

포유자돈에서 돼지썩코바이러스 2형이 돼지유행성설사 바이러스 감염에 미치는 영향 II. 임상증상, 병리조직학적 검사 및 면역조직학적 검사

김 문 · 김영훈 · 한정희*
강원대학교 수의학부(대학)

(접수 2009. 9. 1, 게재승인 2009. 9. 25)

Effects of porcine circovirus type 2 on the pathogenesis of porcine epidemic diarrhoea virus infection in piglets II. Clinical sign, histopathological lesion and immunohistochemical finding

Wen Jin, Yeong-Hun Kim, Jeong-Hee Han*

School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received 1 September 2009, accepted in revised from 25 September 2009)

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of a subsequent infection of PCV2 on piglets with PEDV. In clinical signs, the signs observed in dual-infected with PEDV and PCV2 piglets and alone infected with PEDV piglets ranged from diarrhoea to vomiting and dehydration. Dual-infected piglets developed signs of anorexia, vomiting and watery diarrhoea within 12 hpi. Nevertheless alone -infected piglets caused pasty diarrhea at first. In mortality, dual infections showed 25%, but alone -infections showed 8.3%, respectively. In gross findings, piglets dual-infected with PEDV and PCV2 appeared the severe findings of congestion, distension of lumen, milder curdes of undigested milk in stomach than those of single-infected piglets. In histopathological findings, piglets of dual-infection group appeared the more severe findings of villous atrophy and fusion, congestion, exfoliation, vacuolation, squamation, loss of cilia and proliferation of crypt. Significant ($P < 0.05$) decrease in VH:CD ratio in dually infected piglets compared to piglets from alone-PEDV infections. In immunohistochemical findings, strong hybridization signals in dual-infected piglets observed moderate to severe villous atrophy or vacuolation with positive cells arranged continuously over the villi. In the lumen, exfoliated enterocytes were strongly positive in dual-infected piglets. A number of PEDV-positive cells in dual -infected pigs were significantly higher than that in alone PEDV-infected piglets.

Key words : PEDV, PCV2, Dual-infected, Piglets

* Corresponding author: Jeong-Hee Han, Tel. +82-33-250-8691,
Fax. +82-33-256-3722, E-mail. hanjh@kangwon.ac.kr

서 론

돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea; PED)는 돼지 유행성 설사 바이러스(PEDV)의 감염에 의해 발병하며 어린 자돈 뿐만 아니라 육성돈, 비육돈에서도 심한 수양성 설사를 일으키는 급성 바이러스성 장염이다. PED는 모든 연령에서 100%의 발병률을 보이며 포유자돈에서는 50% 이상의 폐사율을 야기하는 질병으로 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 보이거나 자돈에서의 느린 전파와 낮은 폐사율을 제외하고는 TGE와 매우 유사하다 (Pensaert, 2000; Pensaert, 1999; Pijpers 등, 1993; 우 등, 2003)

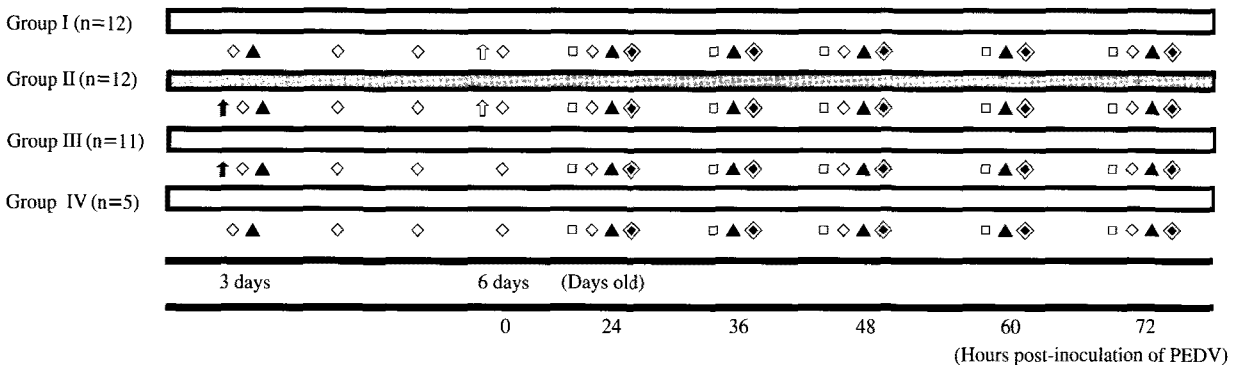
PEDV는 다른 coronavirus와 형태학적으로 그리고 세포질막을 통한 출아에 의해 바이러스 복제가 일어난다는 점에서는 공통점이 있으나 차이점은 다른 coronavirus와 명확히 구분되는 항원성을 가지고 있으며 또한 혈구응집 능력도 가지고 있지 않다는 점이다 (Pensaert 등, 1981).

PEDV는 1976년 벨기에와 1978년 영국에서 최초로 보고가 있는 후에 주로 유럽에서 발생되었으며(Chasey와 Cartwright, 1978; Pensaert와 DeBouck, 1978), 아시아에서는 1983년에 일본에서 발생보고가 있었고 (Takahashi 등, 1983), 국내에서는 1992년에 최초로 분리되었으며 최근까지 지속적으로 발생하여 막대한 경제적 피해를 주고 있다(Kweon 등, 1993; 박 등, 1993; 박 등, 1998).

PCV2는 PCVD의 1차적인 원인체로 지목되어 왔지만 그러나 인공감염시험에서 PCV2의 단독감염 시에는 전형적인 증상이 유발되지 않거나 경미한 PCVD 증상을 나타내었으나 PPV나 PRRS를 PCV2와 동시감염시켰 때에는 PCVD와 거의 유사한 증상을 재현시킬 수 있음을 보고하였다(Ellis 등, 2000; Krakowka 등, 2000). 또한 면역계를 자극하는 물질인 keyhole limpet haemocyanin in incomplete Freund's adjuvant (KLH/ICFA)와 같은 면역 증강제(immunostimulator), 면역 조절제(immunomodulator), *Mycoplasma hyopneumonia*에 대한 백신 등과 함께 PCV2를 감염시켰을 경우에도 자연감염 예와 같은 PCVD의 병변이 유발되었다 (Darwich 등, 2004; Krakowka 등, 2001; Kyriakis 등, 2002).

