



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)



博士學位論文

제주도 내 Porcine Circovirus  
Associated Disease의 발생상황  
조사 및 병리학적 연구

濟州大學校 大學院

獸醫學科

康相哲

2011年 12月

제주도 내 Porcine Circovirus  
Associated Disease의 발생상황  
조사 및 병리학적 연구

指導教授 金 哉 勳

康 相 哲

이 論文을 獸醫學 博士學位 論文으로 提出함

2011年 12月

康相哲의 獸醫學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

委 員 \_\_\_\_\_

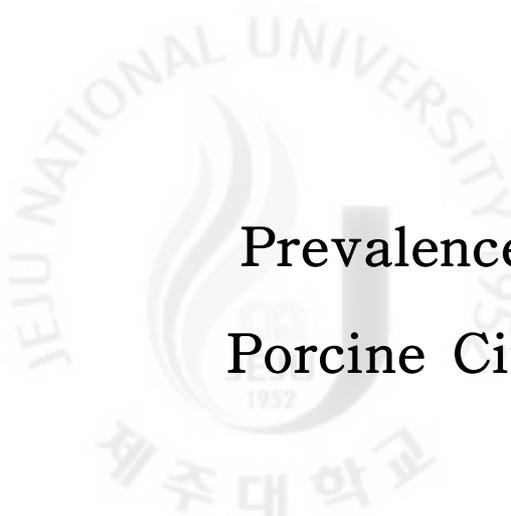
濟州大學校 大學院

2011年 12月

# 목 차

Abstract .....	iii
List of Tables .....	v
List of Figures .....	ix
총 설 .....	1
제 1 장. 제주도 내 PCVAD의 발생상황 및 역추적 조사 연구 .....	7
I. 서 론 .....	8
II. 재료 및 방법 .....	10
III. 결 과 .....	15
IV. 고 찰 .....	32
제 2 장. 제주도 내 돼지에서 PCV2 유전자형 2a 및 2b의 분포 .....	36
I. 서 론 .....	37
II. 재료 및 방법 .....	39
III. 결 과 .....	42
IV. 고 찰 .....	47

제 3 장. PCVAD 돼지에서 괴사성 림프절염에 대한 병리학 적 연구 .....	49
I. 서    론 .....	50
II. 재료 및 방법 .....	52
III. 결    과 .....	59
IV. 고    찰 .....	72
총    결    론 .....	76
참고문헌 .....	78
요    약 .....	95

The logo of Jeju National University is a circular emblem. It features a stylized flame or sunburst in the center, with the year '1952' below it. The text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY' is written in an arc at the top, and '제주대학교' is written in Korean at the bottom.

# Prevalence and Pathological Study of Porcine Circovirus Associated Disease in Jeju

Sang-Chul Kang

(supervised by professor Jae-Hoon Kim)

Department of Veterinary Medicine

Graduate School, Jeju National University, Jeju, Korea

## Abstract

Porcine circovirus type 2 (PCV2) has become a highly important viral pathogen for the pig industry worldwide since it was recognized to be a causative agent for porcine circovirus associated disease (PCVAD).

To investigate the prevalence of PCVAD, this study was carried out using pigs in Jeju submitted to the Laboratory of Veterinary Pathology, Jeju National University. From 1,003 pigs reviewed, 313 pigs (31.2%) were diagnosed as PCVAD in Jeju. Clinically, the most characteristic clinical signs were wasting and respiratory signs such as dyspnea. Based on the pathological examinations, interstitial pneumonia and/or lymphoid depletion are predominant lesions in PCVAD pigs. A combination of PCV2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus was the most prevalently diagnosed. Based on the polymerase chain reaction (PCR) using paraffin embedded tissues, the first case of PCV2 infection was detected in 1995 in Jeju.

Recent epidemiological studies in many countries demonstrated a global shift of the main PCV2 genotypes from PCV2a to PCV2b in the occurrence of PCVAD. To determine the prevalence of PCV2a and PCV2b, 375 pigs were examined using PCR method. PCV2a and PCV2b were detected in 44.0% and 98.7%, respectively. The percentage of PCV2b-positive pigs was gradually increased from 2003 to 2005, and was 100% for recent six years in Jeju.

Necrotizing lymphadenitis can be found in pigs naturally infected with PCV2. In this study, 20 pigs (6.4%) showed necrotizing lymphadenitis between 2003 and 2010 in Jeju. According to the result of immunohistochemistry, lymphoid depletion in PCVAD pigs with necrotizing lymphadenitis is more severe than in other pigs without this lesion. Lymphoid necrosis in these pigs may closely related to vascular damage with thrombosis caused by heavy PCV2 antigen burden.

---

Key words : immunohistochemistry, necrotizing lymphadenitis, PCR, PCVAD, PCV2a, PCV2b



## List of Tables

### Chapter 1

Table 1-1. Oligonucleotide primer pairs for the detection of PCV2 .....	13
Table 1-2. Annual prevalence of PCVAD pigs in Jeju from 2003 to 2010 .....	16
Table 1-3. Prevalence of PCVAD pigs by month in Jeju from 2003 to 2010 .....	17
Table 1-4. Prevalence of PCVAD pigs by ages in Jeju from 2003 to 2010 .....	17
Table 1-5. Regional distribution of PCVAD pigs in Jeju .....	18
Table 1-6. Frequency of clinical signs in PCVAD pigs .....	19
Table 1-7. Frequency of gross findings in PCVAD pigs .....	20

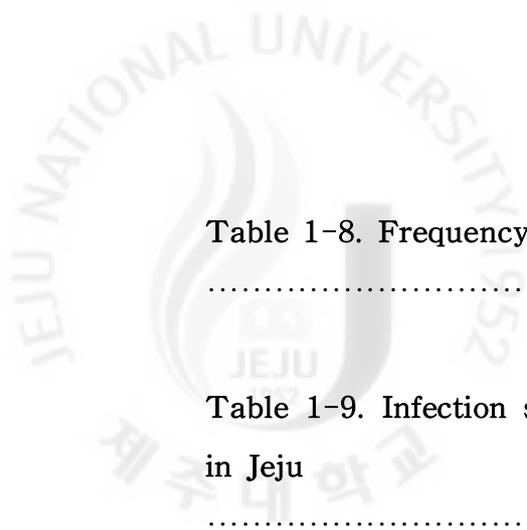


Table 1-8. Frequency of histopathologic lesions in PCVAD pigs  
..... 22

Table 1-9. Infection statue of PCV2 and other pathogens in PCVAD pigs  
in Jeju  
..... 24

Table 1-10. Results of PCR and IHC to detect PCV2 using porcine  
paraffin embedded tissues  
..... 26

## Chapter 2

Table 2-1. Proposed nomenclature for the subclassification of PCV2 [75]  
..... 38

Table 2-2. Oligonucleotide primer pairs to differentiate between PCV2a  
and PCV2b  
..... 40

Table 2-3. Annual prevalence of PCV2a and 2b in field porcine tissues  
..... 43

Table 2-4. Detection of PCV2a and 2b in porcine aborted fetuses  
..... 45

Table 2-5. Annual prevalence of PCV2a and 2b in suckling pigs  
..... 45

Table 2-6. Annual prevalence of PCV2a and 2b in weaned pigs  
..... 46

Table 2-7. Annual prevalence of PCV2a and 2b in growing and finisher  
pigs  
..... 46

### Chapter 3

Table 3-1. Design for experimental groups  
..... 52

Table 3-2. Histopathologic scoring system of necrotizing lymphadenitis  
in pigs  
..... 53

Table 3-3. Oligonucleotide primer pairs for the detection of ADV  
..... 54

Table 3-4. Primary antibodies for the detection of PCV2 and PRRSV  
..... 56

Table 3-5. Primary antibodies to evaluate the cellular populations in porcine lymph node

..... 56

Table 3-6. IHC scoring system for viral antigens in lymph node sections

..... 57

Table 3-7. Annual prevalence of necrotizing lymphadenitis in PCVAD pigs

..... 59

Table 3-8. Results of histopathologic scoring, amounts of PCV2 and PRRSV nucleic acid, and vWF labeling in lymph nodes of experimental pigs

..... 62

Table 3-9. Mean number of immuno-positive cells in porcine lymph nodes of each group

..... 63



## List of Figures

### Literature Review

Fig 1. Proposed outline for the pathogenesis of natural porcine circovirus type 2 infection [96].  
..... 3

### Chapter 1

Fig. 1-1. Annual prevalence of PCVAD pigs in Jeju from 2003 to 2010.  
..... 16

Fig. 1-2. Regional distribution of PCVAD pigs in Jeju.  
..... 18

Fig. 1-3. PCVAD piglet. The piglet showed growth retardation and rough hair coat (arrow).  
..... 29

Fig. 1-4. Note fail to collapsed lung with rubbery consistency and well-demarcated apical consolidation.  
..... 29

Fig. 1-5. The inguinal lymph nodes in abdominal cavity were severely enlarged.

..... 29

Fig. 1-6. The lung showed severe diffuse interstitial pneumonia with peribronchiolar fibroplasia. H&E. Bar=100  $\mu\text{m}$ .

..... 29

Fig. 1-7. Note peribronchiolar fibroplasia with segmentation (arrow) of affected bronchiole. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 30

Fig. 1-8. The lymph node showed severe lymphoid depletion and loss of basic architecture in lymphoid follicles. H&E. Bar=100  $\mu\text{m}$ .

..... 30

Fig. 1-9. Severe lymphoid depletion with marked histiocytic replacement was observed in lymphoid follicles. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 30

Fig. 1-10. Many multinuclear giant cells were infiltrated in lymph node. H&E. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

..... 30

Fig. 1-11. Spherical, basophilic inclusion bodies of PCV2 were found in the cytoplasm of histiocytic cells. H&E. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

..... 31

Fig. 1-12. Multifocal infiltration of lympho-histiocytic cells was observed in the myocardium. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 31

Fig. 1-13. Note perivascular cuffing of lympho-histiocytic cells in the brain. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 31

Fig. 1-14. Lympho-histiocytic infiltrates were present in the interstitium of renal cortex. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 31

Fig. 1-15. Mixed infected pathogens with PCV2 in PCVAD pigs in Jeju (A: Virus, B: Bacteria and parasite).

..... 25

Fig. 1-16. PCR products of PCV2 from porcine paraffin embedded tissues. Lane M: 1 kb DNA ladder; lane 1~7: tissue samples; lane 8: positive control; lane 9: negative control.

..... 26

## Chapter 2

Fig. 2-1. PCR products of PCV2a and PCV2b from porcine tissue homogenates. Lane M: 1 kb DNA ladder; lane 1~6: porcine tissue samples; lane 7: PCV2a positive control; lane 8: PCV2a negative control; lane 9~14: porcine tissue samples; lane 15: PCV2b positive control; lane 16: PCV2b negative control.

..... 42

Fig. 2-2. Diagram for annual prevalence of PCV2a and 2b in Jeju.

..... 44

## Chapter 3

Fig. 3-1. The mesenteric lymph nodes were severely enlarged.

..... 69

Fig. 3-2. Cut surface of the mesenteric lymph nodes. Multiple red foci were observed in the lymph nodes.

..... 69

Fig. 3-3. The superficial inguinal lymph nodes showed marked swelling and multiple red foci.

..... 69

Fig. 3-4. Well-demarcated coagulation necrosis with marked congestion was found in lymph node. H&E. Bar=500  $\mu\text{m}$ .

..... 70

Fig. 3-5. Note mixed population of inflammatory cells, necrotic cellular debris and hemorrhage in necrotic area. H&E. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

..... 70

Fig. 3-6. Numerous basophilic inclusion bodies of PCV2 were observed in the necrotic area. H&E. Bar=20  $\mu\text{m}$ . Insert: Note PCV2 specific grape-like intracytoplasmic inclusion bodies in macrophage. H&E. Bar=10  $\mu\text{m}$ .

..... 70

Fig. 3-7. Severe vascular congestion, edema and hemorrhage were found in the necrotic area. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 70

Fig. 3-8. Large blood vessel showed eosinophilic fibrinoid degeneration of vascular wall and intra-vascular thrombosis. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 71

Fig. 3-9. Widespread endothelial and intravascular labeling of vWF in dilated blood vessels including high endothelial venules. IHC. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 71

Fig. 3-10. Note diffuse positive reaction for numerous PCV2 antigens in the necrotic area. IHC. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

..... 71

Fig. 3-11. Multinucleated giant cells showed strong positive reactions for PCV2 antigen in lymph node. IHC. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

..... 71

Fig. 3-12. Numbers of CD3 positive T cells in lymph nodes of each group by IHC. Bar=50  $\mu\text{m}$ . \*\*P<0.01.

..... 64

Fig. 3-13. Numbers of CD79a positive B cells in lymph nodes of each group by IHC. Bar=50  $\mu\text{m}$ . \*\*P<0.01.

..... 65

Fig. 3-14. Numbers of lysozyme positive macrophages in lymph nodes of each group by IHC. Bar=50  $\mu\text{m}$ . \*P<0.05, \*\*P<0.01.

