

돼지 뇌심근염 바이러스의 분리 배양

하용공* · 윤석민* · 정병탁* · 박남용 · 이봉주 · 정치영 · 기혜영 · 배성열
중앙 가축 전염병 연구소* · 전남대학교 수의과 대학
(1991. 9. 5 접수)

Isolation and cultivation of swine encephalomyocarditis virus

Yong-kong Ha,* Seok-min Yoon,* Byung-tack Jung* Nam-yong Park,
Bong-ju Lee, Chi-young Chung, Hye-young Kee, Seong-yeol Bae
Choong Ang Animal Disease Laboratory*
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University
(Received Sep. 5, 1991)

Abstract: Encephalomyocarditis(EMC) virus was isolated from the mummified and stillborn pigs at a swine farm in Chonnam Province, experienced with EMC infection over the period Oct.~Dec. of 1989. In addition some cultural, serological properties of the isolates and experimental infections in the piglets were studied.

The results obtained were as follows;

1. Two EMC virus strains with HA titers and CPE similar to EMC-ATCC were established in a baby hamster kidney (BHK)-21 cell line by inoculating homogenates of brain and heart of the 19 mummified or stillborn pigs and designated K₃ and K₁₁.
2. At the second BHK-21 cell line passage of the initial isolates CPE appeared after incubation for 16~18 hours, while at the fourth and fifth passage the highest titer of HA was recorded, titer of HA using rat and guinea pig erythrocytes.
3. One pig inoculated with the isolate K₃ showed dyspnea as clinical signs and died at the 10 days after inoculation at necropsy white necrotic foci were observed from the dead animal heart.
4. Although all the rest surviving pigs showed increases in antibody titer and body temperature of 40°C above for the initial 2~4 days followed by the return to normal, there were no gross lesions when the animals were sacrificed at the 2 weeks after inoculation.

Key words:

서 론

돼지 뇌심근염(Encephalomyocarditis: EMC) 바이러스 감염증은 picornavirus과인 cardiovirus에 의해 발병되는 질병¹으로 파나마에서 1958년 Murnane등²이 본 질병의 발생을 바이러스 분리와 함께 최초 보고한 바 있다.

뇌심근염 바이러스(EMCV)의 최초 분리는 영장류에

서 1945년 Helwing과 Schmidt⁶에 의해 이루어졌으며 그 후 Craighead⁷는 이 바이러스를 2개의 변이주 즉 뇌친화성인 E 변이주와 심장친화성인 M 변이주로 구분하였다. 그 후 Acland와 Littlejohns⁸는 fetal mouse fibroblast(FMF) 세포에서, Horner와 Hunter⁹는 pig kidney(PS) 세포에서 분리 배양하였으며 미국에서 최근 김과 주등¹⁰은 유산 및 사산태아의 뇌와 심장에서 분리했으며 baby hamster kidney 세포에서 증식이 잘

된다고 하였다.

본 질병은 신생자돈의 높은 폐사율과 유산, 사산, 조산 및 미이라화등으로 분만률 감소와 함께 심한 생산성 저해를 일으키는 질병중의 하나로 양돈산업에 막대한 경제적 손실을 주면서 세계적으로 전파되어가는 질병이다.^{3-5,11,12} 본 질환에 대해서 바이러스 분리와 함께 발병이 확인된 나라로는 미국^{4,11,13}, 캐나다¹⁴, 호주^{3,8,12}, 뉴질랜드¹⁵, 남아프리카¹⁶ 및 큐마¹⁷ 등이며 특히 미국의 주 등^{10,13,18}은 바이러스를 최근에 분리하였으며 국내에서도 박동¹⁹은 본 질병의 발병을 1989년 가을에 확인하고 이를 국내 최초 보고한 바 있다.

