

제주지역 양돈장 자돈에서 발생한 이유후 전신성 소모성 증후군의 증례

강중철 · 정경주 · 안미정 · 이두식 · 강완철* · 김진희* · 신태균

제주대학교 수의학과

*제주도 축산진흥원 가축위생시험과

(2001년 6월 14일 게재승인)

Occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Jeju

Jong-chul Kang, Kyong-ju Jeong, Mee-jung Ahn, Du-sik Lee,
Wan-chul Kang*, Jin-hoe Kim*, Tae-kyun Shin

Department of Veterinary Medicine, Institute for Life Science, Brain Korea 21,
Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

*Animal Health Department of Jeju Provincial Institute for Livestock Promotion, Jeju, Korea

(Accepted by June 14, 2001)

Abstract : Multiplex PCR and immunohistochemistry were used to detect and differentiate between porcine circovirus (PCV) type-I and the PCV associated with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Unique DNA product to PCV type-II was confirmed the some organs including lymph nodes, tonsil and spleen from eight pigs in Jeju by multiplex PCR. In this study, the samples were tested by a multiplex PCR assay to determine the type of PCV in each case; all cases were PCV type-II positive. PCV type-II was identified not only in typical PMWS cases, but also in field cases submitted with various clinical histories, some of which were not suggestive of PMWS. Immunohistochemically PCV type-II antigen was detected in macrophage-like cells in the tonsil, liver, lymph nodes and spleen, while some hepatocytes and renal tubular epithelial cells were also positive to the virus. This study suggested that PCV type-II is one of the causative agents of PMWS as well as the major type of PCV in the affected pigs in Jeju.

Key words : porcine circovirus, polymerase chain reaction, immunohistochemistry

서 론

Porcine circovirus(PCV)는 Circoviridae로서 이 속에는 앵무새에 병원성을 나타내는 beak and feather disease virus, 닭에서 빈혈과 골수 이형성을 유발하는 chicken anemia virus(CAV; the type species)가 있으나 각각의 바이러스는 동질성이 없을 뿐만 아니라 교차 반응도 없는 것으로 알려져 있다¹.

PCV는 바이러스 배양에 사용되는 돼지 신장 세포주(PK-15)에 오염되어 있던 바이러스로 Tischer² 등에 의해

처음 확인되었고, 이를 인위적으로 돼지에 감염시켰을 때 질병이 유발되지 않는 것으로 보아 비병원성인 것으로 추정하여 왔다^{3,4}. 그러나 수년 전부터 캐나다와 미국에서 이유후 전신 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) 증상을 나타내는 돼지를 연구하던 중, 실질 장기에서 기존의 PCV와는 다른 새로운 circovirus를 검출하였다. 따라서 PK-15 세포에 오염되어 있던 비병원성 PCV와 구별하기 위하여 본 바이러스를 PCV 2형으로 구분하였다^{5,6}. PCV 2형은 기존의 1형과는 핵산 염기서열이 80% 이하만 같고, 혈청학적으로

로도 교차반응이 낮은 것으로 알려져 있다. 또한 지금까지의 연구결과에 의하면 PCV 2형이 PMWS의 1차적인 원인으로 알려져 있다^{7,9}.

PMWS는 주로 4~14주령의 돼지에서 위축, 체중감소 및 만성 호흡기 질환 등을 특징으로 하는 질병으로 감염된 농장에 따라 5~50% 정도의 발병률을 나타내며^{4,10-13}, 국내에서도 일부 양돈장에는 PCV 감염이 확인되고 있다^{14,15}. 제주도는 지리적으로 격리되어 있어 양돈 및 축산에 질병 방역상 여러 장점을 지니고 있으며 현재까지 구제역, 돼지 콜레라 등 치명적인 질병은 발생되지 않고 있다. 그러나, 외국으로부터 유입되는 종돈과 많은 교류로 인해 PMWS와 같은 외래성 질병 발생이 우려되고 있다. 따라서, 제주지역에서도 PMWS와 유사한 증상의 질병이 자돈에서 발병함에 따라 역학적인 원인체 규명이 필요하게 되었다.