..... 66

## 총 설

돼지 썬코바이러스(Porcine circovirus, PCV)는 Circoviridae과, *Circovirus*속에 속하며, 직경 약 17 nm 크기에 외피(envelope)가 없는 단일가닥의 환상 DNA 바이러스이다 [9]. 본 바이러스는 다양한 동물종에 대해 혈구응집능이 없으며, 산성조건(pH 3.0)이나 클로로포름(chloroform) 또는 고온(70°C, 15분)에서도 불활화 되지 않는 저항성을 가지는 것으로 알려져 있다 [92]. PCV 이외에 *Circovirus*속으로 분류되는 바이러스에는 앵무새에서 깃털의 소실과 발톱의 기형을 유발하는 psittacine beak and feather disease virus (PBFDV)를 비롯하여 canary circovirus, goose circovirus 및 pigeon circovirus 등이 있다 [75]. 닭에서 빈혈과 면역억제를 유발하는 chicken anemia virus는 PCV와 같은 Circoviridae 과에 포함되나 *Gyrovirus*속이며 바이러스 입자의 크기가 약 25 nm로 PCV보다 더 크다 [33]. 또한 Nishizawa 등 [72]은 수혈후간염(posttransfusion hepatitis) 환자의 혈청에서 Circoviridae의 특징을 가진 바이러스 입자를 검출하였고, 이를 TT virus로 명명하여 사람 유래의 썬코바이러스가 존재함을 보고한 바 있다.

PCV는 1974년 돼지 신장세포주(porcine kidney-15 cell line, PK-15 [ATCC-CCL 33])에 오염된 바이러스 입자를 picornavirus 유사 바이러스로 분리 보고 하면서 알려졌다 [9]. 그 후 분리된 바이러스에 대한 병원성 실험 결과 돼지에서는 특정 질병을 유발하지 않는 비병원성 바이러스로 확인되었다 [104]. 그러나 1990년 후반 위축 및 성장부전을 특징으로 하는 이유후 전신 소모성 증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)의 증상을 보인 이유자돈에서 PCV 유사 바이러스가 분리되었다 [8, 28, 70]. PMWS 발병돈에서 분리된 PCV는 돼지 신장세포주에서 분리된 기존의 PCV와 유전적, 항원적 특성이 서로 상이하여 PCV2로 명명하였다 [36, 67].

두 바이러스는 전체적으로 비슷한 유전적 구조를 가지고 있지만, 세부적으로 차이가 있는 것으로 보고되어 있다. PCV1의 유전자는 총 1,759개의 핵산(nucleotides, nt)으로 구성되어 있으며, 7개의 open reading frame (ORF)이 있는

것으로 확인되었다 [66]. PCV2는 1,767~1,768 nt로 구성되어 PCV1에 비해 핵산의 수가 더 많고, 6개 혹은 11개 ORF를 가지는 것으로 보고되었다 [36, 67, 70]. 다양한 ORF 중에서 두 바이러스의 ORF1과 ORF2의 유전자 염기서열 및 아미노산 배열을 비교 분석한 결과 바이러스 복제와 관련이 있는 ORF1에 대한 유전자 염기서열의 상동성(homology)은 83%였으며, 아미노산 배열의 상동성은 86%로 확인되었다. 그리고 구조단백질 형성에 관여하는 ORF2의 경우 유전자 염기서열의 상동성은 67%였으며, 아미노산 배열의 상동성은 65%로 낮은 일치율을 보였다 [70].

PCV2는 구비강을 통한 직접 접촉, 분변 및 뇨를 통해서도 감염되는 것으로 알려져 있다 [34, 75]. 또한 정액 [37, 53]과 유·사산 태아의 장기 [73, 109]에서도 PCV2 핵산이 검출되어 바이러스의 수직전파가 가능한 것으로 확인되었다. 이처럼 PCV2의 다양한 감염 경로가 밝혀지고 있음에도 불구하고 바이러스 감염에 의한 PCVAD의 발병기전(pathogenesis) 및 바이러스 복제와 관련된 주요 숙주세포는 아직 명확히 규명되지 않았다 [75, 96]. PCV2에 자연 감염되었을 때 바이러스의 1차 증식은 편도 혹은 국소림프절과 같은 림프조직의 큰포식세포(macrophage) 및 항원제시세포(antigen-presenting cell)에서 이루어지는 것으로 추정되고 있다 [96]. 증식한 바이러스는 림프와 말초혈액을 통해 전신 장기로 확산되며, 림프구 고갈(lymphoid depletion)과 말초 혈액의 림프구감소증(lymphopenia)은 PCVAD 돼지의 가장 일반적인 특징이다 [75]. 이러한 림프구 감소의 원인으로서는 골수에서의 림프구 생성 감소, 2차 림프 조직 내 림프구 증식 감소 또는 바이러스에 의한 괴사(necrosis) 혹은 세포자멸사(apoptosis)에 의한 림프구 소실 등이 가설로 제시되었으나, 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않은 상황이다 [75]. PCV2에 감염된 돼지에서 발생하는 다양한 질병들은 Fig. 1과 같다 [96].

최초로 PCV2 감염으로 알려진 질병은 PMWS이다 [39, 40]. PMWS는 1996년 Harding 및 Clark에 의해 캐나다에서 발생한 증례에서 처음 보고되었으며 [39], 이후 미국 [70], 스페인, 덴마크, 북아일랜드를 비롯한 유럽 [7, 8]과 한국, 일본 등 아시아에서도 발생이 확인되었다 [2, 17, 74]. PMWS는 5~12주령의 돼지에서 발생하고 주로 위축, 호흡곤란(dyspnea), 황달(icterus), 설사(diarrhea) 등의 임상 증상이 나타난다 [24, 39, 40]. 이환율(morbidity)과 폐사율(mortality)은 질병이

발생한 돈군의 분리사육 정도 및 발생단계에 따라 차이가 있으며 급성으로 발생하는 경우 폐사율이 10%에 육박하기도 한다 [39]. PCV2에 자연 감염된 돼지의 10~30% 정도가 PMWS로 발병하며, PMWS 돼지는 1차 림프기관(가슴샘) 및 2차 림프기관(림프절, 비장, 편도)의 림프구 고갈이 가장 특징적인 조직학적 소견이었다 [24, 39]. 최근 림프절 고갈 외에 기존의 림프절 병변과는 다른 괴사성 림프절염(necrotizing lymphadenitis)이 PCVAD 돼지의 병변 중 하나로 보고된 바 있다 [96].

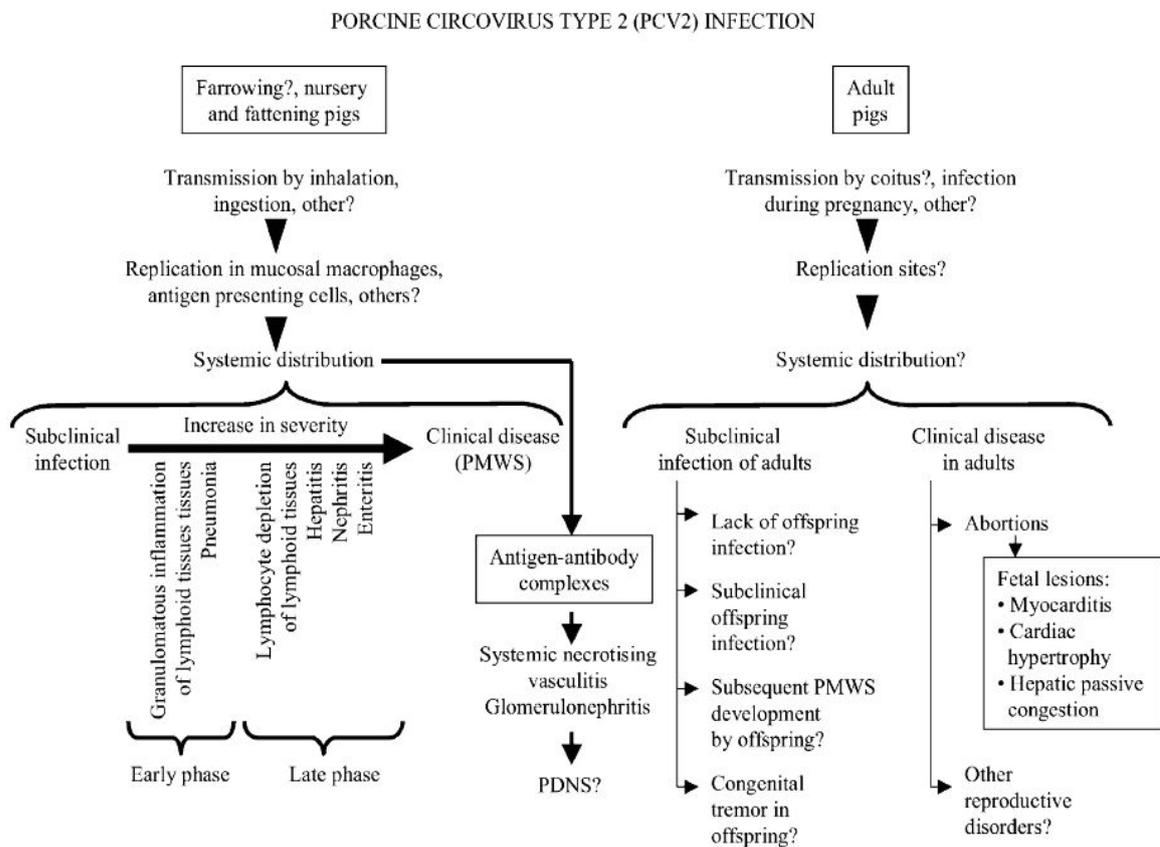


Fig 1. Proposed outline for the pathogenesis of natural porcine circovirus type 2 infection [96].

PMWS외에도 PCV2는 돼지 산업에 큰 경제적 영향을 끼치는 다양한 질병에 관여하고 있음이 알려졌다. 선천성 진전증(congenital tremor, CT)은 myoclonia congenita, trembles 및 jumpy pig disease로도 불리며, 뇌와 척수의 수초저형성(hypomyelination)을 특징으로 하는 포유자돈의 선천성 질병이다 [25, 110]. 이환된 돼지는 전신적인 진전 증상을 보이며, 특히 머리와 사지의 진전이 심하고 수면 중에는 증상이 감소하는 경향이 있다. CT는 발생원인 및 조직병변에 따라 6가지 유형으로 구분된다. 이 중 바이러스 감염에 의한 것은 type A I 과 A II 이며, 전자는 돼지열병바이러스(classical swine fever virus, CSFV)의 수직감염에 의해 발생한다 [25]. Type A II는 북미 지역에서 가장 일반적으로 발생하는 유형으로 1994년 Hines와 Lukert가 최초로 CT와 PCV2와의 상관성을 보고한 이래 PCV2가 type A II CT의 주요 원인체인 것으로 보고되었다 [19, 25, 99]. 그러나 최근 Kennedy 등 [44]은 기존의 보고와 상반되는 주장을 제기하였으며, 아직까지 PCV 감염에 따른 CT 발생은 논란의 여지가 남아 있다 [96].

돼지 피부염 및 신증 증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS)은 1993년 영국에서 최초로 보고되었다 [26]. 다발성의 피부병변, 체중 감소, 다리부종, 혈관염(vasculitis), 사구체신염(glomerulonephritis)을 특징으로 하며, 육성기와 비육기 돼지에서 집중적으로 발생하는 질병이다 [26, 92]. 본 질병이 보고된 초기에는 원인 미상의 질병으로 알려졌으나, 특이적인 병리조직학적 및 면역학적 소견에 따라 전염성 병원체의 감염에 의해 형성된 면역복합체장애(immune-complex disorder)가 주요 병인으로 대두되었다 [13, 26, 92, 102]. PDNS를 유발할 수 있는 병원체로는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 뿐만 아니라 [102], *Pasteurella (P.) multocida*, *Streptococcus (S.) suis* type 1 및 2, *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Haemophilus (H.) parasuis*, *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. 등의 다양한 세균이 본 질병의 주요 원인체로 제시된 바 있다 [103]. PDNS로 진단된 돼지에서 PCV2의 검출은 2000년 Rosell 등 [87]에 의해 처음 보고되었다. Wellenberg 등 [107]은 사례대조군연구(case-control study)를 통하여 PDNS 돼지는 PCV2 항원이 100% 검출될 뿐

아니라 PCV2 항체 역가가 과도하게 높은 것을 확인하였다. 따라서 높은 역가의 항체와 PCV2 항원이 동시에 돼지 체내에 존재하고 있기 때문에 면역복합체 형성이 용이하게 되며 피부와 신장에 특징적인 PDNS 병변을 형성한다고 보고하였다 [107].

최근에는 PCV2가 돼지 호흡기 복합 증후군(porcine respiratory disease complex, PRDC)에서도 중요한 병원체로 관여하고 있음이 제시되었다 [41, 48]. PRDC는 14~22주령의 육성·비육돈에서 발생하는 다인성 질병(multifactorial diseases)으로 성장 지연, 사료 효율 저하, 무기력, 식욕부진, 발열, 기침 및 호흡 곤란과 같은 임상증상이 특징이다 [38, 48, 101]. PRDC 돼지의 폐렴은 PRRSV, 돼지 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus), 돼지 호흡기 코로나 바이러스(porcine respiratory corona virus), 돼지 거대세포 바이러스(porcine cytomegalovirus) 등과 같은 바이러스와 *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* 및 *P. multocida*, *S. spp.*, *H. parasuis*, *A. pleuropneumoniae* 등의 다양한 세균이 복합적으로 감염되어 발생한다 [38, 41].