본 연구는 1989년 10월~12월 도내 모양돈장에서 최초 확인된 EMC 질환 증례의 병원체를 분리하고 분리된 바이러스를 자돈에 실험적종하여 그 성상을 조사할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

주화세포(cell line) 배양 : 바이러스의 증식을 위해 사용된 주화세포는 baby hamster kidney cell line-21(BHK-21)를 사용하였다. 배지는 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco, USA)에 fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)을 증식배지에는 5%, 그리고 유지배지에는 1%되게 하였고 배지 1ml당 streptomycin 100 μ g, penicillin 100IU, kanamycin 100 μ g을 넣고 배지의 pH는 중조를 사용하여 7.4로 맞추었다. BHK-21세포를 증식배지에 부유시켜 세포수가 배지 1ml에 10만개씩 되도록 조절한 다음 24-well microplate에 1ml씩 분주하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하여 단층(monolayer)이 완전히 형성되면 유지배지로 교환하여 배양 하였다.

바이러스 분리 : 19예의 미이라화돈과 사산돈의 심장 및 뇌를 유체하여 항생제(streptomycin, penicillin, kanamycin)가 함유된 EMEM 배지에 부유시켜 -80°C 초저온 냉장고에서 동결 용해 한후 초원심분리기에서 20,000rpm으로 30분간 원심후 상청액을 수거하여 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

표준 균주는 American Type Culture Collection(ATCC)사에서 분양받았다.

바이러스 조직 배양 : BHK-21 세포에 단층이 완전히 형성된 후 시험재료를 세포에 0.1ml씩 접종하고 37°C CO₂배양기에서 2시간 흡착시켰다. 그 후 37°C로 가온된 PBS로 1회 세척한 후 유지배지로 교환하여 37°C CO₂배양기에서 배양하면서 매일 세포변성효과(cytopathic effect: CPE) 형성유무를 관찰하였다. 바이러스 접종후 CPE가 인정되지 않은 것은 세포와 배

양액을 채취하여 -80°C에서 3회 동결용해시키면서 blind passage하였다. 시험재료를 blind passage하면서 3대에서도 CPE가 인정되지 않는 것은 바이러스가 없는 것으로 간주하였다.

혈구 응집 반응 : Microplate는 밑면이 U자형인것을 사용하였고 항원과 혈구회색액으로 KCl-borate 완충액(3.728g H₃BO₃, 7.491g KCl, D.W. 1,000ml, pH 8.0)을 사용하였다. 적혈구는 기니픽, 랫드, 개, 닭에서 채취하여 동량의 Alsever용액에 넣어 응고를 방지한 다음 KCl-borate 완충액으로 1,000rpm에서 10분간 원심하여 3회 세척한 다음 최종 혈구농도는 0.6%되게 하였다.

혈구응집반응은 Craighead와 Shelokov²⁰ 방법에 준하였다. 즉 KCl-borate완충액을 각 well에 넣은 다음 0.1ml micropipette로 항원을 2배수 계단희석하고 동량의 혈구를 각 well에 넣고 micromixer를 이용하여 잘 섞은 다음, 실온에서 2시간 방치 후 판독하였다.

혈구응집 억제반응 : 혈구응집억제반응 역시 Craighead와 Shelokov²⁰ 방법에 준하여 실시하였는데 즉 U자형 microplate에 0.05ml씩 diluter로 취하여 2배수 계단희석 하였다. 이때 사용된 혈청은 56°C 함유수조에서 30분간 작용시킨 후 25% Kaolin 부유액에 혼합(serum : kaolin=1 : 3)하여 실온에서 한시간 방치시킨 후 3,000rpm에서 10분 원심 침전시켜 상청액을 4배 희석된 혈청으로 사용하였다.

항원은 8 HA unit가 함유되도록 하여 0.05ml씩 각 well에 놓고 잘 혼합하였다. 배양기에서 30분간 방치하여 항원항체가 작용토록한 다음 기니픽 혈구들 0.1ml씩 넣고 잘 섞은 후 실온에서 2시간 작용시켰다. HI가는 100% 혈구응집이 억제된 최종 혈청희석 배수의 역수를 표시하였다.