최근 포유자돈에서 PEDV와 PCV2의 복합감염이 보고되었고(Hirai와 Nunoya, 2006), 현장 관찰에 의하면 PCV2에 감염된 포유자돈에서 PEDV가 감염시 심각한 설사 양상을 나타내었다. 더불어 PCV2는 포유자돈이 PEDV 감염의 과정과 연관된 것으로 제기하였다(Jung 등, 2006).

국내에서 PCVD와 PED가 많은 피해를 일으키는 것으로 추정되나 이와 관련되어 국내에서 분리된 PEDV와 PCV2를 초유 섭취한 일반돼지에 복합감염시킨 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 국내에서 분리된 PEDV와 PCV2를 초유를 섭취한 일반 포유자돈에 감염시킨 다음 미생물학적, 병리학적 검사를 통하여 PCV2가 PED에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.



Group I: Piglets were challenged with PEDV in 6 days old
 Group II: Piglets were challenged with PCV2 in 3 days old followed by PEDV in 6 days old
 Group III: Piglets were challenged with PCV2 in 3 days old
 Group IV: Piglets were administered with sterile saline in 3 days old
 ◇: Administration of dexamethasone from 3 days old every day ↑: PEDV challenge ↑▲: PCV2 challenge
 ▲: Blood collection □: Feces collection ◆: Autopsy

Fig.-Text 1. Schematic draws of experimental design.

재료 및 방법

PEDV와 PCV2 공격접종

PEDV는 국내에서 분리된 바이러스를 녹십자수의약품주식회사 연구소에서 아프리카원숭이 콩팥세포 (Vero cell)를 이용하여 배양한 DR13주(1.5×10^5 TCID₅₀/ml)를 분양받아 사용하였고 PCV2는 국내에서 분리된 바이러스를 서울대학교 수의과대학 미생물학 교실에서 돼지 신장세포주(nPK-15 cell)를 이용하여 배양한 99R주(10^5 TCID₅₀/ml)를 사용하였다.

시험동물 및 시험설계

산차를 고려하여 초유를 섭취한 4복의 포유자돈 40두를 시험동물로 선발하였다. 실험군과 대조군의 포유자돈은 각각의 실험동방에 넣어 24시간 동안 적응시킨 후 3일령에 공격접종을 실시하였다. 실험군은 4개군으로 구분하여 실험 I, II군은 12두씩, 실험 III와 대조군은 각각 11두, 5두씩 배치하였다. 실험 I군(group I)은 6일령때 PEDV를 2.5ml/두씩 구강 접종한 군, 실험 II군(group II)은 3일령때 PCV2를 2.5ml/두씩 각각 비강 및 근육 접종한 다음 6일령때 PEDV를 2.5ml/두씩 구강 접종한 군, 실험 III군(group III)은 3일령때 PCV2를 2.5ml/두씩 각각 비강 및 근육 접종한 군, 실험 IV군(group IV)은 대조군으로 멸균 생리식염수를 접종한 군으로 구분하였다(Fig.-Text 1). 각 실험군에 3일령때부터 텍사메타손을 3ml/두씩 매일 근육주사 실시하였다. 실험자돈은 PEDV를 공격접종 24시간 후부터 12시간 간격으로 경정맥에서 채혈하였고 항문에서 분변채취 하였다.

임상검사 및 병리학적 검사

임상증상

실험자돈은 PCV2, PEDV를 공격접종하기 전부터 실험종료까지 체중, 구토, 설사, 식욕부진 등의 임상증상을 매일 일정한 시간에 관찰하여 기록하였다.

육안검사

실험도중 폐사되거나 실험종료시 2.2mg/kg ketamine (Katala®, 유한양행)과 3.5mg/kg xylazine (Rompun®, 한국바이엘)으로 안락사 시킨 후 부검을 실시하여 육안소견을 관찰하였다.

병리조직학적 검사

육안소견으로 병변을 보이는 십이지장, 공장, 회장의 조직은 10% neutral-buffered formalin에 고정하여 파라핀포매 과정을 거친 뒤 4μm 두께로 조직절편을 제작한 다음 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 검사

PEDV의 항원을 분포 알아보기 위하여 십이지장, 공장, 회장을 면역조직화학적 검사를 하였다. 포르말린에 고정된 소장의 각 부위별 조직을 통상적으로 파라핀에 포매시킨후 4μm 두께로 잘라서 3~aminopropyltriethoxysilane (Sigma)으로 coating 처리된 슬라이드에 부착시켜 냉동아세톤으로 2분간 처리하여 건조시켰다. PBS (pH 7.2)로 3분씩 3회 세척한 다음 0.3% H₂O₂를 함유한 methanol에 10분간 처리하였다. PBS로 3분씩 3회 세척한 다음 normal rabbit serum (Vector Laboratories, USA)으로 37°C에서 30분간 처리하였다. 1,000배 희석된 PEDV monoclonal antibody (MAb) (국립수의과학검역원)를 흡착시킨 뒤 37°C에서 1시간 30분 반응시켰다. PBS로 3분씩 3회 세척한 다음 biotinylated link anti-mouse and anti-rabbit Ig (DAKO)를 흡착시켜 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS로 3분씩 3회 세척한 다음 ABC reagent (Vector Laboratories)로 실온에서 30분간 반응시켰다. 냉각된 PBS로 3분씩 3회 세척한 다음 3, 3'-diaminobenzidine 4 HCl (DAB) substrate solution (Vector Laboratories)을 흡착시켜 4분간 반응시켰다. PBS로 3분씩 2회 세척한 다음 1% methyl green에 10분간 염색하였다. 증류수에서 dipping한 다음 ethanol에 3분간씩 2회 탈수하고 xylene에 3분간씩 2회 처리하여 mounting하여 광학현미경으로 관찰하였다.

