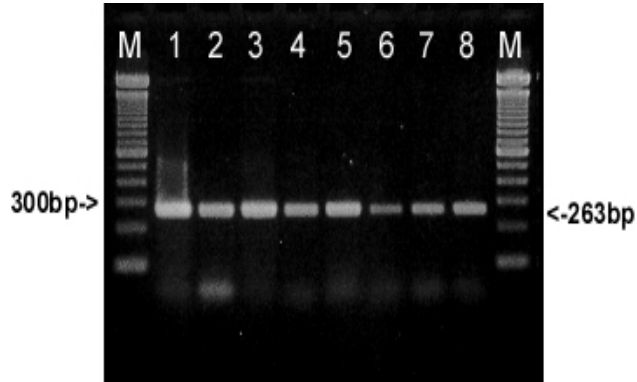


Fig. 3. PCR product from several tissue homogenate of a PMWS field case. Lane M: 100bp DNA Ladder; lane 1: pancreas; lane 2: inguinal lymph node; lane 3: tonsils; lane 4: lungs; lane 5: liver; lane 6: spleen; lane 7: kidney; lane 8: positive control. 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

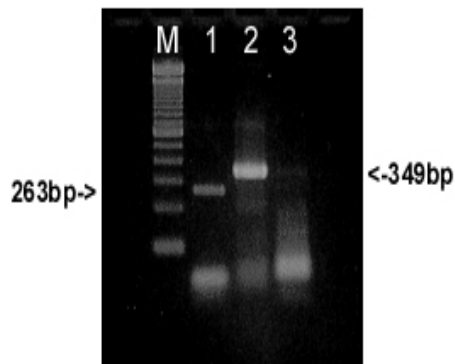


Fig. 4. Specificity of the PCR for the differentiation of PCV-II and I. Lane M: 100bp DNA ladder; lane 1: lysate of PCV free PK-15 cells infected with the PCV-II isolate (263bp product); lane 2: lysate of PCV-I persistently-infected PK 15 cells (349bp product); lane 3: lysate of PCV free PK-15 cells)

IV. 고 찰

이유 후 전신소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) 1980년대 후반과 1990년대 초 북미와 유럽의 양돈산업에 막대한 피해를 끼친 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)이후 새롭게 등장했으며, 질병으로서 처음 인정된 (Harding, 1997)후 경제적으로 중요한 세계적 질병으로 빠르게 인식되고 있으며 현재까지 PMWS에 대한 정확한 치료 및 예방방법은 알려진 것이 없다.

PMWS에 관여하는 병원체들 중 바이러스성 질병으로는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV), 돼지 파보바이러스(PPV), 돼지 인플루엔자 바이러스(SIV), 돼지 엔테로바이러스(PEV), 세균성으로는 유행성 폐렴균 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 등이 함께 감염되는 예가 많은 것으로 알려져 있으나 (Madec 등, 2000) 여러 실험적인 보고 (Balasch 등, 1999)에 따르면 PCV(type-II)가 PMWS와 선천성 진전증(Congenital tremor)에 가장 중요한 원인체임에 틀림없다.

본 실험의 항체조사에서 PCV에 대한 혈청양성반응을 보인 것이 약 26% 였는데 이는 다른 여러나라의 조사결과 (Horner, 1991; Edward 와 Sands, 1994; Tischer 등, 1995)보다는 낮은 비율이고 국내 충청북도 (강 등, 2001)의 양성율인 20%와 비슷한 수치를 보였다. 항체조사 결과로 보아 제주도의 돼지들도 PCV에 이미 상당히 감염되어 있는 것으로 사료된다.

전체적으로 이유돈과 육성돈에서 높은 양성율을 보이는 이유는 모돈에서 이행된 항체로 인해 포유자돈에서 양성비율이 높아지다가 모체이행항체가 소실되는 시점인 생후 6~8주의 이유자돈에서 다시 PCV-II나 PRRSV가 복합감염되어 PMWS를 유발하는 것으로 추정된다.

몇몇 논문에서 PCR 확인결과 PMWS 증상을 나타내는 돼지의 약 50%가 PCV-II형과 돼지 생식기호흡기증후군 바이러스(PRRSV)가 혼합 감염되

어 있다는 것이 보고 (Mardassi 등, 1994)되었으며 결과에 제시하지는 않았으나 실제로 본 연구에 사용된 혈청으로 가지고 ELISA 실험한 결과 60% (15 of 25)가 PRRSV 항체 양성을 나타냈다. 즉 PCV는 단독 감염도 가능하지만 원발성 또는 후발성으로 다른 바이러스와 혼합 감염된 후 성장에 더욱 장애를 초래하는 것으로 생각된다.

최근 밝혀진 중요한 사실은 미국과 캐나다의 돼지 농장에 대한 혈청학적 검사를 실시한 결과 PCV-II에 감염되어 있더라도 임상증상을 나타내지 않는 경우가 많기 때문에 단지 PCV-II 감염이 PMWS가 아니라는 점이며, 또한 혈청학적검사 양성인 PCV-II 감염을 의미하지는 않는 만큼 일반적으로 빠르고 정확한 PCR를 거쳐 type확인, 최종적으로 바이러스 분리 및 IFA를 통한 진단이 뒤따라야겠으며, 무엇보다 PCV-II형 감염 진단의 혈청학적 검사 기법 개발이 중요하다고 여겨진다.

