

제주지역 양돈장에서 발생한 자돈 설사병 바이러스의 면역조직화학적 확인

강완철, 김진회, 안미정*, 강종철*

제주도축산진흥원, 제주대학교 수의학과*

Immunohistochemical study of causative agents for the porcine viral diarrhea disease on newborn piglets in Cheju

Wan-Cheul Kang, Jin-Hoe Kim, Mee-Jung Ahn*, Jong-Cheul Kang*

*Cheju Livestock Promotion Institute
Department of Veterinary Medicine, Cheju National University**

Abstract

In an outbreak of acute porcine diarrhea in newborn piglets, an etiological study was carried out using piglets submitted in Cheju Province Institute for Livestock Promotion(Cheju Veterinary Service for the disease diagnosis). Sixteen piglets(2-7 days old) were collected from 4 farms during outbreaks of diarrhea disease(from January to April 2000). Specimens were taken after necropsy and examined by immunohistochemistry using of monoclonal antibodies for porcine epidemic diarrhea(PED) virus, transmissible gastroenteritis(TGE) virus, and porcine rotavirus.

Immunohistochemistry showed that PED virus antigens, but both TGE virus and rota virus antigens not, were localized in the some epithelial cells of the intestines of 14 animals among 16 piglets examined. PED virus antigens were mainly detected in the cytoplasm of enterocytes. Infected cells, which were most abundant in the villous epithelial cells of the jejunum and ileum, were uncommon in the crypt, epithelial cells, the lamina propria and Peyer's patches of piglets examined.

The results suggest that PED virus is one of the most prevailing agents in an outbreak of fatal diarrhea in newborn piglets on Cheju island and PED virus was need to further study to prevent this disease.

Key words : Porcine viral diarrhea, Immunohistochemistry

서 론

돼지 유행성 설사증 porcine epidemic diarrhea(PED)는 어린 자돈 뿐만 아니라 비육돈에서도 구토, 식욕부진, 원기저하 및 수양성 설사를 야기시키는 돼지 급성 전염성 설사병이다¹⁾. PED는 1971년 영국에서 육성돈과 비육돈에 처음 발생보고 된 후²⁾ 벨기에, 독일, 프랑스, 네덜란드 등 유럽 여러 나라에서 발생보고 되었고, 아시아 지역에서는 1983년 일본에서 발생보고 된 바 있다³⁾. 국내에서는 1992년에 최초 발생보고 되었으나⁴⁾, 그 이전인 1987년에 이미 국내에 PED가 유입되어 발생했다는 것이 확인되었으며⁵⁾, 현재 매년 발생하여 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 주고 있는 실정이다.

PED는 모든 연령에 걸쳐 100%의 발병률을 보이며 어린 자돈에서는 다양한 폐사율을 야기하는 질병으로 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상은 돼지 전염성 위장염과 그 증상에서 매우 유사하다⁶⁻¹³⁾. 또한 병리조직학적 소견도 소장 용모의 위축과 융합 그리고 용모 상피세포의 공포화와 탈락 등으로 이러한 병변 역시 돼지 전염성 위장염과 매우 유사하여 자돈에서 바이러스성 설사의 감별진단은 질병 발생경향을 파악하기 위하여는 매우 중요하다.

어린 돼지에서 빈발하는 바이러스성 설사의 병인체로는 돼지 유행성 설사, 돼지 전염성 위장염, 로타 바이러스성 설사 등이 큰 비중을 차지하며 이에 대한 예방대책은 시급한 실정이

다. 그러나 바이러스의 배양 및 분리가 어렵고 효과적인 백신이 개발되어 있지 않을 뿐만 아니라 신속한 진단기술도 충분하지 않다. 현재까지 이들 질병에 대한 진단은 주로 형광항체법에 의존하고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

따라서, 본 연구는 도내 4개 양돈장에서 병성감정 의뢰된 신생자돈의 급성폐사성 설사병 원인체를 면역조직화학적으로 조사하였던 바 PED 바이러스의 감염이 절대적으로 높아 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시동물

실험에 이용한 자돈은 2000년 1월에서 4월 사이에 설사병이 일어난 4농장에서 부검 의뢰된 자돈을 중심으로 관찰하였다(Table 1). 이들은 2~7일령으로서 각 농장 당 4두씩 16두의 자돈을 부검하였다. 설사를 일으킨 자돈으로부터 세균학적 검사를 위해 장 내용물 시료를 채취하여, 5% 면양 혈액배지에 도말 하고 37℃에서 24시간 배양한 다음, gram 염색성을 확인하였고, EASY 24E Plus(KOMED)를 이용하여 생화학검사를 실시하여 동정하였다.