돼지감염시험 : 감염 시험에 사용된 돼지는 전남도내 여러 양돈장에서 분양받아 사용하였다. 21일령 돼지를 2마리씩 4개군으로 나누고 60~70일령 돼지는 1마리씩 3개군으로 나누어 ATCC사의 표준균주를 포함한 3주의 균주를 하퇴부 근육 깊숙히 접종하였다. 접종량은 2~3ml씩이었으며 바이러스는 직접 분리한 K₃, K₁₁균주와 ATCC표준 균주로 그 역가는 10^{7.5}TCID₅₀이었다. 매일 개체별로 오후 3시에 체온을 측정하고 임상증상 발현 유무를 검사하였다. 접종전에 혈액을 채취했으며 접종후 일주일 간격으로 혈액을 채취하여 혈청을 제조하고 HI검사로 항체가를 측정하였다.

결 과

1. EMCV의 분리 및 동정

바이러스의 분리: 가검물 19예의 심장과 뇌를 유제하여 BHK-21 cell line에 표 1과 같이 접종하였던 마 접종 후 2대째 미이라화와 사산태아 각 1두 즉 3번과 11번 시료에서 세포가 용해를 일으켜 대조군인 표준균주와 유사한 세포변성을 보였으며 혈구응집가를 나타내기 시작했다. 나머지 17개의 시료에서는 3대까지 blind passage를 실시하였으나 CPE 및 HA가 인정되지 않았다. 분리된 바이러스는 K₃와 K₁₁로 명명하였다(표 1).

분리 바이러스의 조직배양: 분리된 K₃ 및 K₁₁ 바이러스를 FBS(1%)가 함유되어 있는 EMEM배지에 형성된 BHK-21 cell line 단층에 0.1ml씩 첨가하여 배양시켰으나 1대에서는 CPE가 관찰되지 않고 2대 배양 16~18시간 후에 CPE가 80% 인정되었으며 K₃ 바이러스는 1대에서는 CPE가 관찰되지 않았고 2대에서부터 CPE가 관찰되었다. K₁₁ 바이러스는 1대에서 CPE가 나타나지 않았으나 2대에서부터 CPE가 나타났다(표 2).

분리 바이러스의 적혈구응집성 시험: 혈구응집가 1,024배의 분리 바이러스 K₃, K₁₁ 및 표준바이러스(ATCC)

의 적혈구응집성시험을 기니픽, 랫드, 개, 닭의 적혈구를 이용하여 Craighead와 Shelokov²⁰의 방법에 준하여 KCl-borate 완충액(pH 8.0)을 이용하여 U자형 microplate에서 실시하였다. 적혈구 농도는 0.6%로 조절하여 사용하였다. 그 결과 표 3에서와 같은 성적을 얻었다. 기니픽과 랫드의 혈구에서 1,024배의 응집가를 나타내어 최고의 역가를 보였으며 개에서는 16배, 닭에서는 전혀 응집되지 않았다.

2. 분리주 및 표준균주의 돼지에 대한 실험감염

돼지에 접종하기 전에 혈청을 분리하여 항체를 측정하였더니 11마리의 돼지중에서 2마리를 제외하고는 모두 항체를 나타냈다. 분리 바이러스 및 표준균주의 접종시험한 결과는 표 4와 같다.

K₃ 분리 바이러스: 접종후 3일째에 체온 40.0°C에 이르렀으나 그 후로 점차 정상체온을 되찾았으며 접종후 10일째에 21일령 1마리가 체온이 상승하면서 침울, 호흡곤란, 식욕부진등의 증상을 보이다 폐사하였다. 항체는 접종 후 약간 상승하였으나 폐사된 K₃를 접종한 예의 경우는 폐사직전에 상당히 높은 항체를 보

Table 1. Result of EMCV isolation from heart and brain tissue of the mummified or still born fetuses in the BHK-21 cell culture

Sample No.	Fetus tested	Virus isolation attempts			Designation
		1st passage	2nd passage	3rd passage	
1	S B (31)*	—	—	—	
2	S B (24)	—	—	—	
3	M (27)	—	+	+	K ₃
4	M (31)	—	—	—	
5	S B (31)	—	—	—	
6	S B (31)	—	—	—	
7	S B (24)	—	—	—	
8	S B (23)	—	—	—	
9	S B (22)	—	—	—	
10	M (24)	—	—	—	
11	S B (31)	—	+	+	K ₁₁
12	S B (22)	—	—	—	
13	S B (26)	—	—	—	
14	S B (25)	—	—	—	
15	S B (31)	—	—	—	
16	S B (18)	—	—	—	
17	S B (24)	—	—	—	
18	S B (31)	—	—	—	
19	S B (30)	—	—	—	

—: No CPE, +: CPE observed. *: Crown-rump length, (cm). M: mummification. SB: stillbirth.