통계학적 처리

실험을 통하여 얻은 결과를 통계학적 유의성 검사는 SAS package (Ver. 6.12, USA)를 이용한 Mann~Whitney U test를 실시하였다.

결 과

국내 양돈산업 뿐만 아니라 전 세계 양돈산업에 있어서 막대한 경제적 손실을 주고 있는 돼지 전신성 질병인 PCV2와 포유자돈 소화기질환인 PEDV과의 상관

관계를 구명하고자 감염실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

임상검사와 병리학적 검사

임상증상

실험기간 동안 실험군 및 대조군의 포유자돈의 분변 상태, 원기, 식욕, 구토, 폐사 등 관찰된 임상증상은 Table 1과 같다. PEDV를 공격접종한 실험 I군의 포유자돈은 공격접종 후 1일째 또는 2일째부터 연변 또는 수양성 설사를 나타내어 1~2일간 지속되었고 원기소실과 식욕감퇴는 공격접종 후 1일부터 나타났고 6두에서 구토 증상도 나타났으며 공격접종 후 3일에 1두가 폐사하여 8.3%(1/12)의 폐사율을 보였다.

PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군의 포유자돈은 공격접종 후 14시간 이후부터 구토를 시작하였으며 1일째부터 심한 수양성 설사를 나타내어 2일간 지속되었으며 구토, 원기소실, 식욕절폐는 공격접종 후 1일째부터 심하게 나타났으며 공격접종 후 2일과 3일에 3두가 폐사하여 25.0%(3/12)의 폐사율을 보였으며 PEDV 단독 감염된 실험 I군에 비하여 임상증상과 실험자돈의 폐사율의 차이가 나타났다(Table 1).

공격접종전과 실험종료까지의 체중을 시기별로 측정하여 체중변화를 분석한 결과는 Table 2와 같다. PEDV 공격접종군에서 공격접종 24시간 후 2두의 평균 증체는 0.06kg, 48시간 후 2두의 평균 증체는 -0.23kg, 72시간 후 2두의 평균 증체는 -0.36kg로 나타났다. PEDV와 PCV2 복합 공격 접종군에서 자돈 공격접종 24시간 후 2두의 평균 증체는 -0.10kg, 48시간 후 2두의 평균 증체는 -0.27kg, 72시간 후 2두의 평균 증체는 -0.42kg로 나타났다. PEDV와 PCV2 복합 접종군이 PEDV 단독 공격접종군에 비하여 유의성 있게 체중 감소를 보였다($P < 0.05$). PCV2를 공격접종한 실험 III군과 대조군의 포유자돈은 공격접종 후 실험기간동안 꾸준한 증체를 나타냈다.

육안검사

실험종료시에 부검을 실시하여 육안소견을 관찰하였던 결과는 PEDV를 공격접종한 실험 I군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 위내 소장의 장막면 혈관의 충혈이 관찰되었고, 48시간 이후 부터 2두 혹은 3두를 부검한 결과 소장의 장막면이 암자적색으로 충혈되었고 가스가 차있으며 장간막 림프절의 충혈, 장막

이 얇아져 있었고, 맹장과 결장내에는 수양성 내용물이 다량 차 있었다(Fig. 1-4).

PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검한 결과 위내에는 소화되지 않은 응유괴로 팽만되었고 소장내에도 소화되지 않은 응유괴가 있었으며 소장의 장막면 혈관은 암자적색으로 충혈되어 있었고, 48시간 후 2두를 부검한 결과 장간막 림프절의 충혈, 소장의 가스가 차있어 심하게 팽만되어 장내용물이 관찰될 정도로 장막이 얇아져 있었고, 72시간 후 폐사된 자돈 소장의 장간막 혈관의 충혈, 맹장과 결장내에는 수양성 내용물이 다량 차 있었다.

PCV2를 공격접종한 실험 III군의 개별 자돈들은 소장의 장막면 혈관의 가벼운 충혈 소견 이외에는 특징적인 육안소견이 관찰되지 않았다. 또한 대조군에도 별 다른 특징적인 육안소견이 관찰되지 않았다.

병리조직학적 검사

PEDV 또는 PCV2를 단독감염 또는 복합감염시켰을 때의 병리조직학적 소견은 Table 2과 같다(Fig. 5-16). PEDV만을 단독감염시킨 실험 I군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 1두의 십이지장과 공장 은 융모의 가벼운 충혈, 위축을 보였고, 융모 : 음와 길이의 비율이 6~7 : 1로 관찰되었다. 36시간 후 2두를 부검시 1두의 공장은 융모의 위축과 충혈, 수중성 변화, 가벼운 섬모소실, 음와상피세포의 증식을 보였고 융모 : 음와 길이의 비율이 4~5 : 1로 관찰되었다. 48시간 후 2두를 부검시 모두의 십이지장, 공장, 회장은 융모의 심한 위축과 탈락 보였으며 융모 : 음와 길이의 비율이 3 : 1로 관찰되었다. 60시간 및 72시간 후 각 3두를 부검시 점막하직층에서 상피세포의 변성 및 괴사에 의한 탈락 및 재생, 회장에서는 융모의 심한 위축과 융합 및 수중성 변화가 보였고 융모 : 음와 길이의 비율이 2~3 : 1로 관찰되었다.