이 연구에서는 먼저 제주 지역에서 PMWS로 의심되어 부검 의뢰된 가검물을 중심으로 PCV 감염을 확인하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 동물

제주도내 5개소의 양돈장에서 부검 의뢰된 5~10주령의 만성적인 위축, 피모의 거침, 허약 등을 보이는 8두에 대한 부검 후 간장, 폐장, 림프절, 췌장, 비장, 신장, 편도 등 실질장기를 본 실험에 이용하였다.

재료 전처리 및 DNA 추출

부검 후 실질장기(간장, 폐장, 림프절, 췌장, 비장, 신장, 편도)를 1 mM Na-pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U penicillin-100 mg streptomycin을 첨가한 minimum essential medium (MEM)에 넣고 균질화 시킨 후 상층액을 여과하여 -70°C에 사용하기 전까지 보관하였다. DNA 추출은 QIAamp® DNA mini kit(Qiagen)를 이용하였다.

중합효소연쇄반응

polymerase chain reaction(PCR)용 primers는 Meehan 등이 1998년에 보고한 DNA sequences (Gibco BRL)에 따

라서 제작하였다(Table 1).

GeneAmp PCR System (Perkin-Elmer)을 이용하여 통상적인 방법에 따라 PCR을 수행하였으며 반응산물은 전기영동한 후 UV 램프에서 사진촬영을 하였다⁶.

면역조직화학적 검사

포르말린에 고정된 후 파라핀에 포매한 실질장기 조직을 5 µm 두께로 절편을 하였고, 일반적인 방법에 따라 헤마톡실린과 에오진 염색(H&E)을 시행하였다.

면역조직화학적 검사를 위하여 조직절편에서 파라핀을 제거한 후 내인성 인자를 제거하기 위해 0.3% 과산화수소가 포함된 증류수에 20분간 반응시켰으며, Histostain-Plus kit (Zymed, San Francisco, CA, U.S.A.)를 이용하여 전반적인 염색을 실시하였다. 1차 항체로는 PCV 2형에 대한 토끼 항혈청(1:2000; 대상미생물연구소)으로 37°C에서 60분간 반응시켰으며, 순서대로 biotinylated anti-rabbit IgG로 반응 후 avidin-biotin complex reagent로 처리하고 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) (Zymed, San Francisco, CA, U.S.A.)로 발색시켰다. 그리고 헤마톡실린으로 대조염색을 실시한 후 에탄올과 크실렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

임상 소견 및 부검 소견

육안 소견은 일반적으로 위축, 피모 거침, 쇠약 등 다양하며, 경우에 따라 특이성이 없었다. 부검시 흔히 림프절(서혜부, 악하, 폐문, 장간막)의 발적 종대를 볼 수 있으며, 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 2와 같다.

PCR

PCR 결과 모든 검사 예(n=8)에서 PCV 2형의 특이 band(263 bp)가 확인되었으며, PCV 1형의 특이 band(349 bp)는 모든 예에서 확인되지 않았다(Fig 1).

Table 1.

Primer	Nucleotides sequence	Expected PCR product size
CF8	5' TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT 3'	263bp (PCV 2형)
CR8	5' CCGCACCTTCGGATATACTG 3'	
PF2	5' TTGCTGAGCCTAGCGACACC 3'	349bp (PCV 1형)
PR2	5' TCCACTGCTTCAAATCGGCC 3'	

Table 2. Clinical signs and lesions of 8 pigs collected from 5 farms to be used. *Average age = 45-days old