Table 2. HA activity of EMCV isolated and passaged in BHK-21 cell

Virus	Passage				
	BHK-21 cell line passage				
	1st	2nd	3rd	4th	5th
K ₃	None*	32×**	512×	1,024×	1,024×
K ₁₁	None	128×	512×	1,024×	1,024×

*: No CPE or HA.

** : HA titer/0.1ml, CPE observed.

Table 3. HA test of EMCV isolate virus and the standard strain in laboratory animal erythrocytes

RBC	Virus		
	HA test		
	K ₃	K ₁₁	ATCC
Guinea pig	1,024×	1,024×	1,024×
Rat	1,024×	1,024×	1,024×
Dog	16×	16×	16×
Chicken	<2×	<2×	<2×

였다.

K₁₁분리 바이러스 : 체온은 개체별로 약간의 차이는 있었으나 거의 정상체온을 유지했고 접종후 7일째에 40.1°C에 이르는 고온을 나타내다가 정상체온을 되찾았으며 특히 임상증상은 나타나지 않았다. 항체가는 약간 상승하였다.

Table 4. HI titer of experimentally infected pigs with the standard and isolated EMCV strains after postinoculation

Isolate	Age Route	Dose(TCID ₅₀)	HI titer(8 HA unit)		
			Before inoculation	1 week	2 week
K ₃	A(66day) IM	10 ^{7.5} 2ml	32	128	64
	B(21day) IM	10 ^{7.5} 2ml	32	32	128
	C(21day) IM	10 ^{7.5} 3ml	32	512	*1,024
K ₁₁	A(70day) IM	10 ^{7.5} 2ml	64	64	64
	B(21day) IM	10 ^{7.5} 2ml	<4	32	128
	C(21day) IM	10 ^{7.5} 3ml	32	256	256
ATCC	A(76day) IM	10 ^{7.5} 2ml	32	1,024	1,024
	B(21day) IM	10 ^{7.5} 2ml	32	128	128
	C(21day) IM	10 ^{7.5} 3ml	32	256	1,024
Control	A(21day)		<4	<4	64
	B(21day)		16	16	64

IM: Intramuscular injection.

*Died at the 10 days after inoculation.

ATCC 표준균주 : 접종후 3일째에 체온이 40.2°C에 이르는 최고의 체온을 나타내다가 그후 점차 정상체온을 유지하였다. 접종 4일째 옆으로 누워서 복식호흡을 하면서 머리를 땅에다 비벼대는 등의 증상을 보였으나 폐사되지는 않았다. 항체가는 접종전에도 약간의 항체가 인정되었으나 접종후 1주일과 2주일에는 상당히 항체가 상승하였다.

머조균 : 접종전에 전혀 항체가 없던 돼지가 2주후에 2⁻⁶의 항체가를 나타냈으나 특이 부검소견은 나타나지 않았다.

병리학적 소견 : K₃분리 바이러스를 접종 후 10일만에 폐사된 돼지의 좌심실 심근에서 EMCV 감염증의 특이 소견인 백색괴사 반점(직경 1mm)이 관찰되었다. 폐사되지 않는 돼지는 2주 후에 모두 부검하였으나 육안적인 소견은 관찰되지 않았다.

고 찰

돼지 뇌심근염 바이러스 감염증은 돼지에서 신생자돈의 높은 폐사율과 유산, 사산, 미이라화 및 조산등의 심각한 번식장애를 일으켜 양돈업계에 막대한 피해를 주는 질병^{3,14,19}으로 이제 세계적으로 전파되어가고 있어 그 심각성이 높아가고 있으며 본 질환의 확진은 바이러스를 분리하여 동정하는 것이나 그 분리는 용이하지 않다.