PEDV와 PCV2를 복합감염시킨 실험 II군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 십이지장, 공장, 회장은 융모의 충혈, 위축을 보였고 융모 : 음와 길이의 비율이 5~6 : 1로 관찰되었다. 36시간 후 2두를 부검시 2두의 십이지장에서 융모의 중등도 위축과 심한 융합, 융모상피세포의 탈락, 심한 편평상피세포화와 섬모소실, 뚜렷한 음와상피세포의 증식을 보였으며 융모 : 음와 길이의 비율이 3~5 : 1로 관찰되었다. 48시간 후 2두를 부검시 회장은 융모의 심한 위축과 융합, 상피세

포의 심한 탈락, 일부 공포화, 심한도 편평상피세포화와 심한 섬모소실을 보였으며 점막층에서 술잔세포의 증식이 관찰되었고 용모 : 음와 길이의 비율이 2~3 : 1로 관찰되었다. 60시간 및 72시간 후 각 3두를 부검시 공장은 용모의 심한 위축과 융합, 중등도 충혈, 상피세포의 심한 탈락과 중등도 편평상피세포화, 심한 섬모소실과 음와상피세포의 증식을 보였고, 회장은 용모의 심한 위축과 융합, 충혈, 상피세포의 심한 탈락과 공포화, 심한 편평상피세포화를 보였고 용모 : 음와 길이의 비율이 1~2 : 1로 관찰되었다. 전반적으로 PEDV에 의해 용모상피세포의 공포변성과 괴사에 의한 전형적인 탈락과 위축소견은 보였고 상피세포의 재생은 관찰되지 않았다. PCV2를 공격접종한 실험 III군과 대조군의 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 특이적인 PED의 병리조직학적 변화가 관찰되지 않았다.

면역조직화학적 검사

PEDV 또는 PCV2를 단독감염 또는 복합감염시 소장에서 PEDV의 항원을 검출하고자 십이지장, 공장, 회장을 면역조직화화학염색을 실시하였다(Table 3) (Fig. 17-28). PEDV를 공격접종한 실험 I군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 1두의 십이지장, 공장, 회장의 용모 상피세포에서 약한 반응을 보였으나 36시간과 48시간 후 2두를 부검시에 모두 십이지장, 공장, 회장의 용모 상피세포에서 강한 반응을 보였다. 또한 60시간과 72시간 후 각 3두를 부검된 실험자돈의 십이지장, 회장의 용모 상피세포에서 비교적 강한 반응을 보였으나 십이지장 점막고유층에서 미약한 반응을, 공장과 회장의 점막고유층에서 미약한 반응에서 약한 반응을 보였다.

PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군에서 공격접종 24시간과 36시간 후 각각 2두를 부검시 십이지장, 공장, 회장의 용모 상피세포에서 강한 반응이 나타났고, 탈락된 용모 상피세포에서도 강한 양성 반응이 관찰되었다. 48시간, 60시간 및 72시간 후 각각 2, 3, 3두를 부검시 십이지장, 회장의 용모상피세포에서 약한 반응이 나타났고, 십이지장, 공장의 점막고유층과 회장의 점막고유층과 Peyer's patch의 중심부에서 중등도 반응이 보였다.

전반적으로 PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군의 포유자돈의 소장에서 PEDV의 항원분포는 PEDV를 공격접종한 실험I군과 비교시 공격접종 24시간과 36시간 후에 더 강한 양성반응을 보였으나 48시

간, 60시간 및 72 시간 후에는 더 약한 양성 반응을 보였다. 또한 PCV2를 공격접종 한 실험 III군과 대조군의 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 특이적인 PED의 병리조직학적 변화가 관찰되지 않았다.

고 찰

PCV2는 전 세계적으로 발생되고 있는 어유자돈의 전신소모성증후군(post weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)의 원인체로 뿐만 아니라, 돼지 피부염 및 신장증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS), 호흡기질병 복합증후군(porcine respiratory disease complex, PRDC), 증식성 괴사성 폐렴(proliferative and necrotizing pneumonia, PNP) 및 번식장에 등을 포함한 다양한 PCV2 관련된 증후군이나 복합체 질환(porcine circovirus disease, PCVD)의 원인체로도 주목받고 있다(Allan 등, 1998; Rosell 등, 2000; Allan과 Ellis, 2000; West 등, 1999). 돼지 유행성 설사는 PCVD, 모돈의 유사산 질병과 더불어 양돈 생산성에 가장 큰 피해를 입히는 질병이다. 특히 국내에서는 PEDV로 인한 피해가 심각하여 매년 상당수의 자돈이 폐사되는 것으로 추정된다. 최근 포유자돈에서 PEDV와 PCV2의 이중감염이 보고되었고(Hirai와 Nunoya, 2006), 현장 관찰에 의하면 PCV2에 감염된 포유자돈에서 PEDV 재감염시 심각한 설사 양상을 나타내었다. 더불어 PCV2는 포유자돈이 PEDV 감염의 과정과 연관된 것으로 제기되었다(Jung 등, 2006). 본 연구에서는 국내 뿐만 아니라 전 세계적으로 문제를 일으키는 PCVD인 PCV2와 돼지 유행성 설사병인 PEDV의 복합감염에 대한 병인을 구명하기 위하여 포유자돈에 PEDV와 PCV2를 단독 또는 복합으로 접종하여 경시적으로 임상검사, 병리학적 검사사 및 면역조직화학적 검사를 실시하였다.

PED는 모든 연령에서 100%의 발병율을 보이며 급성의 심한 수양성 설사, 구토, 식욕부진, 원기저하 등의 임상증상을 나타내며 7일령 미만의 포유자돈에서는 50~100%의 폐사율을 야기한다고 알려져 있다(Pijpers 등, 1993). PEDV인 CV777을 2~3일령의 초유를 포유하지 않은 SPF자돈에 경구접종하면 22~36시간의 잠복기를 거쳐 구토 및 설사를 일으키지만 야외에서는 생후 12~24시간이면 설사를 시작한다고 보고되었다(DeBouck 등, 1981; DeBouck과 Pensaert, 1980; Cou-

Table 1. Clinical signs, mortality and body weight variation of piglets after challenged