Parameters	No. tested (N = 8)*	No.(%)
<i>Clinical signs</i>		
Pale (Skin)	5	62.5
Emaciation (more or less)	8	100
Icterus	4	50
Cyanosis of ear and perineal area	5	62.5
<i>Gross lesions</i>		
Enlargement		
- inguinal lymph nodes	7	87.5
- mesenteric lymph nodes	6	75
- broncho-tracheal	5	62.5
- Necrotic, atrophic mesenteric lymph nodes	3	37.5
Pneumonia	7	87.5
Pulmonary interlobular edema	6	75
Pleuresy	4	50
Pericarditis	5	62.5
Edema of colon	6	75
Dilatation & watery contents of Caecum	5	62.5
Peritonitis	-	-
Spleen (Enlarged)	5	62.5
Enlarged and/or focal discoloration of kidney	7	87.5

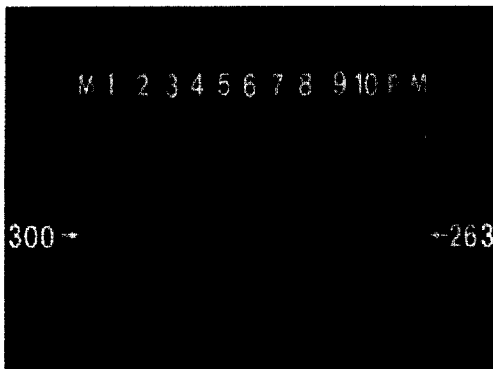


Fig 1. Specificity of the multiplex PCR for the differentiation of PCV type-I and type-II. Lane M: 100 bp DNA Ladder; lane 1: pancreas; lane 2: inguinal lymph node; lane 3: liver; lane 4: small intestine; lane 5: kidney; lane 6: lungs; lane 7: spleen; lane 8: tonsils; lane 9: mesenteric lymph node; lane 10: positive control. 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

병리조직학적 및 면역조직학적 소견

조직학적 소견은 일반적으로 신장에서 간질성 신염의 특징인 국소적 단핵구 침윤과 신세관의 괴사가 관찰되었고, 폐 조직에서는 간질성 화농성 폐렴과 폐포 증격에

서는 단핵구 침윤이 관찰되었다. 간에서는 괴사와 출혈 소견을 보였으며, 림프조직에서는 림프구의 소실, 조직구 침윤과 함포체 형성 등이 관찰되었다.

PCV 2형 항원에 대한 면역조직학적 염색 결과 편도에서 많은 항원양성을 확인하였고, 소장 용모에서도 양성세포가 확인되었다(Fig 2). 또한 간세포, 신장의 신세뇨관 상피세포, 폐, 췌장, 림프절 및 비장 등에서도 바이러스 항원양성 반응이 보였다(Table 3).

고 찰

PCR 실험에 이용한 8두 모두 PCV 2형(263 bp)의 감염이 확인되었으며, PCV 1형에 대한 특이 band(349 bp)는 확인할 수 없는 것으로 보아 제주지역에서 발생하고 있는 PMWS의 원인체는 PCV 2형인 것으로 확인되었다. 따라서, 제주 지역에서도 PCV가 자돈의 성장에 문제될 수 있음을 처음 확인할 수 있었다.

지금까지 PCV는 비병원성으로 알려져 왔지만, 최근 들어 PMWS와 깊은 상관 관계가 있음이 밝혀지고 있다^{7-9,17}. 최근 연구자들은 비병원성 PCV 1형과 병원성 PCV 2형이 돼지 질병에 혼합 감염시 상승적으로 질병을 유발시킬 수 있다고 보고를 한 바가 있다^{5,6,20}. 그러나, 제주도에서 발생하는 예를 중심으로 본다면 실제 사