2006년 American Association of Swine Veterinarians (AASV)에서는 PMWS를 비롯하여 PCV2 감염으로 발생하는 다양한 질병군을 통칭하여 돼지 써코바이러스 관련 질병(porcine circovirus associated disease, PCVAD)이라고 명명하기를 제안하였다 [34, 75]. 본 질병 명칭 개정에 대한 근거로 기존 PMWS의 ‘wasting’이라는 용어는 1) 일반적으로 체중 감소(weight loss)의 의미로 사용되어 왔고 2) 체중 혹은 증체율 감소라는 용어는 PMWS 뿐 아니라 다양한 감염성 및 비감염성 질병에 광범위하게 사용되고 있으며 3) 프리온에 의해 사슴에서 발생하는 만성소모성질병(chronic wasting disease)의 ‘wasting’과는 다른 의미를 내포하고 있으므로 PCV2 감염증에서 ‘wasting’ 용어의 사용은 부적절한 것으로 판단하였다. 또한 PCV2 감염에 의한 질병 중 PMWS가 가장 빈번하게 발생하고 피해도 큰 대표적인 질병이기는 하지만, PMWS라는 질병명 만으로는 다른 PCV2 감염 질병의 모든 특징을 대표할 수는 없기 때문인 것으로 판단하였다 [75]. 비슷한 맥락으로 유럽에서 Segalés 등 [97]은 porcine circovirus diseases (PCVD)라는 통합된 명칭을 제안하여 사용하고 있다.

국내의 타 지역 상황과 마찬가지로 제주도 소재 양돈 농장에서도 PCVAD가 근절되지 못하고 있으며, 다른 병원체들과 복합 감염되어 경제적인 피해가 지속되고 있다. 그러나 이에 대한 체계적인 연구는 아직 미흡한 실정으로 제주도 내 PCVAD 발생상황을 비롯한 PCV2에 대한 기초 연구가 필요한 시점이다.

따라서 본 연구는 제주도 사육 돼지의 과거 시료를 역추적 조사하여 PCV2 감염에 의한 PCVAD의 발생상황을 다양한 측면에서 분석하고 본 질병의 병리학적 특징에 대하여 연구하였다. 또한 PCV2 두 가지 유전자형의 검출 정도를 연도별로 조사하여 제주도 돼지에서 바이러스 유전자형의 분포와 변화상의 특징을 규명하고자 하였다. 최근에는 PCV2 감염으로 발생할 수 있는 괴사성 림프절염이 주목받고 있는 상황이다. 따라서 병리학적 연구를 통하여 림프절 괴사 병변의 특징을 확인하고 그 발병기전을 분석하고자 하였다.



## 제 1 장

# 제주도 내 PCVAD의 발생상황 및 역추적 조사 연구

Prevalence and Retrospective Study of PCVAD  
in Jeju

## I. 서 론

PCV2는 1991년 캐나다 서부에서 최초로 발생한 이후 전 세계적으로 문제시 되고 있는 PMWS의 원인체이다 [9, 28, 70]. 돼지 혈청을 대상으로 하여 역추적 조사를 실시한 결과, 벨기에에서는 1969년, 영국에서는 1970년, 아일랜드에서는 1973년, 캐나다 및 스페인에서는 1985년부터 PCV2에 대한 항체가 확인되고 있어 PCV2는 질병 보고 이전에 이미 존재하던 것으로 확인되었다 [34]. 또한 유럽에서는 PMWS가 발생하는 농장을 대상으로 PCV2 항체를 검사한 결과, 96~100% 돼지에서 양성을 보였으며, PMWS 병력이 없는 농장에서도 항체가 검출되기도 하였다 [85, 106]. 이와 같은 결과를 토대로 특정 임상증상의 발현과 관계없이 PCV2가 오래전부터 광범위하게 만연되어 있었을 것으로 확인되었다. 국내에서는 1998년에 최초로 PMWS 발생이 보고되었다 [2, 60]. Lyoo 등 [59]은 1998년부터 2000년까지 호흡기 증상이 있는 총 86두의 돼지를 검사한 결과, 1998년, 1999년 및 2000년에 각각 40.0%, 41.2% 및 59.3%가 PCV2 항원 양성임을 확인하였다.

PCV2는 림프절 병변을 특징으로 하는 전신감염(systemic infection), 폐렴(pneumonia), 장염(enteritis), 번식장애(reproductive failure), PDNS, 신경병증(neuropathy) 등 다양한 유형의 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한 일부의 림프절에만 국소 감염되어 임상증상이 나타나지 않는 무증상감염(subclinical infection)도 PCV2 감염 유형 중 하나로 알려져 있다 [34, 75, 91]. 최근 이러한 PCV2 감염에 의한 다양한 질병 유형을 통칭하여 PCVAD로 명명하였다 [34, 75].

PCVAD의 다양한 질병 중 임상적으로 가장 일반적인 유형은 PMWS이다 [34, 91]. PCVAD의 다양한 임상 증상은 PCV2의 단독 감염보다 기타 바이러스 및 세균의 복합적인 감염을 통해 이루어지는 것이 일반적이다. 또한 다른 병원체와의 중복 감염은 면역 숙주세포의 증식으로 인해 바이러스 감염을 증진시키게 된다 [76]. 따라서 중복 감염은 단독 감염에 비해 더욱 심각한 임상 증상 및 조직학적 변화를 초래하게 된다 [3, 76]. PCV2와 가장 빈번하게 중복 감염되는 병원체는 PRRSV로 알려져 있다 [43, 76, 79, 81].

일반적으로 PCVAD의 진단은 특징적인 임상증상 발현과 림프절을 비롯한 장기 내 PCV2 항원을 검출함으로써 이루어진다. PCVAD를 진단하기 위해서는 1개 이상의 림프 조직(림프절, 편도, 비장), 1개의 림프 조직과 1개의 다른 장기(폐장, 간, 신장, 장) 또는 2개 이상의 서로 다른 계통의 장기에서 PCV2 항원의 검출이 필요하다. 또한 매우 심한 병리조직학적 병변을 가진 개체라 할지라도 항원이 극히 제한적으로 검출된다면, 이러한 경우는 만성적인 PCVAD로 판단할 수 있다 [75]. PCV2 항원 검출법으로는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) [2, 54], 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC) [12, 88, 98], 제자리부합법(in-situ hybridization, ISH) [17, 88], 형광항체법 (fluorescent antibody test, FA) [2, 65], 전자현미경법 [2] 및 바이러스 분리 [2] 등 다양한 기법들이 보고되어 있다.

PCVAD 진단에서 조직학적 병변은 항원의 검출과 함께 매우 결정적인 역할을 하는 중요한 요소이다. PCVAD의 가장 특징적인 소견은 림프조직 내 림프여포(lymphoid follicle)의 림프구 고갈과 조직구 침윤(histiocytic cell infiltration)에서 육아종성 염증(granulomatous inflammation)에 이르기까지 일련의 만성적인 염증 반응이다 [96]. 폐장에서는 간질성 폐렴(interstitial pneumonia)과 기관지 또는 세기관지 주위 섬유화(peribronchial or peribronchiolar fibrosis)가 특징적으로 나타난다 [96].

국내 양돈 산업에서 PCVAD는 지속적인 경제적 손실을 야기하고 있으며, 이에 따라 본 질병에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 제주도 지역의 경우 그 연구 성과가 매우 미흡한 실정으로 이 질병에 대한 체계적인 조사와 질병 발생 상황에 대한 정확한 분석이 요구되고 있다.

본 연구는 2003년부터 2010년까지 야외에서 의뢰된 돼지 시료를 대상으로 제주도 내 PCVAD의 발생 상황을 조사하였다. 아울러 PCVAD 발생의 역학적 특징, 주요 임상증상, 다른 병원체와의 중복 감염 여부 및 병리학적 특징 등을 다양한 측면에서 분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### 임상 및 병리학적 검사에 의한 제주도 내 PCVAD 발생상황 조사

#### 1. 공시동물

2003년부터 2010년까지 병성감정을 위해 제주도 소재 양돈 농장으로부터 제주대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 총 1,003두 돼지를 실험에 공여하였다. 이 중 임상증상 및 병리학적 검사를 통해 PCVAD로 진단된 시료를 선정하여 제주도 내 PCVAD의 발생상황을 조사하였다. PCVAD로 진단된 시료는 연도별, 월별, 연령별, 지역별, 임상증상별로 구분하여 정리하였다.

검사 돼지에 감염된 병원체 진단을 위하여 PCV2는 PCR과 IHC를 수행하였다. PCR은 Larochelle 등 [54]이 제시한 primer를 사용하였으며, IHC는 rabbit anti-PCV2 antibody (Iowa State University, USA)를 이용하였다. PRRSV 항원 검사는 역전사효소 PCR (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) 및 mouse anti-PRRSV (SDOW17) antibody (South Dakota State University, USA)를 이용하여 IHC를 실시하였다. 유산태자에서 뇌심근염 바이러스(encephalomyocarditis virus, EMCV)의 검사는 혈구응집억제시험(hemagglutination inhibition test, HI)을 통해 항체가를 측정하고 RT-PCR로 항원을 검사하였다. 그 외 바이러스는 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test) 또는 PCR을 수행하였다. 세균은 부검 시 확인한 병변 조직에서 소량의 시료를 채취하여 sheep blood agar plate (HANIL KOMED, Korea) 및 MacConkey agar plate (BD Difco, USA)에 도말하였다. 도말을 마친 배지는 37°C에서 24~48시간 동안 배양하였다. 그 밖에 *Salmonella* spp.는 추가로 rambach agar plate (Merck, Germany)를 사용하였으며, *A. pleuropneumoniae*와 *H. parasuis*는 chocolate agar plate (HANIL KOMED, Korea)에 도말한 후 candle jar를 이용하여 균체를 분리하였다.

## 2. 병리학적 검사

2003년부터 2010년에 병성감정을 위해 의뢰된 돼지는 일반적인 부검술식에 준하여 외관을 검사한 다음 흉강과 복강을 노출하여 각 장기의 병변을 확인하였다. 특히 PCVAD 병변이 호발하는 것으로 알려져 있는 림프절 및 폐장 등은 육안적 소견을 면밀하게 살펴 병변을 기록하였다. 병변이 확인된 각 장기의 일부는 10% 중성완충포르말린 용액에 고정하였다. 고정이 완료된 조직은 병변부위를 세절한 뒤 일반적인 조직처리 방법에 따라 파라핀 포매하여 3~4  $\mu\text{m}$  두께로 절편을 제작한 다음 hematoxylin and eosin (H&E) 염색을 실시하였다. 염색이 끝난 절편은 봉입 후, 광학현미경(Olympus BX51, Japan)을 이용하여 검경하였다.

# 제주도 돼지의 파라핀 블록을 이용한 PCV2 항원의 역추적 조사

## 1. 공시동물

1994년부터 1998년까지 제주대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 총 43두 돼지의 파라핀 블록을 실험에 공여하였다. 각 개체별로 폐장 및 림프절이 포함된 블록을 선별하였다.

## 2. PCR

### 1) 검사 시료의 핵산 추출

DNA 바이러스인 PCV2에 대한 PCR을 위해 파라핀 블록 절편으로부터 핵산을 추출하였다. 각 블록으로부터 오염되지 않은 조직절편을 채취하기 위해 박절기(microtome)와 박절기용 칼날은 3% 과산화수소수(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 및 70% 에탄올 희석액을 이용하여 표면에 부착되어 있는 이물질을 제거하였다. 파라핀 블록의 표면은 장기간 외부 환경에 노출되면서 조직 내 DNA가 변성될 수 있으므로 박절 시 표면 조직을 제거한 뒤, 이후의 조직 절편을 핵산 분리용 시료로 선택하였다. 절편은 약 10  $\mu$ m 두께로 제작하였으며, 개체 당 3~5개의 절편을 멸균된 1.5 ml eppendorf tube에 넣어 핵산 추출 전까지 실온에서 보관하였다.

DNA 추출은 TaKaRa DEXPAT<sup>TM</sup> (TaKaRa, Japan)을 이용하였다. 절편이 들어있는 1.5 ml eppendorf tube에 0.5 ml의 DEXPAT<sup>TM</sup>액을 가하고 잘 혼합한 다음, 100°C에서 10분간 방치하였다. 열처리가 끝난 시료는 바로 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 시료는 상층액 표면에 형성된 파라핀 층을 조심스럽게 눌러 DNA가 포함된 상층액 약 70  $\mu$ l 정도를 추출하여 새로운 1.5 ml eppendorf tube로 옮겼다. 최종 추출물은 검사 전까지 -70°C에서 보관하였다.

## 2) Oligonucleotide primer의 염기서열

PCV2의 검출을 위한 primer는 Larochelle 등 [54]이 제시한 염기서열에 준하여 제작하였다(Cosmogenetech, Korea; Table 1-1).

Table 1-1. Oligonucleotide primer pairs for the detection of PCV2

Agent	Primer	Sequences(5' to 3')	Position (bp)
PCV2	CF8	TAG GTT AGG GCT GTG GCC TT	263
	CR8	CCG CAC CTT CGG ATA TAC TG	

## 3) PCR 반응조건

PCV2의 검출을 위해 추출한 DNA 2  $\mu$ l와 각각의 primer 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17  $\mu$ l를 PCR premix (Maxime PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR 조건은 95°C에 5분간 반응한 다음 95°C, 65°C 및 72°C에 각각 1분씩 35회 반복하고 최종 72°C에서 10분간 반응하였다 [54]. PCR 증폭은 PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였다.

## 4) PCR 증폭산물의 확인

반응 종료 후, 각각의 반응액 7  $\mu$ l씩을 취하여 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시한 다음 ethidium bromide 용액(0.5  $\mu$ l/ml in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator (Mupid-Scope WD, TaKaRa, Japan)로 PCV2에 대한 특이적인 밴드 유무를 확인하였으며, 증폭산물을 확인하기 위하여 1 Kb<sup>+</sup> DNA Ladder (SolGent, Korea)를 molecular size marker로 이용하였다.