Groups	Clinical signs						Mortality (%)	Body weight variation (kg)				
	0 ^{b)}	24	36	48	60	72		24	36	48	60	72
Group I ^{a)}	~ ^{c)}	+	++	++	+++	+++	1/12 ^{e)} (8.3)	~0.13	~0.27	~0.39	~0.37	~0.36
	0 ^{d)}	i	ii	iii	iii D	ii						
Group II	~	++	+++	+++	+++	+++	3/12(25)	~0.22	~0.36	~0.37	~0.41	~0.45
	0	ii	iii	iii	iii	iii						
Group III	~	~	~	~	~	~	0/11(0)	0.15	0.20	0.23	0.32	0.40
Group IV	~	~	~	~	~	~	0/5(0)	0.13	0.17	0.27	0.30	0.38

^{a)}Group I: Piglets were challenged with PEDV, Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV, Group III: Piglets were challenged with PCV2, Group IV: Piglets were administrated with sterile saline

^{b)}Hours post~ inoculation

^{c)}Feces= ~; normal, +; mild diarrhea, ++; moderate diarrhea, +++; severe diarrhea

^{d)}Depression and anorexia=0; normal, i; mild, ii; moderate, iii; severe. @; vomiting, D; died, ^{e)}No. of died piglets/No. of tested piglets



Fig. 1. Small intestine of piglet challenged with PEDV alone showing congestion of serosal surface.

Fig. 2. Small intestine of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing congestion of serosal surface and ballooning appearance by distention of lumen contained with gas.

Fig. 3. Small intestine of piglet challenged with PCV2 alone showing normal appearance.

Fig. 4. Small intestine of piglet administrated with sterile saline showing normal appearance.

ssement 등, 1982). 실험기간 동안 실험군 및 대조군의 포유자돈의 분변상태, 원기, 식욕, 구토, 폐사 등 관찰된 임상증상은 Table 2와 같다. 본 연구에서 PEDV를 공격접종한 실험 I군의 포유자돈은 공격접종 후 1일째 또는 2일째부터 설사변 또는 수양성 설사를 나타내어 1~2일간 지속되었고 원기소실과 식욕감퇴는 공격접종 후 1일째부터 나타났고 6두에서 구토 증상도 나타났으며 공격접종 후 3일째에 1두가 폐사하여 8.3%

(1/12)의 폐사율을 보였다. 이에 반해 PEDV와 PCV2를 복합접종한 실험 II군의 포유자돈은 공격접종 후 1일째부터 심한 수양성 설사를 나타내어 2일간 지속되었으며 구토, 원기소실, 식욕절폐는 공격접종 후 1일째부터 심하게 나타났으며 공격접종 후 2일째와 3일째에 3두가 폐사하여 25.0%(3/12)의 폐사율을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 PEDV와 PCV2 복합접종한 실험 II군은 PEDV 단독접종한 실험 I군에 비해 임상증상의 가

Table 2. Histopathological findings in the small intestine of piglets challenged with PEDV alone or combination with PCV2

Groups	Villi																			
	VH : CD ratio					Atrophy					Fusion					Congestion				
	24 ^{b)}	36	48	60	72	24	36	48	60	72	24	36	48	60	72	24	36	48	60	72
Group I ^{a)}	6~7:1 (1/2 ^{c)})	4~5:1 (2/2)	3:1 (2/2)	2~3:1 (3/3)	2:1 (3/3)	~+ ^{d)} (1/2)	+	+++	++	+++	~+	++	+++	++	+++	~+	++	++	+++	+++
Group II	5~6:1 (2/2)	3~5:1 (2/2)	2~3:1 (2/2)	2:1 (3/3)	1:1 (3/3)	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
Group III	7:1 (2/2)	6~7:1 (2/2)	7:1 (2/2)	6~7:1 (2/2)	7:1 (3/3)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(3/3)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(3/3)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(3/3)
Group IV	6~7:1 (1/1)	6~7:1 (1/1)	6~7:1 (1/1)	6~7:1 (1/1)	6~7:1 (1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)

^{a)}Group I: Piglets were challenged with PEDV, Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV, Group III: Piglets were challenged with PCV2, Group IV: Piglets were administrated with sterile saline

^{b)}HPC=Hours postchallenge

^{c)}No. of pigs with histopathological lesions/No. of tested pigs

^{d)}~; Without normal limits, ±; slight, +; mild, ++; moderate, +++; intensive



Fig. 5. Duodenum of piglet challenged with PEDV alone showing mild atrophy of villi. H&E, × 100.



Fig. 6. Duodenum of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing severe atrophy of villi with loss of cillium and desquamation of epithelial cell. H&E, × 100.

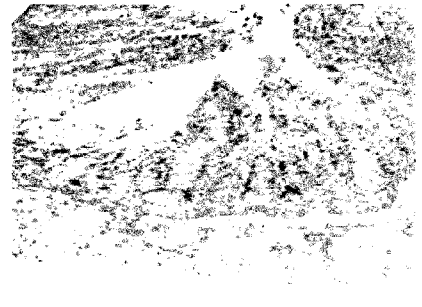


Fig. 7. Jejunum of piglet challenged with PEDV alone showing mild atrophy and edema of villi. H&E, × 100.



Fig. 8. Jejunum of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing severe atrophy of villi with desquamation of epithelial cell. H&E, × 100.

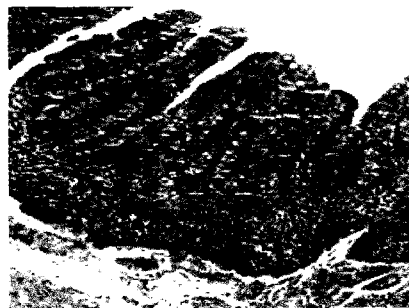


Fig. 9. Ileum of piglet challenged with PEDV alone showing mild atrophy and fusion of villi. H&E, × 100.

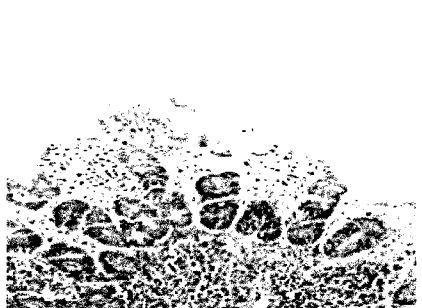


Fig. 10. Ileum of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing severe atrophy and fusion of villi. H&E, × 100.