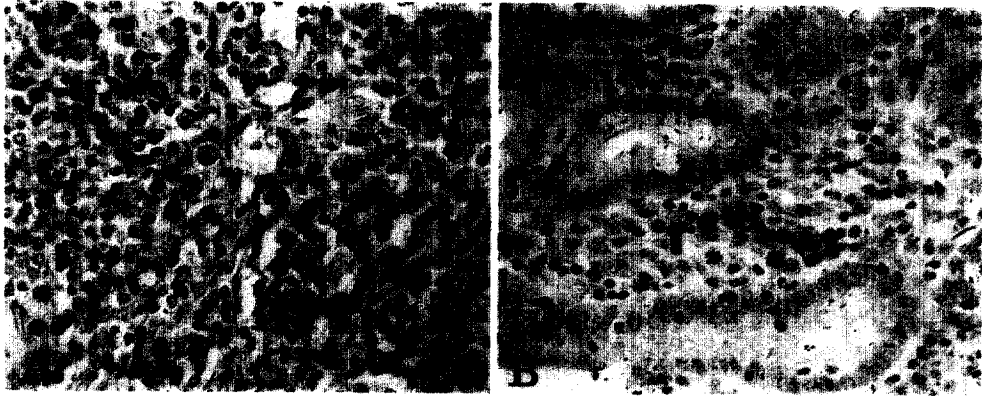


Fig. 2. Immunohistochemical detection of PCV type-II in tonsil(A), small intestine(B). There is intense labeling of PCV type-II antigen(arrow). Optimized Immunohistochemical technique: x 300. Counterstained with hematoxylin.

Table 3. Immunohistochemical detection of PCV type-II antigen in various tissues of piglets to be examined.

Case No.	Liver	Spleen	Lymph nodes	Small intestine	Tonsil	Lung	Kidney	Pancreas
1	+++*	++	+++	++	++++	++	++	++
2	++++	+++	++	+++	++	+	++++	+++
3	++	++	++	+++	++++	++	+++	++
4	++	+	++	++	++++	++	+++	+++
5	++++	++	+	+++	+++	+	++++	++
6	+++	+++	+	++	+++	++	++	+
7	++++	++	+++	+++	+++	++	+++	++
8	++	+	++	++	++++	+	++	+++

*Degrees on frequency of positive cells; ++++ abundant signal; +++ moderate; ++ weak signal; + very weak signal

육 자돈에서 문제될 수 있는 것은 PCV 2형이 주 병원 체임을 알 수 있었으며 이는 다른 연구 결과와 일치하고 있다⁷⁻¹⁰. Ellis¹⁶ 등은 PMWS의 실질 장기에 대한 면역조직학적으로 연구를 한 바 있으며, 본 실험 결과 모든 실질 장기에서 항원확인 가능하였으며, 특히 편도, 소장, 간, 신장에서 PCV 2형 항원 확인이 가능하였다. 이는 Ellis¹⁶ 등의 결과와 유사함을 보이고 있다. 이와 같은 소견으로 보아 림프계통은 이 질병의 조기진단에 중요한 부위임을 알 수 있고, 특히 다른 어떤 장기보다 편도는 면역조직학적 진단에 유용한 검사부위로 생각된다.

일반적으로 PMWS에 관여하는 병원체로는 PCV 2형이 주로 감염되어 있으나, 이것 이외에 바이러스성 질병으로는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 돼지 파보바이러스, 돼지 인플루엔자바이러스, 돼지 엔테로바이러스, 세균성으로는 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus*

parasuis 등과 같이 보통 호흡기 질환에 관여되는 원인체가 함께 감염되는 예가 많은 것으로 알려져 있다¹⁸. 미국에서는 PMWS 증상을 나타내는 돼지의 약 65%가 PCV 2형과 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스가 혼합 감염되어 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 Choi와 Chae¹⁹는 PMWS가 PCV 2형 단독 감염의 경우보다 돼지 파보바이러스와 혼합 감염시 더욱 심한 병변을 유발하며, 파보바이러스가 돼지 체내 면역기관을 손상시켜 PCV 2형의 감염을 촉진시킬 수 있음을 입증한 바 있다. 이 실험에서 결과에 제시하지는 않았으나, 면역조직화학적 방법으로 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 및 돼지 인플루엔자바이러스를 검사한 결과 일부 돼지의 폐에서 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 및 돼지 인플루엔자바이러스의 항원이 동시에 검출되었다. 즉 PCV는 단독 감염도 가능하지만 원발성 또는 후발성으로 다른 바이러스 또는 세균과 혼합 감염된 후 성장에 더욱 장애를 초래할 수 있을 것으로 생각된다.