PCR 결과 13두 중 11두에서 PCV-II형(263 bp)의 감염이 확인되었으며, PCV-I형에 대한 특이 band(349 bp)는 확인할 수 없는 것으로 보아 제주지역에서 발생하고 있는 PMWS의 원인체는 PCV-II형이며 제주 지역에서도 PCV가 자돈의 성장에 문제가 될 수 있음을 확인 할 수 있었다. 무엇보다 1999년에 샘플링되어 포르말린에 고정된 조직에서도 쉽게 DNA를 추출하여 PCR 진단에 사용할 수 있었고 PCV-II형 항원이 검출되는 것으로 보아 PMWS가 우리나라에 알려지기 전에 수입된 종돈으로부터 생산된 돼지들이 이미 상당수 감염이 된 것으로 생각되며, 실제 사육 자돈에서 PMWS와 관련하여 PCV-II형이 주 병인체임을 알 수 있었고 모든 실질장기에서 항원 확인이 가능하였다. 특히 편도, 폐, 간에서 PCV-II형 항원이 잘 확인되었으며, 이와 같은 소견으로 보아 림프계통은 이 질병의 조기진단에 중요한 부위이며 특히 다른 어떤 장기보다 편도는 여러 항원진단에 유용한 검사부위로 생각된다.

PMWS에는 바이러스와 세균들이 서로 복잡하게 관련되어 있기 때문에 특정 병원체에 대한 치료 및 예방대책은 큰 효과를 거두기 어렵다. 따라서

사육밀도를 낮추고, 엄격한 올인올아웃(all-in-all-out)을 적용하되 돈방 단위보다는 돈사나 농장단위가 좋으며 적절한 소독약을 사용하여 배치 사이의 엄격한 차단방역을 시행하고, 출처가 다른 돼지들을 합사하거나 일령이 다른 돼지들을 같은 공간(one air-space)에 두지말며 환경적인 스트레스 요인 제거 등 사양관리의 개선과 외부로부터 질병의 원인체가 농장내로 들어오지 못하게 하는 차단방역이 가장 중요하다 하겠다. 그리고 기본적인 질병에 대한 예방접종은 반드시 지켜져야 한다.

향후, 세계적으로 청정한 제주 양돈 산업의 미래와 구제역 이후 많은 어려움에 처해있는 국내 축산업의 경쟁력 확보를 위하여 PCV에 대한 국가적 차원의 체계적인 연구가 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.



V. 결 론

제주도에서 돼지 썬코바이러스(porcine circovirus)에 대하여 간접형광항체법(IFA)을 이용한 혈청검사 및 원인체 분리 동정을 위해 면역조직화학(IHC), 중합효소연쇄반응(PCR)을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 일반적 육안 소견인 위축, 피모 거침, 쇠약 등을 볼 수 있었으며, 부검 시 PMWS의 전형적인 증상인 림프절(서혜부, 악하, 폐문, 장간막)의 종대와 미만성 압적색 폐가 관찰되었고, PCV-II형 항원에 대한 면역조직화학적 염색 결과 편도와 소장 용모에서 많은 항원양성세포를 확인하였다.

2. 혈청검사 결과 총 200두 중 52두(26%)에서 항체양성을 나타냈으며 연령별 항체양성율은 이유돈(34%), 육성돈(30%), 모돈(24%), 비육돈(16%)이었으며 이유돈과 육성돈에서 양성율이 높았다.

3. PMWS 임상증상을 보이는 2두의 림프 조직에서 PCV를 분리하고 세포배양을 통하여 분리한 2주의 바이러스를 동정하기 위해 면역세포화학염색(Immunocytochemical staining), PCR 결과 PCV-II를 확인할 수 있었다.

4. Multiplex PCR 결과 총 13두 중 11 두에서 263bp로 증폭된 항원이 확인됨으로써 PCV-II만이 관내 양돈농가에 존재함을 알 수 있었으며, 1999년 조직에서도 항원이 검출되는 것으로 봐서 이미 1999년 이전에 PCV가 제주도에 들어와 널리 퍼져있는 것으로 보여진다.

제주도내 13개 양돈장에서 부검 의뢰된 4~14주령의 자돈 중 PMWS 증상이 의심되는 13두와, 10개 농장 200두의 혈청에 대한 PCV 확인결과 52두(26%)에서 항체양성을 나타냈으며, PCV-II형의 특이 band(263bp)와 면역 염색결과 PCV-II형 항원이 확인됨으로서 제주도내 양돈장에서 성장장애와 폐사를 보이는 어린자돈 중 일부는 PMWS가 확실시되며 원인체는 PCV-II형임을 확인할 수 있었다.



VI. 참고 문헌

Allan, G.M., Phenix, K.V., Todd, D., et al. 1994. Some biological and physicochemical properties from different species with pig circovirus. *Vet. Microbiol.* 41, 267-279.