중과 폐사율이 현저히 높아지므로 PCV2 복합접종에 의해 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다. 포유자돈의 체중변화는 복합접종군은 단독감염군 비해 더 많은 감소를 보였고 심한 설사에 의한 탈수와 식욕절폐에 의하여 신속한 체중 감소를 일으킨 것으로 생각된다.

PEDV에 감염된 포유자돈을 육안적으로 검사하면 위내에는 소화되지 않은 응유괴로 팽만되어 있고 소장 내에도 소화되지 않은 응유괴를 함유한 수양성 장관내용물로 충만되어 장벽이 심하게 얇아져서 장관내용물이 보인다고 하였다(DeBouck 등, 1981; DeBouck과 Pen-



Fig. 11. Duodenum of piglet challenged with PCV2 alone showing normal appearance. H&E, × 100.

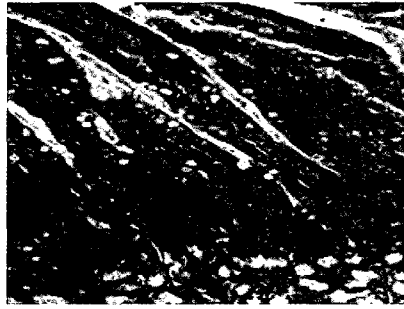


Fig. 12. Duodenum of piglet administered with sterile saline showing normal appearance. H&E, × 100.



Fig. 13. Jejunum of piglet challenged with PCV2 alone showing normal appearance. H&E, × 100.

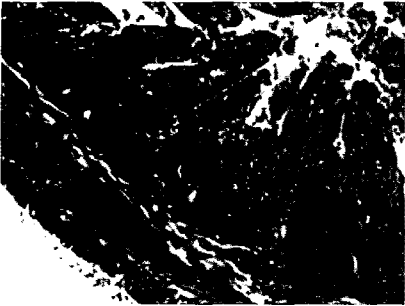


Fig. 14. Jejunum of piglet administered with sterile saline showing normal appearance. H&E, × 100.



Fig. 15. Ileum of piglet challenged with PCV2 alone showing normal appearance. H&E, × 100.



Fig. 16. Ileum of piglet administered with sterile saline showing normal appearance. H&E, × 100.

Table 3. Immunohistochemical findings in piglets challenged with PEDV alone or combination with PCV2

Groups	PEDV antigen														
	Duodenum					Jejunum					Ileum				
	24 ^{b)}	36	48	60	72	24	36	48	60	72	24	36	48	60	72
Group I ^{a)}	++ ^{d)} (1/2 ^{c)}	+++ (2/2)	++ (2/2)	++ (3/3)	++ (2/3)	++ (1/2)	++ (2/2)	++ (2/2)	+++ (3/3)	++ (3/3)	++ (1/2)	++ (2/2)	+++ (2/2)	+++ (3/3)	++ (3/3)
Group II	+	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	+++
Group III	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(3/3)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(3/3)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(2/2)	~(3/3)
Group IV	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)	~(1/1)

^{a)}Group I: Piglets were challenged with PEDV, Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV, Group III: Piglets were challenged with PCV2, Group IV: Piglets were administered with sterile saline

^{b)} ~; Without normal limits, ±; slight, +; mild, ++; moderate, +++; intensive

^{c)}No. of pigs with immunohistochemical lesions/No. of tested pigs

^{d)}HPC=Hours postchallenge

saert, 1980; Coussement 등, 1982). 본 연구에서 PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 위내에는 소화되지 않은 응유괴로 팽만되어 있고 소장내에도 소화되지 않은 응유괴를 함유하였으며 소장의 장막면 혈관의 암자적색으로 충혈되어 있었고, 48시간 후 2두를 부검시 장간막 림프절의 충혈, 소장의 가스가 차있어 심하게 팽만되어 장

내용물이 관찰될 정도로 장막이 얇아져 있었고, 60시간 후 폐사된 자돈 소장의 장간막 혈관의 충혈, 맹장과 결장내에는 수양성 내용물이 다량 차 있었다. 전반적으로 PEDV와 PCV2 복합접종군은 PEDV 단독접종군 비해 감염초기에 심한 육안소견을 보였으며 감염중후기에는 유사한 육안소견을 보였다. 이러한 결과는 PEDV와 PCV2 복합감염에 의해 PED의 발병을 영향



Fig. 17. Duodenum of piglet challenged with PEDV alone showing a few of positive cells of PEDV antigen in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

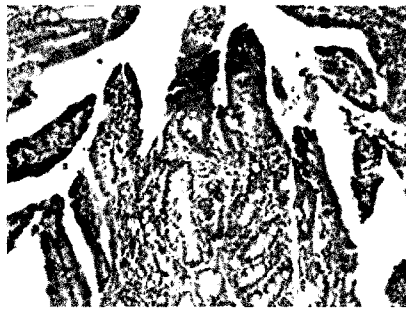


Fig. 18. Duodenum of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing a amount of positive cells of PEDV antigen in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

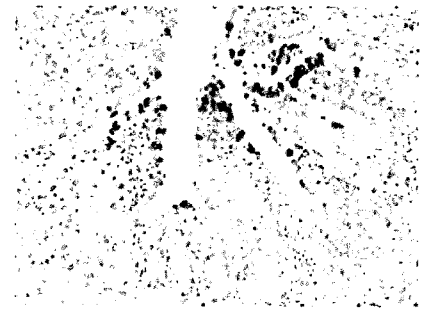


Fig. 19. Jejunum of piglet challenged with PEDV alone showing a few of positive cells of PEDV antigen in the lamina propria. ABC, $\times 100$.



Fig. 20. Jejunum of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing many numbers of positive cells of PEDV antigen in the lamina propria. ABC, $\times 100$.



Fig. 21. Ileum of piglet challenged with PEDV alone showing a few of positive cells of PEDV antigen in the lamina propria. ABC, $\times 100$.