### 3. IHC

조직 내 PCV2 항원의 분포를 확인하고자 EnVision™ peroxidase-conjugated polymer reagent (Dako, Denmark)를 이용하여 IHC를 수행하였다. 각 조직은 4~5  $\mu\text{m}$  두께로 박절하여 silane coating micro slides glass (MUTO PURE CHEMICALS, Japan)에 부착하였다. 조직 절편이 완전히 부착된 다음, 일반적인 조직처리 방법으로 탈파라핀 및 함수과정을 거쳐 자연적으로 존재하는 peroxidase를 제거하기 위하여 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 10분간 반응하였으며, 항원성의 부활을 위해 0.05% proteinase XIV (Sigma, USA)로 37°C에서 20분간 반응하였다. 1차 항체로 rabbit anti-PCV2 antibody를 antibody diluent solution (DAKO, USA)에 1:1,000의 농도로 희석한 다음 절편에 적하하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 그 후 EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (EVN) reagent (DAKO, Denmark)를 적하하여 37°C에서 40분간 반응하였다. 각 단계별로 반응 후에는 PBS로 10분씩 2회에 걸쳐 수세하였다. 모든 반응이 끝난 절편은 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB; DAKO, Denmark)로 발색시킨 후, 3차 증류수에서 반응을 종결하였다. 대조염색은 Mayer's hematoxylin (Sigma, USA)으로 핵염색 하였으며, 탈수와 투명과정을 거쳐 봉입하였다. 염색이 끝난 조직 슬라이드는 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 양성 대조군 및 음성 대조군과 비교하여 항원의 존재 여부를 관찰하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 임상 및 병리학적 검사에 의한 제주도 내 PCVAD 발생상황 조사

##### 1. PCVAD의 발생상황

2003년부터 2010년까지 제주도 소재 양돈 농장으로부터 의뢰된 총 1,003두 돼지에 대해 PCVAD 발생상황을 조사한 결과, 313두(31.2%)가 PCVAD로 진단되었다. 최종 PCVAD로 진단된 질병으로는 유산, 포유자돈의 선천성 진전증, 이유자돈의 PMWS 및 육성·비육돈에서 PCV2 감염에 의한 호흡기 질병인 PRDC가 포함되어 있다.

PCVAD로 진단된 돼지를 연도별로 분류하여 발생상황을 살펴본 결과, 2003년부터 해가 갈수록 PCVAD의 발생이 점차 증가하여 2006년(49.6%)에 가장 높은 발생률을 나타내었다. 2007년에는 2006년과 대체로 유사한 발생 빈도로 보이고 있었으나, 그 이후에는 지속적으로 감소하여 2010년(14.0%)의 경우 검사가 시작된 2003년(19.2%)보다 발생률이 감소하였다(Table 1-2, Fig. 1-1).

Table 1-2. Annual prevalence of PCVAD pigs in Jeju from 2003 to 2010

Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
No. of pigs	78	91	126	135	138	114	185	136	1,003
No. of PCVAD	15	25	33	67	65	39	50	19	313
%	19.2	27.5	26.2	49.6	47.1	34.2	27.0	14.0	31.2

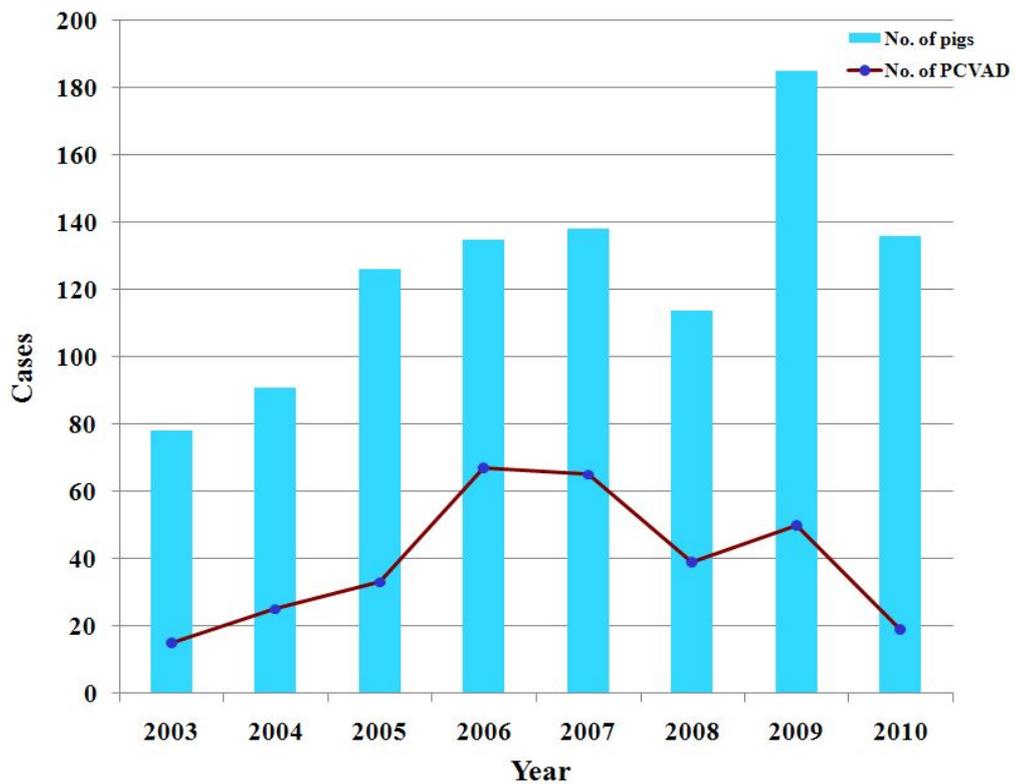


Fig. 1-1. Annual prevalence of PCVAD pigs in Jeju from 2003 to 2010.

PCVAD로 진단된 돼지를 월별로 분류하여 살펴본 결과, 제주도에서는 본 질병이 대체로 연중 고르게 발생하고 있었다. 그러나 겨울철에서 봄철로 이어지는 환절기에 해당하는 3월 및 4월에 PCVAD의 발생이 좀 더 높은 경향을 나타내었다 (Table 1-3).

Table 1-3. Prevalence of PCVAD pigs by month in Jeju from 2003 to 2010

Month	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No. of pigs	15	18	38	39	23	18	31	28	25	29	26	23
%	4.8	5.8	12.1	12.5	7.3	5.8	9.9	8.9	8.0	9.3	8.3	7.3

돼지의 연령을 일반적인 생활사에 준하여 발육 단계별로 포유자돈, 이유자돈, 육성돈 및 비육돈을 구분하여 PCVAD의 발생정도를 살펴본 결과, 이유자돈이 237두(75.7%)로 가장 많았으며, 육성돈은 57두(18.2%)로 그 다음으로 많았다 (Table 1-4).

Table 1-4. Prevalence of PCVAD pigs by ages in Jeju from 2003 to 2010

Ages	Suckling	Weaned	Growing	Finisher
No. of pigs	12	237	57	3
%	3.8	75.7	18.2	1.0

제주도 전 지역을 2011년 현재 제주시와 서귀포시의 두 행정구역(Table 1-5) 및 읍면동 단위(Fig. 1-2)로 세분하여 PCVAD의 발생상황을 조사한 결과, 한림읍이 포함된 제주시(62.9%)가 서귀포시(37.1%)보다 높은 발생을 보였다.

Table 1-5. Regional distribution of PCVAD pigs in Jeju

City	Jeju-si	Seogwipo-si
No. of pigs	197	116
%	62.9	37.1

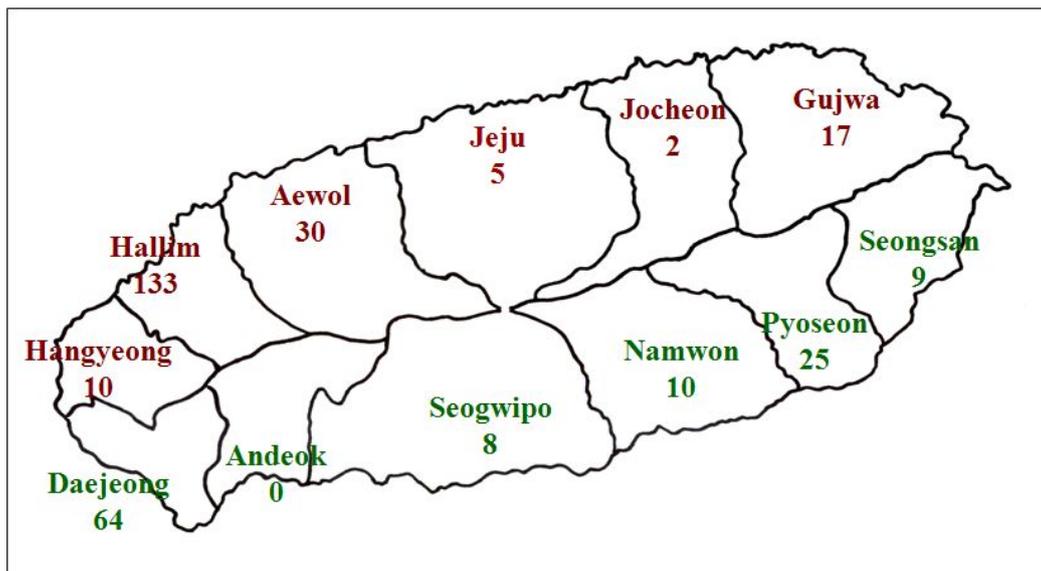


Fig. 1-2. Regional distribution of PCVAD pigs in Jeju.

PCVAD의 주요 임상증상으로는 위축, 호흡곤란, 설사, 기침, 신경증상 등이 주로 관찰되었다. 이 중에서 피모가 거칠고 역립되어 있으며, 척추의 가시돌기가 현저하게 노출되는 위축이 207두(66.1%)로 PCVAD의 가장 주된 임상증상이었다 (Table 1-6, Fig. 1-3).

Table 1-6. Frequency of clinical signs in PCVAD pigs

Clinical sign	No. of pigs	%
Wasting	207	66.1
Dyspnea	149	47.6
Diarrhea	107	34.2
Cough	34	10.9
Nervous sign	17	5.4
Lameness	6	1.9
Abortion	4	1.3
Skin lesion	2	0.6

## 2. 병리학적 검사

PCVAD로 진단된 돼지에서 육안소견을 관찰한 결과, 주로 폐장과 림프절에서 병변이 확인되었다. 폐장은 거의 모든 폐엽에 걸쳐 퇴축부전 및 고무양 경도(81.5%)를 나타내었다. 또한 전복측엽(cranioventral lobe)에 다양한 크기로 자적색 또는 회색조의 경화소(63.6%)가 관찰되기도 하였다(Fig. 1-4). 전신 림프절은 고도로 종대(53.4%)되어 있었으며, 특히 서혜부 림프절(inguinal lymph node)은 정상적인 림프절에 비하여 약 3 내지 4배가량 종대되어 있었다(Fig. 1-5). 기타 장기의 변화로는 신장의 백색반점 및 정상보다 융기된 자적색조의 피부 병변이 관찰되었다(Table 1-7).

Table 1-7. Frequency of gross findings in PCVAD pigs

Organ	Gross findings	No. of pigs	%
Lymph node	Enlargement	167	53.4
Lung	Fail to collapse and rubbery consistency	255	81.5
	Consolidation	199	63.6
Kidney	White foci	50	16.0
Skin	Raised purple skin	2	0.6

PCVAD로 진단된 돼지의 주요 병리조직학적 소견은 폐장과 림프절에서 주로 관찰되었다. 폐장의 폐포벽은 단핵염증세포 침윤 및 제 2형 폐포세포(type II pneumocyte)의 증식으로 비후되고 폐포 내강이 좁아져 있는 간질성 폐렴이 확인되었다(Fig. 1-6). 일부 기관지 또는 세기관지 주위로 섬유세포의 증식(peribronchial or peribronchiolar fibroplasia)이 관찰되었으며, 증식된 섬유세포는 세기관지 내강쪽으로 증식하여 용종(polyp)을 형성하거나 때로 세기관지의 연속성이 단절되는 분절소견(segmentation)을 보이기도 하였다(Fig. 1-7). 폐장의 전복측엽에는 간질성 폐렴 소견 이외에 폐포벽의 비후가 동반되고 기관지 및 세기관지 내강에 화농성 삼출물이 들어 있는 기관지폐렴이 동반되어 있었다. 림프절 피질(cortex)의 림프여포 및 속겉질(paracortex)의 림프구는 고갈되고, 림프구가 고갈된 림프여포의 종자중심(germinal center) 및 수질(medulla)에는 조직구의 침윤으로 피질과 수질의 경계가 모호하였다(Fig. 1-8 and 9). 침윤된 조직구의 일부는 서로 융합하여 다핵거대세포(multinuclear giant cell)를 형성하기도 하였으며(Fig. 1-10), 일부 조직구의 세포질과 핵 내에는 호염성의 포도송이와 같은 특이적인 PCV2 봉입체(inclusion body)가 관찰되었다(Fig. 1-11).