조직검사 시료는 부검 후 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장을 10% 중성 formalin에 고정 한 후 파라핀 포매를 거쳐 박절한 후 H-E염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 대조군으로는 설사경력이 없는 3일령 자돈의 소장을 이용하였다.

Table 1. Outbreaks on 4 farms and pathological findings in 16 piglets

Farms	Number of dead piglets/Total	Number of piglets examined	Age of piglets	Number of dead piglets with		
				Watery diarrhea	Villous atrophy	Vacuolated enterocytes
1	35 / 70	4	3-7	4	4	4
2	20 / 70	4	2-5	4	4	4
3	70 / 170	4	2-7	4	4	4
4	30 / 140	4	2-5	4	4	4

조직학적 검사

파라핀에 포매된 장 조직을 5 μ m 두께로 절편을 만든 후 일반적인 방법에 따라 H-E 염색을 시행하였다.

면역조직학적 검사를 위하여 조직절편에서 파라핀을 제거한 후 내인성 인자를 제거하기 위해 3% H₂O₂가 포함된 증류수에 20분간 반응시켰으며 증류수와 PBS로 수세한 후 비특이적인 반응을 줄이기 위해 normal horse serum으로 반응시켰다. 1차항체로는 국립수의과학검역원으로부터 분양 받은 각각의 mouse monoclonal anti-PEDV, mouse monoclonal anti-TGEV, mouse monoclonal anti-porcine rotavirus를 사용하였다. 각 항체는 1:10으로 희석한 후 36°C에서 30분간 반응시킨 후 순서대로 biotinylated horse anti-mouse IgG로 반응시켰다. 그 다음 avidin-biotin complex reagent (Vector, Burlingame, CA)로 처리하고 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) (Sigma Co. St. Louis, MO)로 발색시켰다. 그리고 hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하였다.

결 과

부검소견

노란색 수양성 설사와 탈수, 그리고 때때로 구토증상을 보인 설사 자돈의 부검시 장은 노란색 수양성 내용물로 팽창되어 장벽이 얇아져 있었고, 위 내에는 때때로 소화되지 않은 응유 물질이 잔재되어 있었으며, 장간막 림프절은 때때로 종창되어 관찰되었다.

세균학적 소견

16두의 장내용물에서 세균학적 배양 및 EASY 24E Plus(KOMED)을 이용한 동정실험 결과 대장균이 동정되었고, 다른 병원성 세균은 검출되지 않았다.

조직학적 소견

16두 모두 소장에서 용모가 위축되어 있었고, 용모와 crypt의 비율은 다양하게 3:1에서 1:1 비율로 심하게 감소되었으며 대조군(Fig 1, A)에 비해 현저하게 감소하였다(Fig 1, B). 위축된 용모는 종종 장상피세포내에 공포가 현저하게 나타났으며, 용모에 있는 다수의 장상피세포는 낮은 원주형에서 입방상피로 되었고 변연은 불분명하게 되었다. 용모의 돌출된 부분의 어떤 세포는 괴사되고 핵은 농축되어 관찰되었다. 점막고유층은 림프구, 호산구, 호중구가 현저하게 침윤되어 있고, 때때로 총혈과 부종이 나타났으나 염증성 삼출물은 관찰되지 않았다. 공장과 회장에서 이러한 병변은 가장 잘 나타나고 일부 십이지장에서도 나타났다.

면역조직화학적 소견

조사한 3종류의 특이항체에 대한 TGE virus 및 porcine rotavirus 특이항원은 검출되지 않았고 PED virus 특이항원이 14두에서 확인되었다(Table 2).

Table 2. Distribution of PEDV antigen as shown by the IHC in small intestine

Farms	Number of dead piglets / Total	Number of antigen-positive piglets / antigen concentration in	
		Jejunum	Ileum
1	4	2/++	2/++
2	4	4/++	4/+++
3	4	4/++	4/+++
4	4	4/+	4/++

+: low, ++: moderate, +++: high

PEDV antigens은 면역조직화학기법에 의해 16두 중 14두의 장 상피세포에서 양성반응이 발현되었으며, 십이지장의 감염된 세포에 비해 공장, 회장에서 바이러스 항원을 포함하는 세