본 연구에서 19예의 유산 및 사산돈에서 바이러스 분리를 시도하였으나 단지 2예에서만 분리에 성공하고

대부분 실패한 것은 이미 유·사산돈이 특이항체를 형성한 때문에 바이러스 분리가 어렵다고 주등¹³은 주장하고 있다. 즉 돼지의 항체는 태반을 통과하지 못하지만 임신 70일 이후에는 돼지의 태아가 면역적격(immunocompetence)이 되므로 스스로 면역반응이 일어나 항체를 생성하기 때문으로 추정되며 본 연구에 사용된 검사사로 또한 장기 보관에 따른 바이러스의 활력감소로 그 분리가 어려웠을 것으로 여겨진다.

분리 바이러스는 2대 배양 16~18시간에 세포용해를 일으키는 CPE가 관찰되었으며 KCl-borate 완충액을 이용한 저혈구 응집성 시험은 기니픽과 랫드의 혈구가 1,024배의 응집가를 나타내 개와 닭의 혈구보다 응집능이 좋은 것으로 나타나 Craighead등²⁰이 발표한 결과와 매우 유사하였다. Littlejohn²¹ 등은 6~8주령 4마리 돼지의 하퇴부 근육에 10^6 mouse LD₅₀의 역가를 가진 EMC 바이러스를 3ml씩 접종하였던 마 2, 3, 5, 11일에 모두 폐사하면서 심장에 육안적인 병변을 나타냈다는 보고를 하였으나 본 연구에서는 21일령과 70일령 돼지 11마리의 하퇴부 근육에 $10^{7.5}$ TCID₅₀ EMC 바이러스를 2~3ml씩 접종하였는데 접종후 10일만에 21일령 한마리, 즉 K₃ 분리 바이러스를 3ml 접종한 돼지가 폐사하였고 폐사된 돼지를 부검하였던 마 EMC 바이러스의 특이소견인 심장에 백색의 괴사반점을 발견하였으며 그의 돼지는 접종 2주후에 모두 부검하였으나 육안적인 소견은 나타나지 않았다. 이는 접종전에 대부분의 돼지에서 이미 항체가 2^5 (8 HA unit) 정도로 형성되어 있었으므로 발병되지 않았을 것으로 여겨진다. 또한 농업진흥청 가축위생연구소 김등²²의 1988년 국내 287두의 돼지에서 EMCV의 항체를 측정할 때 54%의 돼지가 양성반응을 나타냈다는 보고와 비교해볼 때 본 연구의 실험용 돼지 11마리중 9마리가 항체 양성률을 보인 것은 전남도 내에도 이미 많은 농장이 EMCV에 노출되었을 것으로 생각된다.

접종후 체온의 변화는 개체별로 약간의 차이는 있었으나 대개의 경우 접종후 2~4일에 체온이 상승(40.0°C 이상)하다가 정상체온을 되찾았으며 폐사 직전에 체온이 상승한다는 Watt²³와 Littlejohn등²¹의 보고와 일치하였다.

결 론

1989년 10월~12월에 전남도내 모양돈장의 미이라파돈 및 사산태아에서 돼지뇌심근염 바이러스를 분리하고 자돈에 접종하여 그 성상을 조사한 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. 19예의 미이라 및 사산태아의 심장과 뇌를 유지

하여 baby hamster kidney(BHK)-21세포에 접종하는 방법으로 혈구응집능(hemagglutination: HA)이 있고 표준주(미국 ATCC사 제공)와 유사한 세포용해등 세포변성효과(CPE)를 일으키는 바이러스 2주가 분리되었으며 이를 K₃와 K₁₁로 명명하였다.

2. 분리주는 BHK-21세포에 접종하여 2대 배양 16~18시간에 세포 변성 효과(CPE)를 형성하였으며 뇌심근염(EMC)바이러스는 랫드와 기니픽 혈구에서 혈구응집이 일어났다.