PCVAD 돼지에서 주요 병리조직학적 병변의 발현빈도를 살펴본 결과, 폐장에서는 간질성 폐렴과 기관지 또는 세기관지 주위에 섬유세포의 증식이 각각 272두(86.9%) 및 169두(54.0%)로 가장 빈번하게 관찰되었다. 림프절에서는 림프구 고갈과 조직구/다핵거대세포 침윤이 각각 245두(78.3%) 및 208두(66.5%)로 가장 높게 관찰되었다. 또한 심장에서의 림프구조조직구성 심근염(lymphohistiocytic myocarditis, Fig. 1-12), 뇌의 위관성 원형세포침윤(perivascular cuffing, Fig. 1-13), 신장의 간질성 신염(interstitial nephritis, Fig. 1-14)은 40% 미만의 발현빈도를 보였다. 기타 병변은 간, 척수 및 피부 등에서 관찰할 수 있었다(Table 1-8).

Table 1-8. Frequency of histopathologic lesions in PCVAD pigs

Tissue	Histopathologic description	No. of pigs	%
Lymph node	Lymphoid depletion	245	78.3
	Histiocytic cell/ multinuclear giant cell infiltration	208	66.5
	Inclusion bodies	117	37.4
	Necrotic lymphadenitis	20	6.4
Lung	Interstitial pneumonia	272	86.9
	Peribronchial/peribronchiolar fibroplasia	169	54.0
	Necrotic bronchiolitis	53	16.9
Liver	Lymphohistiocytic hepatitis	71	22.7
Heart	Lymphohistiocytic myocarditis	120	38.3
Kidney	Interstitial nephritis	108	34.5
Brain	Perivascular cuffing	115	36.7
	Focal gliosis	14	4.5
Spinal cord	Hypomyelination	4	1.3
Skin	Necrotizing vasculitis	2	0.6

### 3. PCVAD 돼지에서 PCV2 및 다른 병원체와의 중복 감염 조사

2003년부터 2010년까지 PCVAD로 진단된 돼지에 대해 PCV2와 기타 병원체와의 중복 감염을 조사한 결과, PCV2 단독 감염에 의한 PCVAD의 발생은 28두(8.9%)에 불과하였다. 반면, 여러 가지 병원체 중에서 전신성, 호흡기 또는 소화기 질병을 유발하는 바이러스 및 세균과의 복합적인 감염이 일반적이었다. 다른 병원체와의 중복 감염은 한 마리 돼지에 2종에서 최대 5종까지 매우 복잡한 감염 양상을 보이고 있었다. 이 중 3중 감염이 148두(47.3%)로 가장 높게 나타났으며, PRRSV와 호흡기 감염 세균인 *S. spp.* 혹은 *P. multocida*의 복합 감염이 가장 빈번하였다. 병원체별로 중복 감염 빈도를 조사한 결과, 모든 병원체 중에서 PRRSV가 227두(72.5%)에서 검출되어 가장 높은 중복 감염률을 보였다. 따라서 제주 지역에서 발생한 대부분의 PCVAD에 PRRSV도 깊게 관여하고 있음이 확인되었다. 기타 바이러스로는 유산을 유발하는 EMCV, 포유자돈에서 설사를 일으키는 rotavirus 및 상부 호흡기에 감염되는 cytomegalovirus 등이 확인되었다. 세균은 호흡기 질병을 유발하는 *S. spp.* 및 *P. multocida*가 각각 104두(33.2%) 및 89두(28.4%)로 높은 중복 감염을 보이고 있었다. 소화기 질병으로는 *Salmonella typhimurium*이 67두(21.4%)로 가장 높았으며, 일부 포유 및 이유초기 자돈에서 구포자충(Coccidia)이 중복 감염되기도 하였다(Table 1-9, Fig. 1-15).

Table 1-9. Infection statue of PCV2 and other pathogens in PCVAD pigs in Jeju

Pattern	Pathogen	Year								Total (%)
		2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	
Single	PCV2*		2	1	3	1	7	10	4	28 (8.9)
2 agents	PRRSV	2	3	3	8	10	5	9	3	43 (13.7)
	Strep		1	2	2	1		2		8 (2.6)
	Sal				6		1			7 (2.2)
	APP						1	2	1	4 (1.3)
	PM	1	1					1		3 (1.0)
	Rota			2						2 (0.6)
	EMCV					1				1 (0.3)
	EC						1	1		2 (0.6)
	MH								1	1 (0.3)
	SH						1			1 (0.3)
	Coccidia				1					1 (0.3)
	Bronchop	2				1				3 (1.0)
3 agents	PRRSV+Strep	1	2	4	4	10	6	8	4	39 (12.5)
	PRRSV+PM	4	5	3	2	4	5	8		31 (9.9)
	PRRSV+Sal	2	3	7	8	2				22 (7.0)
	PRRSV+HP		1		3		3	2		9 (2.9)
	PRRSV+BB					1	1	1		3 (1.0)
	PRRSV+APP							2		2 (0.6)
	PRRSV+BH					2				2 (0.6)
	PRRSV+Arcano							1		1 (0.3)
	PRRSV+BP								1	1 (0.3)
	PRRSV+Coccidia				1					1 (0.3)
	Strep+Sal				7	4				11 (3.5)
	Strep+PM					3	1			4 (1.3)
	Strep+APP			1						1 (0.3)
	Strep+BH					1				1 (0.3)
	Strep+BP					1				1 (0.3)
	PM+Sal					1				1 (0.3)
	Sal+Cyto				1					1 (0.3)
PRRSV+Bronchop	2	2	4	1	3	2	2	1	17 (5.4)	
4 agents	PRRSV+Strep+PM	1		3	4	8	4			20 (6.4)
	PRRSV+PM+HP		5		7					12 (3.8)
	PRRSV+Strep+Sal			2	3	2				7 (2.2)
	PRRSV+PM+Sal			1		2		1		4 (1.3)
	PRRSV+Sal+BB				1	1				2 (0.6)
	PRRSV+PM+BP						1		2	3 (1.0)
	PRRSV+Strep+APP					1				1 (0.3)
	PRRSV+Sal+Coccidia				1					1 (0.3)
	PM+Strep+Sal					3			2	5 (1.6)
5 agents	PRRSV+PM+Strep+Sal				4	2				6 (1.9)
Total		15	25	33	67	65	39	50	19	313 (100)

\* Abbreviations: Cyto, cytomegalovirus; EMCV, encephalomyocarditisvirus; PCV2, porcine circovirus 2; PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus; Rota, rotavirus; Arcano, *Arcanobacterium pyogenes*; APP, *Actinobacillus pleuropneumoniae*; BB, *Bordetella bronchiseptica*; BH, *Brachyspira hyodysenteriae*; BP, *Brachyspira pilosicoli*; EC, *Escherichia coli*; HP, *Haemophilus parasuis*; MH, *Mycoplasma hyopneumoniae*; PM, *Pasteurella multocida*; Sal, *Salmonella typhimurium*; SH, *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*; Strep, *Streptococcus* spp.; Bronchop, bronchopneumonia (*Cause not determined*).

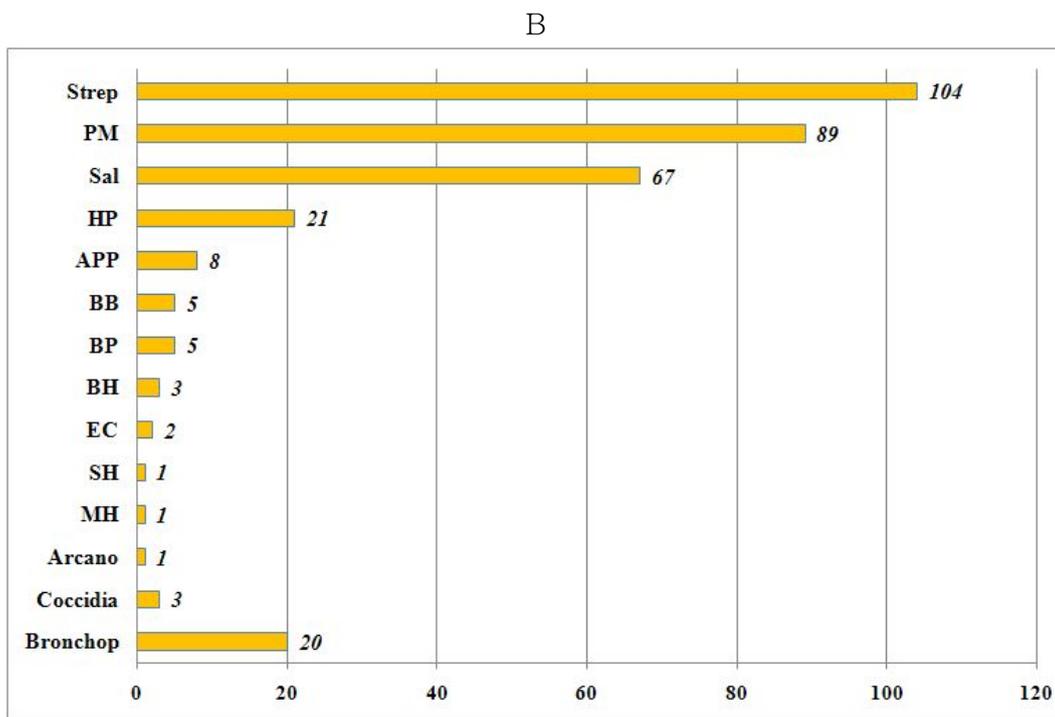
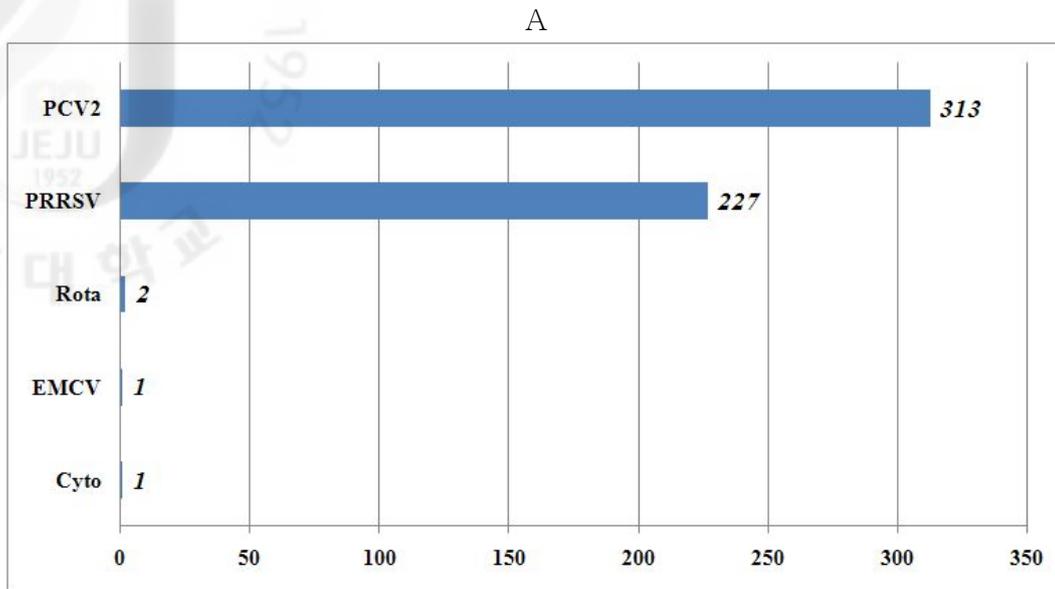


Fig. 1-15. Mixed infected pathogens with PCV2 in PCVAD pigs in Jeju (A: Virus, B: Bacteria and parasite).

## 제주도 돼지의 파라핀 블록을 이용한 PCV2 항원의 역추적 조사

1994년부터 1998년까지 의뢰된 돼지 43두의 파라핀 블록에 대한 PCR 검사 결과, 1994년 시료에서는 음성을 나타내었으나 1995년 1두(14.3%)를 시작으로 1998년까지 PCV2의 항원이 검출되었다(Table 1-10). 반면 IHC는 1998년 조직에서만 양성 반응을 나타내어 두 검사 기법의 항원 검출 민감도에 차이가 있음을 확인할 수 있었다(Table 1-10, Fig. 1-16).

Table 1-10. Results of PCR and IHC to detect PCV2 using porcine paraffin embedded tissues

Year	No. of cases	PCR		IHC
		No. of positive pigs	%	
1994	10	0	0	Negative
1995	7	1	14.3	Negative
1996	6	4	66.7	Negative
1997	10	5	50.0	Negative
1998	10	5	50.0	Positive

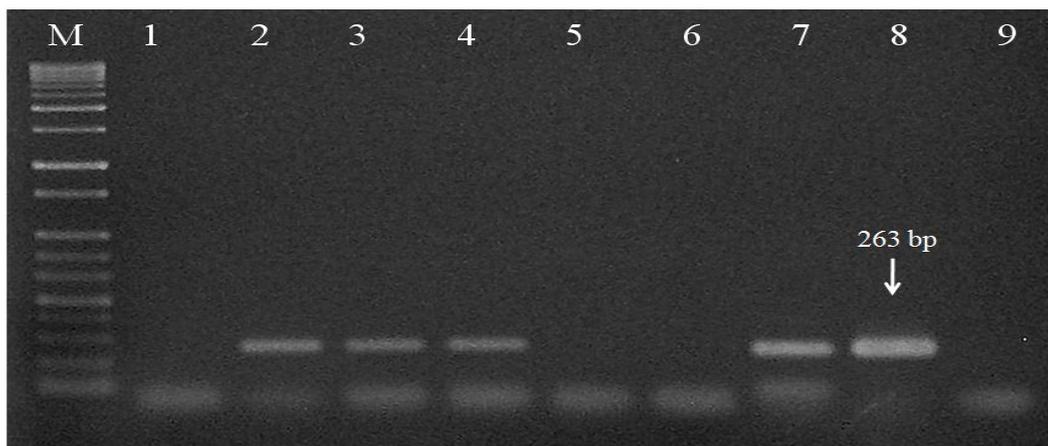


Fig. 1-16. PCR products of PCV2 from porcine paraffin embedded tissues. Lane M: 1 kb DNA ladder; lane 1~7: tissue samples; lane 8: positive control; lane 9: negative control.