Fig. 22. Ileum of piglet challenged with PEDV combination with PCV2 showing many numbers of positive cells of PEDV antigen in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

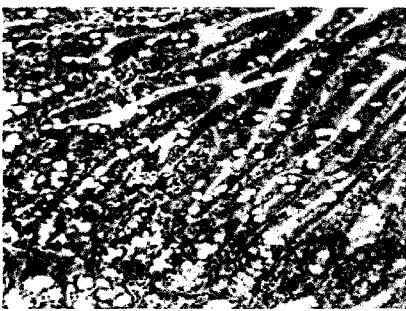


Fig. 23. Duodenum of piglet challenged with PCV2 alone showing negative reaction in the lamina propria. ABC, $\times 100$.



Fig. 24. Duodenum of piglet administrated with sterile saline showing negative reaction in the lamina propria. ABC, $\times 100$.

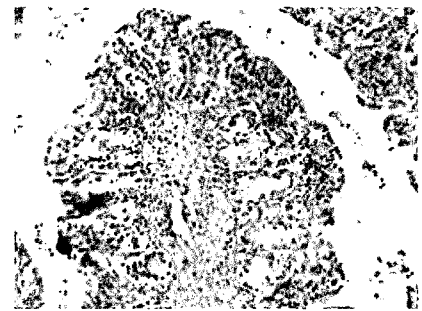


Fig. 25. Jejunum of piglet challenged with PEDV alone showing negative reaction in the lamina propria and crypt. ABC, $\times 100$.

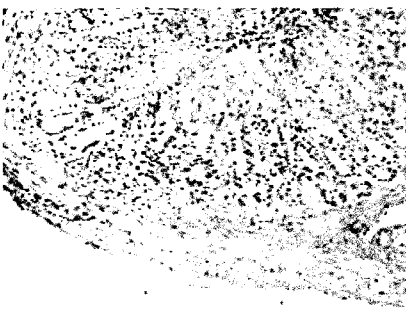


Fig. 26. Jejunum of piglet administrated with sterile saline showing negative reaction in the lamina propria. ABC, $\times 100$.



Fig. 27. Ileum of piglet challenged with PEDV alone showing negative reaction in the lamina propria and Peyer's patch. ABC, $\times 100$.



Fig. 28. Ileum of piglet administrated with sterile saline showing negative reaction in the lamina propria and villi. ABC, $\times 100$.

을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

PEDV의 전형적인 병리조직학적 소견으로 소장용모의 위축이 특징적이며 용모:음와 길이의 비율이 7:1에서 3:1로 되나 심한 경우에는 1:1까지도 되며 용모상피세포는 공포화가 심하게 형성되거나 편평상피세포화 되고 때로는 완전히 탈락되며 점막고유층에는 림프구의 침윤이 나타난다고 보고되었다(DeBouck 등, 1981; 津田, 1999; Sueyoshi 등, 1995). 설사는 소장의 용모상피세포가 변성, 괴사되어 용모의 위축과 탈락에 따른 소화흡수장애로 인하여 장관내에서 소화되지 못하였거나 흡수되지 않은 내용물에 의해 장내 삼투압이 상승하여 장관벽에서 장관내로 수분이 빠져 나오는 작용에 의하여 야기된다(황 등, 1994). 본 연구에서 PEDV만을 단독접종시킨 실험 I군에서 접종 24시간 후 2두를 부검시 1두의 십이지장과 공장용모의 가벼운 충혈, 위축을 보였고, 용모:음와 길이의 비율이 6~7:1로 관찰되었다. 반면에 PEDV와 PCV2를 복합감염시킨 실험 II군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 십이지장, 공장, 회장은 용모의 충혈, 위축을 보였고 용모:음와 길이의 비율이 5~6:1로 관찰되었으며 감염초기에 복합접종군은 단독접종군에 비해 더 심한 병리조직학적 손상을 일으킨 것으로 추정된다. 또한 실험 중후반에서도 단독접종군에 비해 더 심한 병리조직학적 소견을 보였으며 용모:음와 길이의 비율도 더 낮게 보였다. PEDV와 PCV2 복합감염에 의해 소장점막의 용모상피세포에 대한 PEDV의 파괴가 더 신속히 그리고 강력하게 이루어진 것으로 사료된다.

Guscetti 등(1998)은 면역조직학적 염색은 항원과 항체의 검출 및 분포에 있어서 ELISA, IFA 등의 검사방법보다 우수하여 많이 이용되어 있다고 보고하였다. Kim 등(1999)은 10두의 PEDV에 감염돼지에서 면역염색을 실시하였으며 장 상피세포의 세포질에서 양성 반응을 나타내었으며 양성 세포는 공장 및 회장의 위축 및 용합된 용모의 말단부 가장자리에 따라 분포하였다. 본 연구에서 소장조직내 항원의 분포를 확인하고자 파라핀 포매된 조직을 면역조직화학염색을 실시하였는데 PEDV를 단독접종한 실험 I군은 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 1두의 십이지장, 공장, 회장의 용모 상피세포에서 약한 양성 반응을 보였지만 PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군은 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 모두의 십이지장, 공장, 회장의 용모 상피세포에서 강한 반응을 보였다. 감염초기의 복합접종군은 단독접종군에 비해 소장용모가 더 큰 손상

을 받은 것으로 추정된다. 접종후 36시간, 48시간에서는 단독접종군에서 강한 양성반응을 보였지만 복합접종군은 모든 공장, 회장에서 강한 반응을 보였으며 탈락된 용모 상피세포에서도 강한 양성 반응 보였다. 접종후 60시간, 72시간의 감염후기에 복합접종군은 공장의 점막고유층에서 중등도 양성 반응을 보였으며 단독접종군에 비해 전반적으로 양성 세포의 분포가 현저하게 떨어져 있는 것으로 관찰되었다. 이는 복합접종군의 용모의 심함 탈락, 위축 및 용합에 의하여 소장의 표면적이 감소되어 바이러스의 복제할 수 있는 공간이 부족하므로 바이러스 양성 세포가 줄어든 것으로 생각된다.