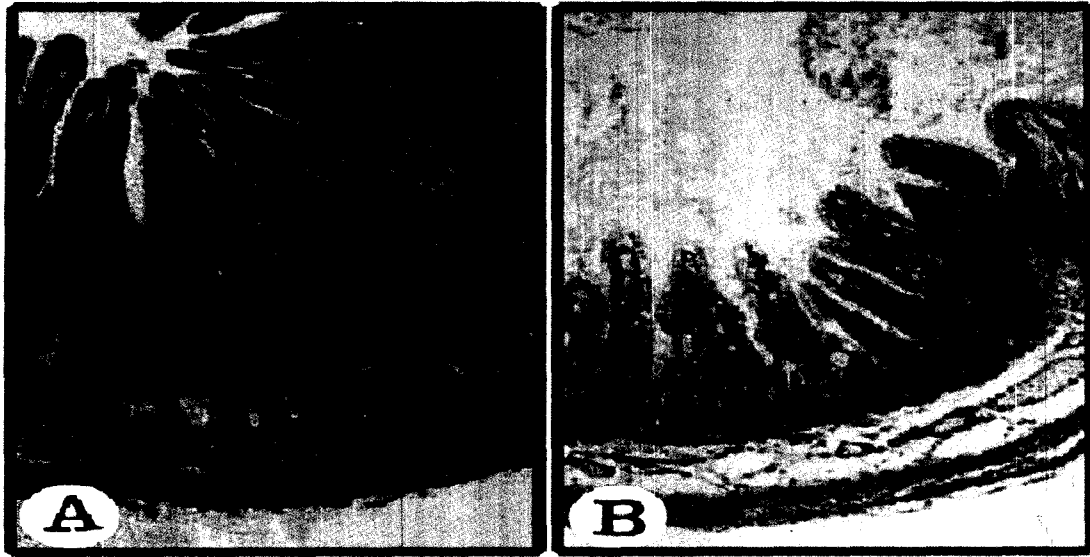


Fig 1. Histological findings in small Intestines of piglets, showing no diarrhea (A) and severe diarrhea (B). The villi of showing no diarrhea piglet are still of normal length (A). A piglet with severe diarrhea is showing villous atrophy and vacuolated enterocytes. The villus-crypt ratio is about 3 : 1 in the ileum of piglet with severe diarrhea.(B) Hematoxylin-Eosin stain. Magnification A&B : $\times 100$.



Fig 2. Immunohistochemical findings in Jejunum (A) and ileum (B) of a PED virus-infected piglets. Virus-positive cells were lined with the intestinal epithelia. Counterstained with hematoxylin. Magnification ; A: $\times 250$, B: $\times 500$.

포가 villi주위에 일정한 배열과 세포질에서 뚜렷히 관찰되었다(Fig 2, A). 그러나, 자돈 2두에서는 PEDV antigens, TGEV antigens와 porcine rotavirus antigens은 음성이었으며, crypt, lamina propria, Peyer's patches(Fig 2, B)에서도 확인할 수 없었다.

고 찰

신생자돈에서 발생한 PED virus, TGE virus, porcine rotavirus 그리고 세균성 설사병은 백신을 투여함으로써 질병예방에 도움을 주고 있으나, 많은 양돈장에서는 자돈설사병, 특히 바이러스성 설사병이 빈발하는 실정이다. 본 연구를 통해 제주지역에서 특히 빈발하는 자돈설사병의 원인체는 PED virus이며, 가장 문제시 됨을 확인 할 수 있었다.

음모의 위축은 모든 설사 병에서 중요한 소견중 하나이며 PED virus 감염에서도 장 음모의 소실이 특징적이며, 이는 실험적으로 감염시킨 예^{6,7)}나 이 실험의 자연감염 예에서나 비슷한 경향이였다. 그러나 인공 감염시킨 자돈에서는 병원체가 crypt, lamina propria, Peyer's patches에서도 확인된다고 하였으나^{7,13)} 자연발생 예에서는 이들 부위에서 바이러스 항원을 확인할 수 없었다. 이와 같은 차이는 감염후 시간경과에 따른 차이이거나 감염 바이러스의 병원성에 따른 차이일 것으로 생각된다.

Schulz G(1988)는 자연 발생한 PED로 추정됨에도 불구하고 음성 반응을 보이는 것은 혈청학적 조사가 병행되어야 한다고 보고하였는데¹⁷⁾, 16마리 자돈 중 2두가 PED virus, TGE virus, rotavirus에 음성을 보이는 것은 혈청학적 진단이 뒷받침되어야 할 것 같다.