## Legends for Figures

Fig. 1-3. PCVAD piglet. The piglet showed growth retardation and rough hair coat (arrow).

Fig. 1-4. Note fail to collapsed lung with rubbery consistency and well-demarcated apical consolidation.

Fig. 1-5. The inguinal lymph nodes in abdominal cavity were severely enlarged.

Fig. 1-6. The lung showed severe diffuse interstitial pneumonia with peribronchiolar fibroplasia. H&E. Bar=100  $\mu$ m.

Fig. 1-7. Note peribronchiolar fibroplasia with segmentation (arrow) of affected bronchiole. H&E. Bar=50  $\mu$ m.

Fig. 1-8. The lymph node showed severe lymphoid depletion and loss of basic architecture in lymphoid follicles. H&E. Bar=100  $\mu$ m.

Fig. 1-9. Severe lymphoid depletion with marked histiocytic replacement was observed in lymphoid follicles. H&E. Bar=50  $\mu$ m.

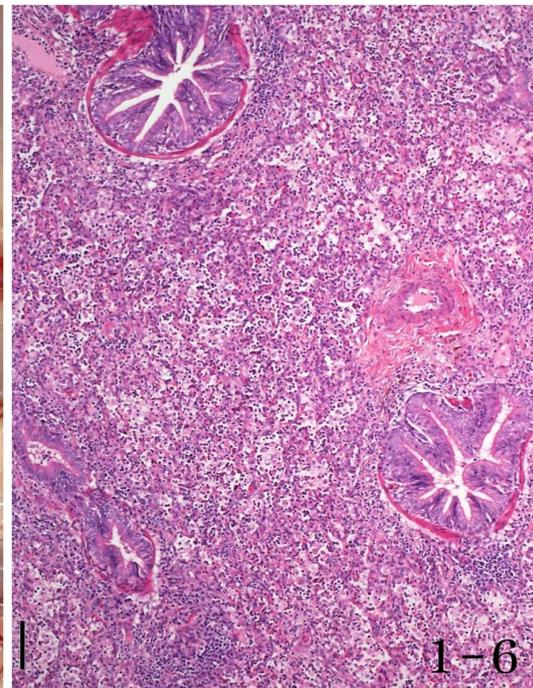
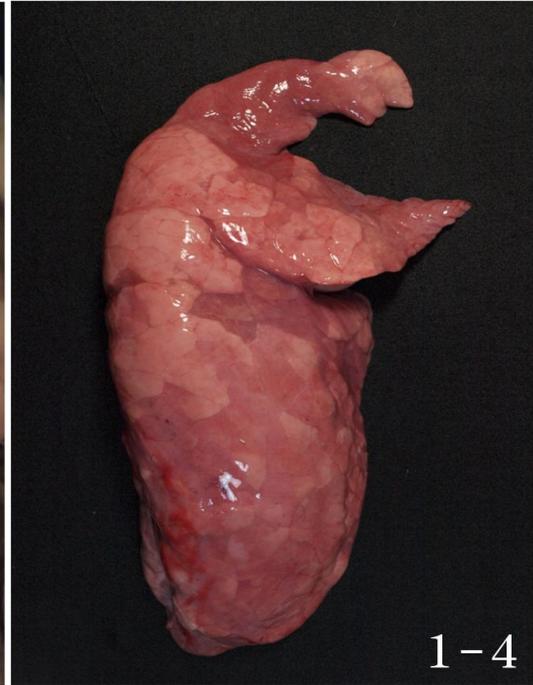
Fig. 1-10. Many multinuclear giant cells were infiltrated in lymph node. H&E. Bar=20  $\mu$ m.

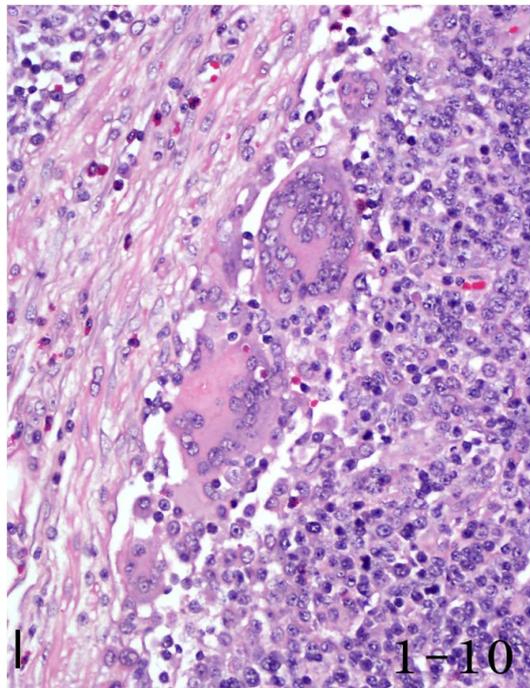
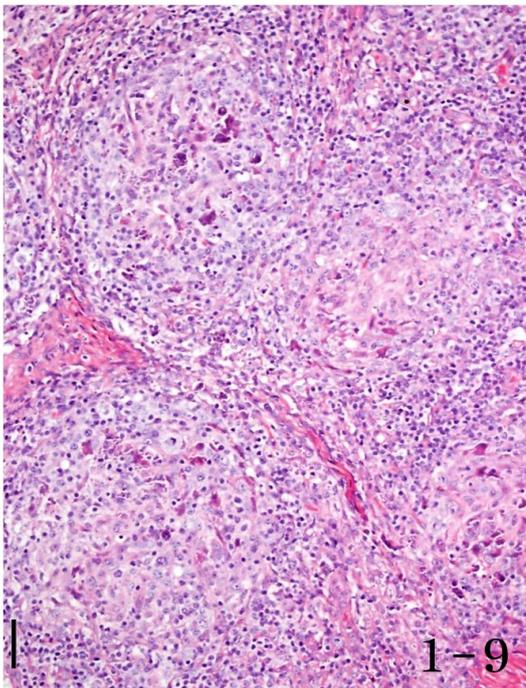
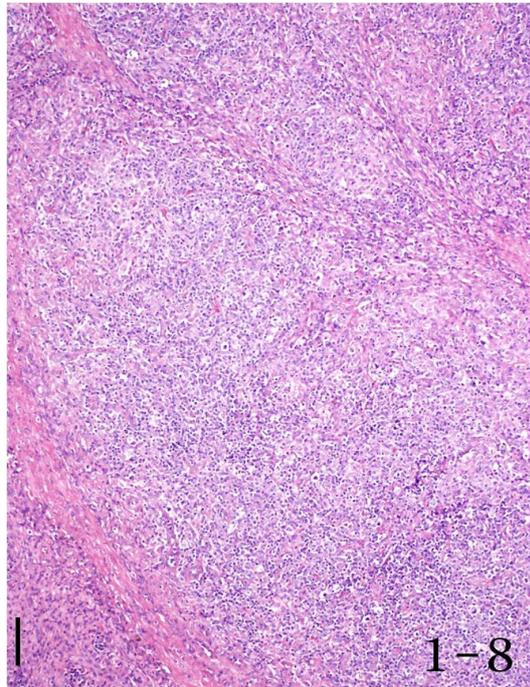
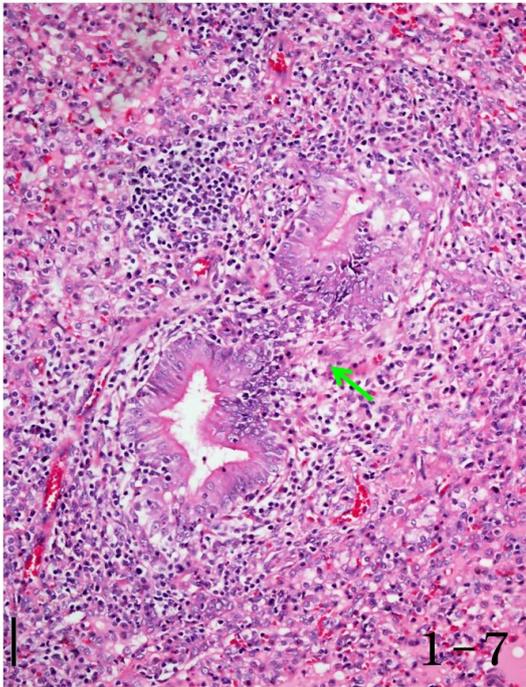
Fig. 1-11. Spherical, basophilic inclusion bodies of PCV2 were found in the cytoplasm of histiocytic cells. H&E. Bar=20  $\mu$ m.

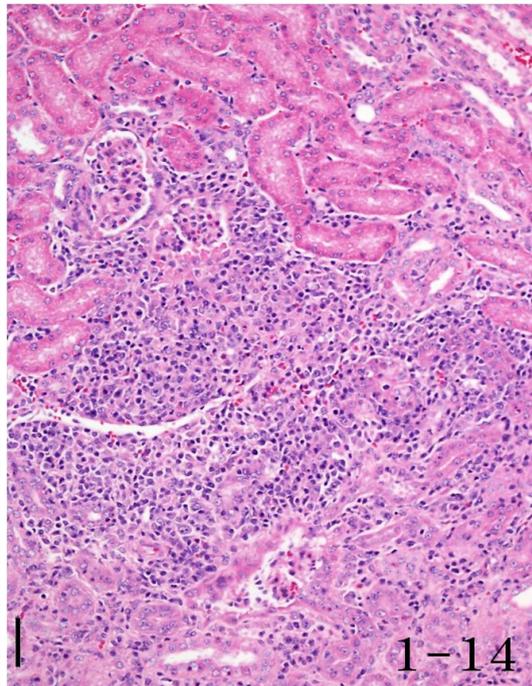
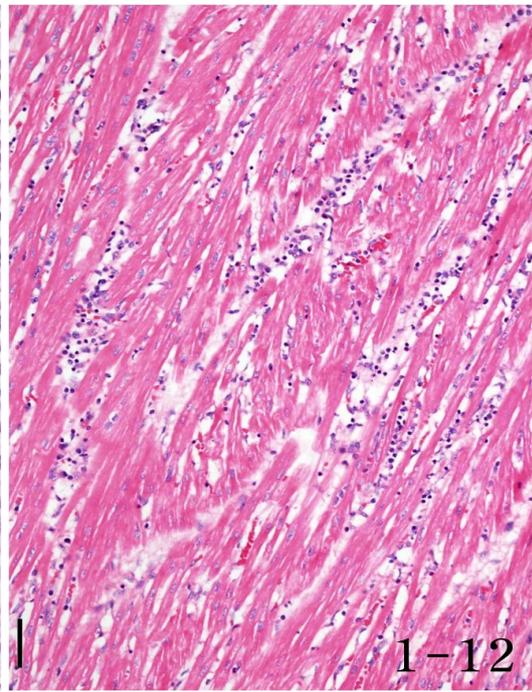
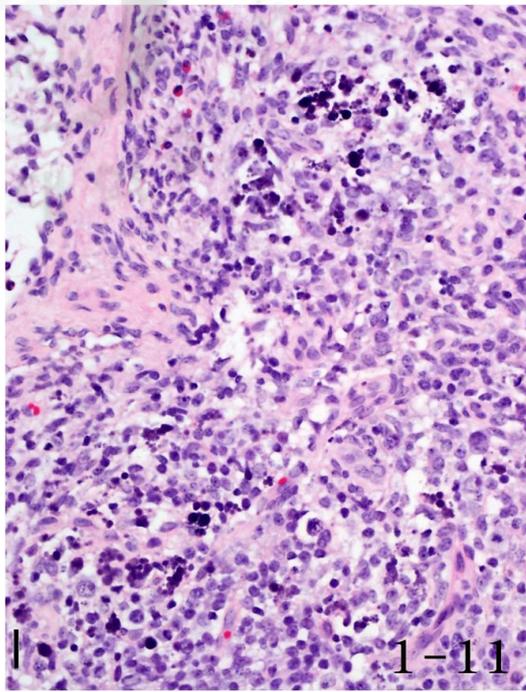
Fig. 1-12. Multifocal infiltration of lympho-histiocytic cells was observed in the myocardium. H&E. Bar=50  $\mu$ m.

Fig. 1-13. Note perivascular cuffing of lympho-histiocytic cells in the brain. H&E. Bar=50  $\mu$ m.

Fig. 1-14. Lympho-histiocytic infiltrates were present in the interstitium of renal cortex. H&E. Bar=50  $\mu$ m.