결 론

포유자돈에 PCVD 원인체의 PCV2와 포유자돈 바이러스 설사병인 PEDV를 자돈에 감염시켜 돼지썩코바이러스 2형이 돼지유행성설사에 미치는 영향을 관찰하고자 임상검사, 병리학적 검사 및 면역조직화학적 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

임상증상에서 PEDV와 PCV2 복합접종한 실험 II군은 PEDV 단독접종한 실험 I군에 비해 감염초기부터 더 신속한 발병을 보였으며, 감염 전과정에서 더 심한 임상증상과 현저히 높은 폐사율을 보였다.

병리학적 검사에서 PEDV와 PCV2를 복합접종한 실험 II군은 감염초기에 단독접종군 비해 용모:음와 길이의 비율이 더 낮게 보였고 감염과정에서 단독접종군 비해 심한 병리조직학적 손상을 일으켰다.

면역조직화학적 검사에서 PEDV와 PCV2 복합접종한 실험 II군은 감염초기에 PEDV 단독접종군 비해 PEDV가 많이 분포되었고 실험 후기에는 단독접종군에 비해 바이러스도 적게 분포되었다.

이상의 결과에서 PEDV와 PCV2를 복합감염시킨 포유자돈은 단독감염시킨 포유자돈에 비하여 심한 임상 및 병리조직학적 소견을 보여 돼지썩코바이러스 2형과 돼지유행성 설사를 더욱 심화시키는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

김종만, 허원, 권창희 김종염 우승룡. 1998. 난황항체를 이용한 돼지 대장균 설사증 방제기법 개발 I. 대장균 pilus 항원과

- LT로 면역시킨 닭의 면역반응. *대한수의학회지* 38: 829-836.
- 박남용, 조경오, 조성수, 하영공. 1993. 돼지 유행성 설사 바이러스의 분리 동정. *대한수의학회지* 29: 360-365.
- 박봉균, 한경수, 류광수, 김준영, 정현규. 1998. 돼지 유행성 설사 병(porcine epidemic diarrhea)의 상제화에 대한 혈청학적 증명. *대한수의학회지* 38: 818-822.
- 황의경, 김재훈, 진영화, 배유찬, 윤순식, 박희규, 권창희, 윤용덕, 엠 액커만. 1994. 돼지 流行性 泄瀉症의 最近 發生 動向. *農業科學論文集* 36: 587-596.
- Allan GM, Ellis JA. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12(1): 3-14.
- Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C. 1998. Novel Porcine circoviruses from pigs with wasting diseases syndromes. *Vet Rec* 142(17): 467-468.
- Chasey D, Cartwright SF. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. *Res Vet Sci* 25: 255-256.
- Coussement W, Ducatelle R, DeBouck P. 1982. Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. I. Histological and histochemical study. *Vet Pathol* 19(1): 46-56.
- Darwich L, Segalées J, Mateu E. 2004. Pathogenesis of post-weaning multisystemic wasting syndrome caused by porcine circovirus 2: an immune riddle. *Arch Virol* 149: 857-874.
- DeBouck P, Pensaert M, Coussement W. 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs experimentally induced by coronavirus-like agent CV777. *Vet Microbiol* 6: 157-165.
- DeBouck P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am J Vet Res* 41: 219-223.
- Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM, Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Hassard L, Martin K, McNeilly F. 2000. Coinfection by porcine acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12: 21-27.
- Guscetti F, Bernasconi C, Tobler K, Van Reeth K, Pospischil A, Ackermann M. 1998. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(3): 412-414.
- Hirai T, Nunoya T. 2006. Infectivity of porcine circovirus 1 and circovirus 2 in primary porcine hepatocyte and kidney cell cultures. *J Vet Med Sci* 68(2): 179-182.
- Jung K, Ha Y, Ha SK, Kim J, Choi C, Park HK, Kim SH, Chae C. 2006. Identification of porcine circovirus type 2 in retrospective cases of pigs naturally infected with porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet J* 171(1):166-168.
- Kim O, Chae C, Kweon CH. 1999. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues. *J Vet Diagn Invest* 11(5): 458-462.
- Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, Ringler S, Rings DM, Allan G. 2001. Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus 2 (PCV2). *Vet Pathol* 38: 31-42.
- Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. 2000. Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37: 254-263.
- Kweon CH, Kwon BJ, Jung TS. 1993. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res* 33: 249-254.
- Kyriakis SC, Saoulidis K, Lekkas S, Miliotis ChC, Papoutsis PA, Kennedy S. 2002. The effects of immunomodulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 126: 38-46.
- Pensaert MB and DeBouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58: 243-247.
- Pensaert MB, DeBouck P, Reynolds DJ. 1981. An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent CV777 and several corona-viruses. *Arch Virol* 68: 45-52.
- Pensaert MB. 1999. Porcine epidemic diarrhea. In: Disease of swine, 8 eds. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA: 179-185.
- Pensaert MB. 2000. Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory corona virus. In: Disease of swine, 8 eds. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA: 295-325.
- Pijpers A, van Nieuwstadt AP, Terpstra C, Verheijden JH. 1993. Porcine epidemic virus as a cause of persistent diarrhea in a herd of breeding and finishing pigs. *Vet Rec* 132(6):129-131.
- Rosell C, Segalées J, Rovira A. 2000. Porcine circovirus type 2 and postweaning multisystemic wasting syndrome already present in Spain in 1986. Proc. 16th IPVS Cong., Melbourne, Australia, pp. 631.
- Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, Yoshida K, Nakazawa M, Sato K, Minami T, Iwashita K, Watanabe M, Suzuki Y. 1995. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhea. *J Comp Path* 113(1):59-67.
- 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.
- West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S,

McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA. 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet*

Diagn Invest 11: 530-532.

津田知幸. 1999. 豚流行性下痢. 豚病學, 第四版, 近代出版, 東京: 260-266.