또한, PCV 1형과 PCV 2형은 혈청학적 교차반응이 낮기 때문에 PCV 1형을 이용한 혈청검사는 큰 의미를 가지지 못하며, 반드시 PCV 2형을 사용하여 혈청검사를 하여야 한다고 보고한 바 있다^{20,21}. 따라서, PCV 2형 감염 진단의 혈청학적 검사 기법의 개발이 중요하다고 여겨진다.

본 연구는 제주 지역 양돈장에서 발생한 PMWS의 원인은 PCV 2형이며, 앞으로 이에 대한 이해와 예방을 위한 연구에 도움을 줄 것으로 생각된다.

결 론

제주도내 5개소의 양돈장에서 부검 의뢰된 5~10주령의 만성적인 위축, 피모의 거침, 허약 등을 보이는 8두에 대한 PMWS 중심으로 PCV 감염 사실을 확인하고, 임상 및 부검 소견을 분석하였다.

PCR 결과 모든 검사 예(n=8)에서 PCV 2형의 특이 band(263 bp)가 확인되었으며, 면역 염색 결과 PCV 2형 항원확인 은 모든 실질장기(간장, 폐장, 림프절, 췌장, 비장, 신장, 편도, 소장용모 등)에서 양성 이 확인되었다. 따라서 본 실험에 이용한 위축 및 성장장애를 보이는 자돈은 PMWS로 확인되었으며, 그 원인체는 PCV 2형임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. LuKer P, de Boer GF, Dale JL, et al. 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), 1995.
2. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature*, 295:64-66, 1982.
3. Tischer I, Mielsds W, Wolff D, et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol*, 91:271-276, 1986.
4. Allan GM, McNeilly F, Cassidy JP, et al. Pathogenesis of porcine circovirus-experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig fetal material. *Vet Microbiol*, 44:49-64, 1995.
5. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Invest*, 10:3-10, 1998.
6. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol*, 79:2171-2179, 1998.
7. Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus

- from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 39:44-51, 1998.
8. Hamel AL, Lin LL, Nayar GPS. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol*, 72: 5262-5267, 1998.
9. Dulac GC, Afshar A. 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, 1989.
10. Tischer I, Bode L, Peters D, et al. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch Virol*, 140:737-743, 1995.
11. Mankertz A, Domingob M, Folchc JM, et al. Characterization of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res*, 66:65-77, 2000.
12. Clark EG. Postweaning multisystemic wasting. *Proc Am Assoc Swine Pract*, 499-501, 1997.
13. Nayar GP, Hamel A, Lin L. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J*, 38: 385-389, 1997.
14. Choi C, Chae C. 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, 2000.
15. Choi C, Chae C. In situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol*, 121: 265-270, 1999.
16. Rosell C, Segales J, Plana-Duran J, et al. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Comp Pathol*, 120:59-78, 1999.
17. Ellis J, Hassard L, Clark E, et al. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J*, 39:44-51, 1998.
18. Madec E, Evenoa P, Morvana L, et al. Post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in France: Clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livestock Prod Sci*, 63:223-233, 2000.
19. Kennedy S, Moffett D, McNeilly F, et al. 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*, 122:9-24, 2000.
20. Magar R, Larochele R, Thibault S, et al. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaned pigs: A sequential study. *J Comp Pathol*, 123: 258-269, 2000.
21. Balasch M, Segales J, Rosell C, et al. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol*, 12:139-148, 1999.