## 고 찰

2003년부터 2010년까지 제주도에서 PCVAD의 발생 상황을 조사한 결과, 총 31.2%(313두)의 돼지에서 본 질병이 확인되었다. 연도별로는 2003년 이후 발생이 증가하여 2006년에 가장 높은 발생률을 나타내었다. 그러나 2007년 이후에는 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 미국의 경우 PCVAD가 제주도 상황과 매우 유사하여 1993년부터 점차 증가하다가 2006년에 최고로 많은 발생을 나타내었다 [75]. 캐나다 또한 미국과 유사한 경향을 나타내었으며, 특히 2004~2005년 사이에 PCVAD가 폭발적으로 증가하여 캐나다 양돈 산업에 막대한 피해를 입혔다 [14]. 스페인에서는 1999~2000년 사이에 PCVAD가 최고로 발생하여 제주도 보다 좀 더 이른 시기에 유행하였음을 알 수 있었다 [93]. 일본의 경우, 2000년부터 2003년 사이 PCVAD 발생률은 23.4%로 보고되었으며 [43], 제주도의 2003년 발생률 19.2%에 비하여 다소 높게 발생하고 있었다. 제주도의 PCVAD의 발생은 북미 지역의 발생 상황과 가장 유사한 경향을 보였다. 북미 지역의 경우, PCVAD가 급증하는 시점에 과거 이 지역에 존재하고 있던 바이러스의 유전자형과는 다른 새로운 바이러스가 유입되고 있음이 보고되었다 [14, 15]. 따라서 PCV2의 유전형 분석 등 세부적인 연구를 통해 제주도 내 PCVAD의 발생 상황을 면밀히 조사해야 할 것으로 사료된다.

연도별로는 2007년 이후 PCVAD의 발생이 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 2008년부터 전국적으로 PCV2 백신이 공급되기 시작한 시점과 대체로 일치하고 있다. 따라서 제주도 내 양돈장에서 백신 접종이 증가함에 따라 질병 방어에 효과를 나타내면서 PCVAD의 발생도 자연스럽게 감소한 것으로 추정된다. 따라서 본 연구기간인 2010년 이후에도 지속적인 모니터링을 통하여 백신 접종에 의한 질병 방어 효과를 면밀히 검토, 분석해야 할 필요성이 제기되고 있는 상황이다.

제주도에서 PCVAD의 월별 발생 상황을 살펴보면, 겨울철이 지나 봄이 되는 3월 및 4월에 가장 높은 발생을 보였다. 이러한 결과는 국내 내륙 지역의 경우 5월에 가장 많이 발생한다는 Kim 등 [49]의 보고에 비하여 다소 앞서는 것이다.

또한 기존의 보고는 5월에만 집중적으로 발생하는 반면, 본 연구에서는 일부 겨울철(1~2월)을 제외하고 대체로 고르게 발생하고 있었다. 특히 제주도의 경우 3~4월에 PCVAD의 발생이 많은 경향을 보이고 있는데, 이는 겨울에서 봄으로 계절이 바뀌면서 제주도 지역의 특성상 날씨의 변화가 심하고 비가 오는 경우가 많아 양돈장에 환경 스트레스 요인이 가중되면서 본 질병에 대한 감수성이 증가하기 때문인 것으로 사료된다.

제주도에서 발생한 PCVAD를 감염 돼지의 연령에 따라 구분하여 분석한 결과, 이유자돈이 75.7%를 차지하여 가장 높았다. 본 결과는 PCVAD의 가장 일반적인 유형인 PMWS의 발생 연령대에 부합하는 것으로 제주도에서도 PCV2가 이유자돈에서 가장 크게 문제시되고 있음을 시사하는 것으로 판단된다 [34, 40].

PCVAD의 지역별 발생 상황을 보면, 제주시가 서귀포시에 비해 높은 발생을 보이고 있다. 이러한 결과는 제주도 내 양돈 농가의 지역별 분포 상황과 관련이 있을 것으로 추정할 수 있다. 즉, 제주도에서 양돈 농장이 가장 많이 밀집되어 있는 한림읍과 애월읍이 모두 제주시에 속해 있으므로, 지역별 발생의 차이가 생기는 것으로 여겨진다. 읍면 단위로 PCVAD의 발생상황을 분석한 결과 안덕면을 제외한 거의 모든 제주 지역에서 PCVAD가 발생하고 있어 지역적인 편차는 거의 없는 것으로 확인되었다.

PCVAD의 주요 임상증상으로는 위축이 가장 많았으며, 호흡곤란과 설사도 자주 관찰되었다. 이 세 가지 증상은 국내 다른 지역뿐만 아니라 유럽, 북미 및 기타 아시아 국가에서 발생하는 PCVAD의 임상증상과 일치하였다 [2, 9, 39, 91]. 특히 이유자돈에서의 위축은 PMWS의 대표적인 임상증상 중 하나로 제주도에서도 여러 가지 스트레스 요인이 증가하는 이유 시점에 PCV2가 감염되어 성장 지연을 유발하고 있음을 확인할 수 있었다.

제주도의 PCVAD 돼지에서 대표적인 육안소견은 폐장과 림프절에서 관찰되었다. 폐장에서는 퇴축부전, 고무양 경도 및 경화소를 관찰할 수 있었다. 폐장의 퇴축부전과 고무와 같은 경도는 폐장 전반에 걸쳐 미만성으로 관찰되었으며 이는 바이러스 감염에 의한 간질성 폐렴의 대표적인 육안 소견 중 하나이다 [57]. 이러한 간질성 폐렴은 육안 소견만으로는 확진이 어렵기 때문에 병리조직학적 검사가 반드시 수반되어야 한다 [57]. 폐장의 경화소는 주로 전복측엽에서 관찰

되었으며, 이는 일부 예를 제외하고 세균 감염에 의한 기관지폐렴을 의미한다 [57]. 따라서 경화소는 PCV2에 의한 원발 소견이 아니라 2차 세균 감염에 의해 발생한 병변으로, 경화소 발생의 증가는 제주도에서도 PCV2와 다른 병원체와의 중복 감염이 일반적임을 반증하는 것으로 사료된다. 다른 주요장기인 림프절은 고도로 종대되어 대부분 축진이 가능하였다. 육안적으로 림프절 병변 감별에 있어 림프절의 크기 측정이 중요하다. 림프절 종대는 하나의 림프절에서만 발생할 수도 있고 전신에 걸쳐 나타날 수도 있으므로 각각의 림프절을 종합적으로 검사하여야 한다 [90]. PCVAD 돼지는 서혜부림프절을 비롯한 전신 림프절의 종대 소견을 보인다 [91]. 본 연구에서 관찰된 전반적인 육안 소견의 발생 정도는 기존의 보고와 크게 다르지 않았다 [39, 96].

본 연구에서 PCVAD 돼지의 특징적인 병리조직학적 소견으로는 폐장의 기관지 또는 세기관지 주위에 섬유세포의 증식을 동반한 간질성 폐렴과 림프절의 조직구 침윤이 동반된 림프구 고갈이었다. 간질성 폐렴은 바이러스 폐렴의 특징이며, 특히 기관지 또는 세기관지 주위에 섬유세포의 증식은 PCV2 감염 시 나타나는 특징적인 병변으로 알려져 있다 [75]. 림프절은 림프구 고갈, 조직구/다핵거대세포 침윤 및 바이러스 봉입체의 출현이 관찰되었다. 본 연구에서 주로 관찰된 병리조직학적 병변들은 기존의 연구자들의 보고와 대체로 유사하였다 [2, 75, 96].

다른 병원체와의 중복 감염을 조사한 결과, 단독 감염(8.9%) 보다는 다른 바이러스 또는 세균과의 복합 감염이 일반적이었다. 중복 감염은 3중 감염이 가장 많았으며, 병원체 별로 바이러스는 PRRSV, 세균은 *S. spp.*와 *P. multocida*가 가장 높은 중복 감염률을 보였다. PRRSV는 기존의 여러 국가의 보고에서도 PCVAD에 가장 많이 개재하고 있는 것으로 보고된 바 있다 [43, 76, 79, 81].

파라핀 포매 조직을 이용하여 제주도에서 PCV2 감염을 역추적 조사한 결과, PCR 검사에서는 1995년 시료부터 PCV2 항원이 검출되었다. 반면, IHC에서는 1998년 시료에서만 양성 반응이 확인되었다. 본 연구를 통하여 제주도에는 국내에서 PCV2의 존재를 최초로 보고한 1998년 [18, 60]보다 앞선 시기에 이미 PCV2가 존재하고 있었음을 알 수 있었다. 또한 본 연구를 통해 장기간 보관된 파라핀 포매 조직에서도 PCV2 항원이 검출됨을 확인하였다. 특히 PCR 기법은 IHC보다 더욱 민감하게 PCV2 항원을 검출할 수 있는 기법이었다. Grierson 등 [35]은

1970년대부터 1990년대까지의 파라핀 포매 블록을 이용하여 PCV2에 대한 PCR을 실시한 결과, 1970년대 조직에서도 약 32% 정도의 PCV2 유전자를 검출한 바 있다. 이는 1990년대 조직에서의 검출율 41%에 비하여 크게 뒤떨어지지 않는 결과였다. 따라서 파라핀 포매 조직을 이용한 PCR 기법은 항체가 만을 검사할 수 있는 혈청검사법에 비하여 표적 장기 내에서 직접 대상 병원체의 유전자를 검사할 수 있을 뿐만 아니라 조직의 병변까지 확인할 수 있기 때문에 PCVAD와 같은 전염성 질병의 회고적 연구에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.



## 제 2 장

# 제주도 내 돼지에서 PCV2 유전자형 2a 및 2b의 분포

Distribution of Two Different PCV2 Genotypes  
2a and 2b in Pigs in Jeju

## I. 서 론

PCV2는 정이십면체 구조를 가진 단일가닥의 환상 DNA 바이러스로서 직경이 약 17nm 크기로 포유류 바이러스 중 가장 작은 바이러스이다 [63, 75, 92]. 본 바이러스는 총 1,767~1,768 nt로 구성되어 있으며, 6개 혹은 11개 ORF를 가지는 것으로 보고된 바 있다 [36, 67, 70]. 이 중에서 945 bases로 구성된 ORF1은 두 종류의 replicase protein (Rep 및 Rep')을 암호화하고, 702 bases로 구성된 ORF2는 구조단백질인 capsid protein을 암호화하여 바이러스의 복제와 구조단백질의 형성에 중요한 요소로 확인되었다 [71]. 특히 capsid protein은 세포의 heparin sulfate receptor와 상호작용하여 방어 항체를 유도하는 물질로 여겨지고 있어 면역학적으로 중요성이 높다 [68]. 이 외에도 ORF3은 바이러스 복제의 필수 요소는 아니지만, caspase-8 pathway와 caspase-3 pathway를 활성화하여 세포자멸사를 유도하는데 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다 [56]. 그러나 ORF3와 세포자멸사와의 관련성은 아직까지 논란의 여지가 남아 있다 [34].

Olvera 등 [78]은 PCV2의 유전자 분석을 통하여 group 1 및 group 2로 분류하였으며, PCV2 group 1은 3개의 clusters (1A~1C), PCV2 group 2는 5개의 clusters (2A~2E)로 다시 세분하였다. Gagnon 등 [31]은 PCV2의 계통발생분석 (phylogenetic analysis)을 이용하여 PCV2a 및 PCV2b로 분류하였다. 또한 북미의 여러 연구소에서는 제한절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 분석을 통하여 RFLP pattern 422 및 RFLP pattern 321로 분류하여 보고하기도 하였다 [14, 75]. 상기의 다양한 분류 기법을 통하여 PCV2를 세분한 명칭을 종합하면 Table 2-1과 같다 [75]. 최근에는 이미 알려진 두 유전자형 외에 제 3의 유전자형이 확인되었으며 [27], Segalés 등 [95]은 PCV2의 세 가지 계통발생학적 유전자형에 대한 명칭을 PCV2a, 2b 및 2c로 제안하였다.

PCV2a는 1,768 nt 크기의 염기서열을 가지고 있고 전 세계적으로 검출되는 반면, PCV2b는 염기서열의 크기가 1,767 nt로 주로 유럽 지역과 중국에서 분리되었다 [15, 62, 78, 108]. 북미지역에서는 2004년까지 PCV2a만이 분리되는 것으로

알려져 왔었으나, 2005년과 2006년 PCVAD가 급증하면서 PCV2b가 처음으로 확인되었다 [15, 31].

Table 2-1. Proposed nomenclature for the subclassification of PCV2 [75]

Subclassification of PCV2	
PCV2 group 1	PCV2 group 2
PCV2b	PCV2a
European-like strain	North American-like strain
RFLP pattern 321 (new)*	RFLP pattern 422 (old)*

\* Based on the RFLP; old versus new can be distinguished only by sequencing.

PCV2 검출 기법으로는 FA [2, 65], 전자현미경법 [2], IHC [12, 88, 98] 및 PCR [2, 54] 등이 있으며, 이 중에서 PCR은 야외 돼지의 다양한 시료에서 PCV2를 검출하는데 적합하고, 민감도와 특이성이 높아 널리 사용되고 있는 진단 기법이다 [54]. 또한 PCV2a와 PCV2b를 감별하기 위하여 바이러스 유전자 염기서열 분석(viral genomic sequencing), RFLP, 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR), nested PCR 등 다양한 실험기법이 도입되어 있다 [14, 58, 75].

최근 유전자형 분석을 통하여 PCV1 및 PCV2에 대한 다양한 유전자형이 규명되고 있으며, 세계적으로 각 유전자형의 지역적 분포 특징과 병원성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [21, 30, 42, 64]. 국내에서도 PCV2 국내 분리주의 유전학적 특성에 대한 연구 [1, 4, 10, 20] 및 PCVAD가 발병한 돼지와 발병하지 않은 돼지에서 PCV2a와 PCV2b의 감염 정도를 비교, 조사하기도 하였다 [45, 46].