Allan, G.M., McNeilly, F., Cassidy, J.P., et al. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus-experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Vet. Microbiol.* 44, 49-64.

Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., et al. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Invest.* 10, 3-10.

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

Balash, M., Segales, J., Rosell, C., et al. 1999. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 12, 139-148.

Choi, C., Chae, C., 1999. In situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 121, 265-270.

Choi, C., 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.

Clark, E.G., 1997. Postweaning multisystemic wasting. *Proc. Am. Assoc. Swine. Pract.* 499-501.

Dulac, G.C., 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.

Edward, S., Sands, J.J., 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet. Rec.* 134, 680-681.



Ellis, J., Hassard, L., Clark, E., et al. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 39, 44-51.

Hamel, A.L., Lin, L.L., Nayar, G.P.S., 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 72, 5262-5267.

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

Harding, J.C., 1997. Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation, p. 503. In Proceedings of American Association of Swine Practitioners. American Association of Swine Practitioners, Quebec City, Canada.

Horner, G., 1991. Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. *Surveil Wellington*, 54, 255-258.

Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., et al. 2000. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 122, 19-24.

Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M., Magar, R., 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol.* 80, 69-75.

Lukert, P., de Boer, G.F., Dale, J.L., et al. 1995. Circoviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, et al. (Eds). *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses.* Springer. Wien. New York, 166-168 (Arch Virol [suppl] 10).

Madec, E., Evenoa, P., Morvana, L., et al. 2000. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in France: Clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock. Prod. Sci.* 63, 223-233.

- Magar, R., Larochelle, R., Thibault, S., et al. 2000. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: A sequential study. *J. Comp. Pathol.* 123, 258-269.
- Mankertz, A., Domingob, M., Folchc, J.M., et al. 2000. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus. Res.* 66, 65-77.
- Mardassi, H.R., Athanassious, S., Mounir., Dea. S., 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Quebec isolates associated to acute and chronic outbreaks of PRRS. *Can. J. Vet. Res.* 58, 55-64.
- Meehan, B.M., McNeilly, F., Todd, D., et al. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.* 79, 2171-2179.
- Nayar, G.P., Hamel, A., Lin, L., 1997. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can. Vet. J.* 38, 385-389.
- Nishizawa, T.H., Okamoto, K., Konishi, H., Yoshizawa, Y., Miyakawa, and Mayumi, M., 1997. A novel DNA virus(TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 92-97.

Onuki, A., Abe, K., Togashi, K., et al. 1999. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet.* 61, 1119-1123.

Ouardani, M., Wilson, L., Jette, R., Montpetit, C., Dea, S., 1999. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3917-3924.

Rosell, C., Segales, J., Plana-Duran, J., et al. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Comp. Pathol.* 120, 59-78.

Straw, B.E., Allaire, S.D., Mengeling, W.L., Taylor, D.J., 1999. *Disease of swine*. 8th. ed. Iowa State University Press, 119-124.

Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., et al. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature.* 295, 64-66.

Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., et al. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 91, 271-276.

Tischer, I., Bode, L., Peters, D., et al. 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 140, 737-743.

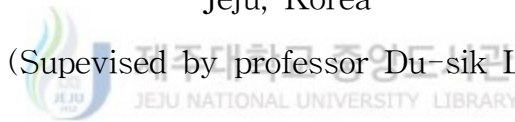
강신석., 박재명., 이종진., 류재윤., 최해연., 2001. Porcine circovirus에 대한 항체가 조사 및 바이러스 항원 확인. *Kor. J. Vet. Serv.* 24, 127-132.

Isolation and Identification of Circoviruses from Pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in Jeju

Kyong-ju Jeong

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Jeju, Korea

(Supervised by professor Du-sik Lee)



Abstract

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), an apparently new disease, is characterized by progressive weight loss, dyspnea, diarrhea, jaundice, lymph node enlargement, and interstitial pneumonia.

This new disease is occurred by pathogenic porcine circovirus type-II (PCV-II), a variant strain of non-pathogenic porcine circovirus type-I (PCV-I), which is first isolated from porcine kidney (PK) cell lines.

In this study, detection of PCV antigen and serum antibody was attempted to investigate the presence of PCV-infected pig in Jeju.

PCV-II antigen was determined from various organs of total 13 field cases, including 12 collected in 2001 and one in 1999, using

immunohistochemical technique (IHC) and multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Antibody to PCV was detected by indirect immunofluorescent antibody test (IFA) in PK-15 cell line culture infected naturally with PCV-I from 200 healthy pigs.

The results indicated that 1) antibodies against PCV were found in 26% of serum samples tested, 2) PCV-II antigen was detected by IHC in macrophage-like cells in the tonsils, livers, lymph nodes and small intestines, 3) PMWS has already present since 1999, and 4) PCV-II appears to be the main PCV type which is circulating in Jeju pig population because only PCV-II antigen was present in 11 (85%) of 13 pigs.

Key words: porcine circovirus, immunohistochemical technique(IHC), multiflex polymerase chain reaction(mPCR), indirect immunofluorescent antibody test(IFA)