PED 바이러스에 감염된 장상피세포의 수는 음모의 위축이 증가할수록 감소하고, 심하게 음모 위축을 일으키는 돼지에서는 항원이 장상피세포에서 탈락되거나 이미 장상피세포를 탈락시켰을 수도 있다. 그러므로 PED 항원의 분포는 질병의 시간경과에 따라 다르다고 여겨지며,

Pensaert, MB(1992)는 PED가 발병시 돈군의 PED 바이러스에 대한 항체 보유상태에 따라 그 증상이 다양하게 나타나고 또한 전지역에 걸쳐서 발생되고 있는 나라에서는 심한 PED의 발생이 드물다고 한 점²⁰⁾으로 볼 때 이미 도내 양돈장에는 PED바이러스가 상당한 수준 감염에 노출되어 있다고 사료되며, 이런 점으로 보아 질병이 발생한 양돈장 모돈의 항체보유 수준은 높을 것으로 생각되며, 백신접종을 하지 않는 농장에서는 PED 발생시 낮은 항체수준으로 인해 그 피해는 매우 클 것으로 판단된다.

결과적으로 제주지역의 4개 양돈장에서 발생한 자돈의 설사병은 PED 바이러스에 의한 것으로 확인되었으며 이를 예방하기 위한 적절한 방역조치가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Debouck, P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus CV 777. *Am J Vet Res* 41 : 219~223.
2. Debouck P, Pensaert MB. 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Vet Microbiol* 6 : 157~165.
3. Takahashi K, Okada K, Ohshima K. 1983. An outbreak of swine diarrhea of a new type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Jpn J Vet Sci* 45 : 829~832.
4. 권창희, 권병준, 정태성 등. 1993. 돼지 유행성 설사 바이러스의 국내분리주에 관한 연구. *대한수의학회지* 33 : 249~254.
5. 박남용, 이석윤. 1997. *In situ* hybridization에 의한 돼지 유행성 설사증의 국내발생역추적 진단. *대한수의학회지* 37(4) : 809~816.
6. Chasey D, Cartwright SF. 1978. Virus-like particles associated with porcine

- epidemic diarrhoea. *Res Vet Sci* 25 : 255~256.
7. Debouck P, Pensaert M, Coussement W. 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Vet Microbiol* 6 : 157~165.
 8. Debouck P, Pensaert MB. 1980. Experimental infection of pig with new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res* 41 : 219~223.
 9. Wood EN. 1980. Transmissible gastroenteritis and epidemic diarrhea of pigs. *Br Vet J* 135 : 305~314.
 10. Ducatelle R, Coussenment W, Charlier G, et al. 1981. Three-dimensional sequential study of the intestinal surface in experimental porcine CV 777 coronavirus enteritis. *Zent Vet B* 28 : 483~493.
 11. Hooper BE, Haeiterman EO. 1966. Growth of transmissible gastroenteritis virus in young pigs. *Am J Vet Res* 27 : 286~291.
 12. Horvath I, Mocsari E. 1981. Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis(TGE)-like disease. *Arch Virol* 68 : 103~113.
 13. Pospischil A, Hess RG, Bachmann PA. 1981. Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with epizootic diarrhea virus(EDV) : comparison with transmissible gastroenteritis(TGE) virus and porcine rotavirus infections, *Zent Vet B* 28 : 564~577.
 14. Pensaert MB, Debouck P, Reynolds DJ. 1981. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Arch Virol* 68 : 45~52.
 15. Kuwahara H, Nunoya T, Samejima T, et al. 1988. Passage in piglets of a coronavirus associated with porcine epidemic diarrhoea. *J Jpn Vet Med Assoc* 41 : 169~173.
 16. 박남용, 조경오. 1994. 돼지 유행성 설사 진단을 위한 면역조직화학적 기법의 응용. *대한수의학회지* 34 : 805~813.
 17. Schulz G. 1988. Diagnosis of epizootic viral diarrhea in swine. *Vet Bull(Suppl)* 58 : 328.
 18. Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, et al. 1995. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea. *J Comp Path* 113 : 59~67.
 19. Turgeon DC, Morin M, Jolette J, et al. 1980. Coronavirus-like particles associated with diarrhea in baby pigs in Quebec. *Can Vet J* 21 : 100~101.
 20. Pensaert MB. 1992. Porcine epidemic diarrhea. *Disease of swine* 7th. Iowa State University Press. Ames : 293~298.