3. 분리주의 돼지에 대한 감염 시험 결과 K₃주를 접종한 돼지중 1마리가 호흡곤란등의 임상증상을 보이다 10일만에 폐사하였다. 폐사된 돼지의 심장에 백색괴사반점이 관찰되었다.

4. 폐사되지 않은 돼지에서도 접종 2~4일째 체온이 40.0°C이상으로 상승하였으나 서서히 정상체온을 되찾았으며 접종 2주 후에 모두 도살하였으나 육안적인 특이소견이 나타나지 않고 항체가만 상승하였다.

Reference

1. Acland HM, Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus infection. In: Leman AD, ed. Disease of swines. 6th ed. Iowa State University Press. 1986;399~402.
2. Murnane TG, Craighead JE, Mondragon H, Shelokov A. Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus. *Science* 1960;131:439~433.
3. Love RJ, Grewal AS. Reproductive failure in pigs caused by encephalomyocarditis virus. *Aust Vet J* 1986;63:128~129.
4. Christianson WT, Kim HS, Joo HS, Barnes DM. Reproductive and neonatal losses associated with possible encephalomyocarditis virus infection in pigs. *Vet Rec* 1990;126:54~57.
5. Reotutar R. Swine reproductive failure syndrome mystifies scientists. *J Am Vet Med Assoc* 1989;195:425~428.
6. Helwing FC, Schmidt ECH. A filter passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science* 1945;102:31~33.
7. Craighead JE. Pathogenicity of the M and E variants of the encephalomyocarditis(EMC) virus. I. Myocardiotropic and neurotropic properties. *Am J Pathol* 1966;48:333~342.

8. Acland HM, Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus infection of pigs: An outbreak in New South Wales. *Aust Vet J* 1975;51:409~415.
9. Horner GW, Hunter R. Experimental infection in pigs with encephalomyocarditis virus. *NZ Vet J* 1979;27:202~203.
10. Kim HS, Joo HS, Bergeland ME. Serologic virologic and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. *J Vet Diagn Invest* 1989;1:101~104.
11. Gainer JH, Sandefur Jr, Bigler WJ. High mortality in a Florida swine herd infected with the encephalomyocarditis virus: An accompanying epizootiologic survey. *Cornell Vet* 1967;58:31~47.
12. Mercy AR, Peet RL, Ellis TM, Parkinson J. Encephalomyocarditis virus infection in pigs. *Aust Vet J* 1988;65:355.
13. Joo HS, Kim HS, Leman AD. Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. *Arch Virol* 1988;100:131~134.
14. Sanford SE, Josephson GKA, Rehmtulla AJ, Carman PS. Antibodies to encephalomyocarditis virus in aborted and stillborn pigs. *Can Vet J* 1989;30:757.
15. Sutherland RJ, Horner GW, Hunter R, Fyfe BH. An outbreak of viral encephalomyocarditis in pigs. *NZ Vet J* 1977;25:225.
16. Williams MC. encephalomyocarditis virus infection. *J South Afr Vet Assoc* 1981;52:76.
17. Acland HM. Encephalomyocarditis virus. In: Pensaert MB, ed. Virus infections of vertebrates. II. Virus infections of porcines. *Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV* 1989;259~264.
18. Kim HS, Christianson WT, Joo HS. Pathologic properties of encephalomyocarditis virus isolates in swine fetuses. *Arch Virol* 1989;109:51~57.
19. 박남용, 정치영 등. 빈식장애를 수반한 돼지 뇌심근염바이러스 감염증. *대한수의학회지* 1990;30:441~446.
20. Craighead JE, Shelokov A. Encephalomyocarditis virus hemagglutination inhibition test using antigens prepared in HeLa cell culture. *Proc Soc Exp Bio Med* 1961;108:823~826.
21. Littlejohns IR, Acland HM. Encephalomyocarditis virus infection of pigs: Experimental disease. *Aust Vet J* 1975;51:416~422.
22. 김병한. 최근문제가 되고 있는 돼지 뇌심근염 바이러스 감염증. *월간양돈* 1988;10:64~67.
23. Watt DW, Spiradbrow PB. Experimental Encephalomyocarditis virus infection of pig. *Aust Vet J* 1974;50:316~319.