섬이라는 독특한 지역적 특색을 가진 제주도에서는 아직까지 PCV2의 유전자형에 대한 체계적인 분석이 이루어지지 못한 실정이다. 따라서 본 연구는 제주도 돼지를 대상으로 PCV2a 및 PCV2b의 감염 상태를 조사하고 이를 통하여 제주도에서 PCVAD의 발생 상황과 비교 분석을 하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

2003년부터 2010년까지 총 101개 양돈장에서 제주대학교 수의과대학 병리학 교실로 병성감정 의뢰되어 PCVAD로 진단된 돼지와 함께 임상 및 병리학적으로 PCVAD의 특징적인 소견은 관찰되지 않았지만 상기 농장에서 같이 의뢰되었던 돼지를 추가하여 총 375두를 실험에 공여하였다. 검사 조직은 부검 후 냉동 보관하고 있던 림프절, 편도, 폐장 조직을 사용하였다.

### 2. PCR

#### 1) 검사 시료의 핵산 추출

PCV2a 및 PCV2b를 감별하기 위하여 PCR을 실시하였다. 유전자 검사를 위하여 냉동 보관된 림프절, 편도, 폐장의 일부를 채취하여 DNase RNase free distilled water (Invitrogen, USA)와 1:10 비율로 혼합하여 균질화 시킨 후 상층액을 이용하였다.

DNA추출은 G-spin™ DNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하였다. 시료의 상층액 200  $\mu$ l에 G-buffer 400  $\mu$ l을 잘 혼합한 다음 70℃에서 10분간 방치하고 binding buffer 400  $\mu$ l를 첨가하여 column에 800  $\mu$ l를 넣고 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. collection tube에 여과된 용액을 제거하고 500  $\mu$ l의 washing buffer을 분주하여 12,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상기 과정을 1회 반복하였다. 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 column을 넣고 100  $\mu$ l의 elution buffer를 첨가하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 실시하였다. 최종 추출물은 PCR 검사 전까지 -70℃에 냉동보관 하였다.

## 2) Oligonucleotide primer의 염기서열

PCV2의 유전자형 검출을 위한 primer는 Lyoo 등 [58]이 제시한 염기서열에 준하여 제작하였다(Cosmogenetech, Korea; Table 2-2).

Table 2-2. Oligonucleotide primer pairs to differentiate between PCV2a and PCV2b

Genotype	Primer	Sequences (5' to 3')	Position (bp)
PCV2a	2a-F	AAC AAT CCA CGG AGG AAG G	568
	2a-R	GGG ACC AAC AAA ATC TCY	
PCV2b	2b-F	CTG TTT TCG AAC GCA GTG	360
	2b-R	CTC AAA CCC CCG CTC TG	

## 3) PCR 반응조건

PCV2a 및 2b의 검출을 위해 추출한 DNA 2  $\mu$ l와 각각의 primer 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17  $\mu$ l를 PCR premix (Maxime PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하여 최종 반응용량이 20  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR 조건은 94°C에 5분간 반응한 다음 94°C, 57°C 및 72°C에 각각 30초씩 30회 반복하고 최종 72°C에서 5분간 반응하였다 [58]. PCR 증폭은 PCR Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa, Japan)을 이용하였다.

#### 4) PCR 증폭산물의 확인

반응 종료 후, 각각의 반응액 7  $\mu$ l씩을 취하여 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시한 다음 ethidium bromide 용액(0.5  $\mu$ l/ml in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator (Mupid-Scope WD, TaKaRa, Japan)로 각각의 유전자형에 대한 특이적인 밴드 유무를 확인하였으며, 증폭산물을 확인하기 위하여 1 Kb<sup>+</sup> DNA Ladder (SolGent, Korea)를 molecular size marker로 이용하였다.

### Ⅲ. 결 과

제주도 내 돼지에서 PCV2의 두 가지 유전자형인 PCV2a와 PCV2b의 감염 정도를 조사하기 위하여 PCR을 실시한 결과, PCV2a는 568 bp, PCV2b는 360 bp 위치에서 각 유전자의 특이적인 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2-1).

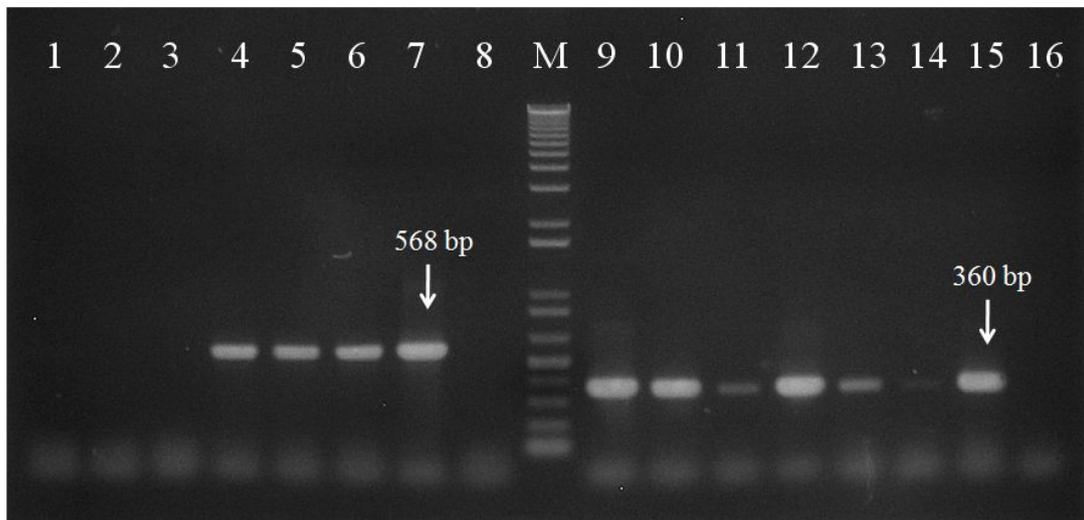


Fig. 2-1. PCR products of PCV2a and PCV2b from porcine tissue homogenates. Lane M: 1 kb DNA ladder; lane 1~6: porcine tissue samples; lane 7: PCV2a positive control; lane 8: PCV2a negative control; lane 9~14: porcine tissue samples; lane 15: PCV2b positive control; lane 16: PCV2b negative control.

2003년부터 2010년까지 의뢰된 총 375두 돼지에서 PCV2a와 PCV2b의 감염 상황을 조사한 결과, PCV2a는 165두(44.0%), PCV2b는 370두(98.7%)에서 감염이 확인되었다. 이 중 PCV2a 및 PCV2b의 혼합 감염은 160두(42.7%)에서 검출되었다.

연도별 감염 상황을 살펴본 결과, 2003년에는 PCV2a의 감염이 PCV2b보다 높게 나타났다. 이후 PCV2a의 감염률이 2008년까지 감소를 지속하다가 2009년 소폭 증가하였으나 2010년에는 다시 감소하였다. 대체적으로 2004년 이후에는 감소하는 경향을 나타내고 있었다. 반면, PCV2b는 2003년 이후 증가하여 2005년부터는 의뢰된 시료에서 100%의 감염율이 지속되었다. 2006년에서 2008년 사이에는 두 유전자형의 감염률이 가장 많은 차이를 보이고 있었다. 가장 최근인 2010년의 경우 2007년 상황과 매우 유사하였다(Table 2-3, Fig. 2-2).

Table 2-3. Annual prevalence of PCV2a and 2b in field porcine tissues

Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
No. of cases	12	28	51	70	71	51	68	24	375
PCV2a (%)	12 (100)	16 (57)	37 (72.5)	22 (31.4)	24 (33.8)	14 (27.5)	32 (47)	8 (33.3)	165 (44.0)
PCV2b (%)	9 (75)	26 (92.9)	51 (100)	70 (100)	71 (100)	51 (100)	68 (100)	24 (100)	370 (98.7)
PCV2a & PCV2b (%)	9 (75)	14 (50)	37 (72.5)	22 (31.4)	24 (33.8)	14 (27.5)	32 (47)	8 (33.3)	160 (42.7)

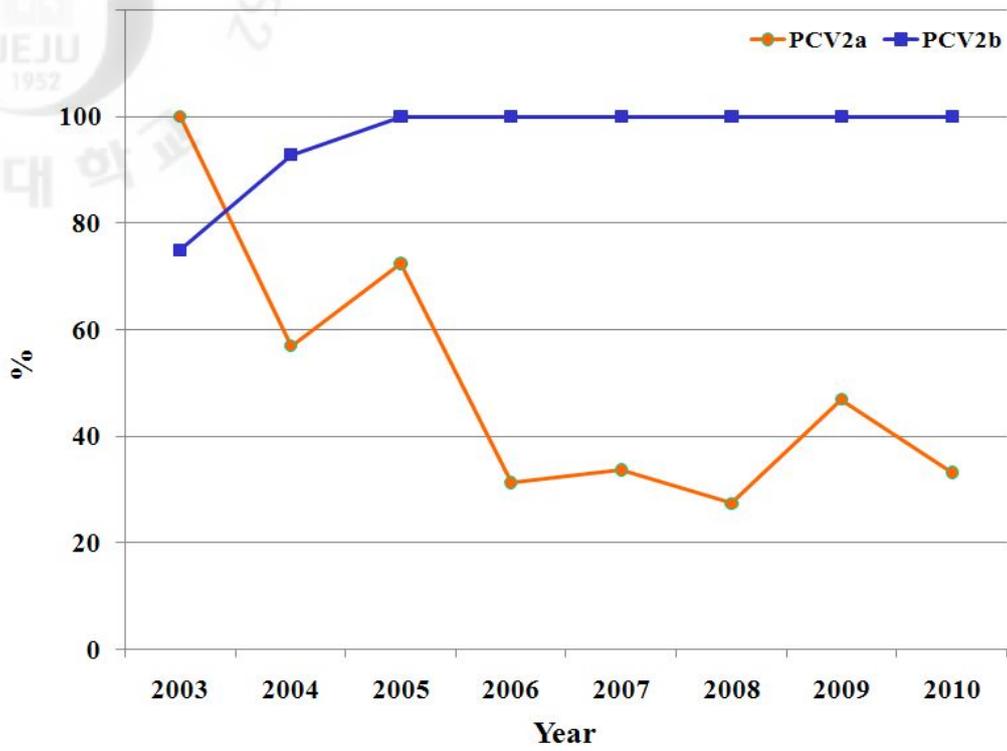


Fig. 2-2. Diagram for annual prevalence of PCV2a and 2b in Jeju.

2006~2007년에 의뢰된 총 4두의 유산태자에서 PCV2a 및 PCV2b의 감염을 살펴본 결과, 모든 유산태자에서 PCV2b가 검출되었으며, 이 중 1두가 PCV2a와 혼합 감염되어 있었다(Table 2-4).

Table 2-4. Detection of PCV2a and 2b in porcine aborted fetuses

Agent	PCV2a	PCV2b	PCV2a & PCV2b
No. of pigs	1	4	1

2003년부터 2010년까지 의뢰된 총 25두의 포유자돈에서 두 유전자형의 감염 상황을 살펴본 결과, PCV2b는 24두, PCV2a는 9두가 감염되어 PCV2b의 감염이 높게 나타났다(Table 2-5).

Table 2-5. Annual prevalence of PCV2a and 2b in suckling pigs

Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
No. of cases	0	2	9	2	3	1	3	5	25
PCV2a	0	2	4	0	2	0	1	0	9
PCV2b	0	1	9	2	3	1	3	5	24
PCV2a & PCV2b	0	1	4	0	2	0	1	0	8

2003년부터 2010년까지 의뢰된 총 277두의 이유자돈에서는 PCV2b가 273두, PCV2a가 121두에 감염되어 PCV2b의 감염이 높게 나타났다. 두 유전자형이 모두 검출된 돼지는 117두로 확인되었다(Table 2-6).

Table 2-6. Annual prevalence of PCV2a and 2b in weaned pigs

Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
No. of cases	11	21	29	64	58	31	49	14	277
PCV2a	11	10	23	19	20	10	23	5	121
PCV2b	8	20	29	64	58	31	49	14	273
PCV2a & PCV2b	8	9	23	19	20	10	23	5	117

동일한 기간에 의뢰되었던 총 69두의 육성·비육돈에서는 PCV2b가 69두, PCV2a가 39두에 감염되어 이유자돈과 유사한 상황이었다. 그러나 육성·비육돈 구간에서는 과반수이상인 56.5%가 PCV2a에 감염되어 있는 것으로 나타나 포유자돈(36.0%)이나 이유자돈(43.7%)에 비해 상대적으로 높은 감염률을 보였다 (Table 2-7).

Table 2-7. Annual prevalence of PCV2a and 2b in growing and finisher pigs

Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
No. of cases	1	5	13	3	7	19	16	5	69
PCV2a	1	4	10	3	6	4	8	3	39
PCV2b	1	5	13	3	7	19	16	5	69
PCV2a & PCV2b	1	4	10	3	6	4	8	3	39

## IV. 고 찰

PCV2는 계통발생분석을 통하여 PCV2a 및 PCV2b로 분류되었으며, 최근 Dupont 등 [27]에 의해 제 3의 유전자형인 PCV2c도 알려지게 되었다. 이와 같이 PCV2의 유전자형 분석이 활발히 이루어지고 있는 가운데 분류된 유전자형에 대한 병원성 비교 등의 연구 또한 다양하게 전개되고 있다 [46]. 대부분의 연구에서는 PCV2a에 비하여 PCV2b가 더욱 강한 병원성을 가지고 있는 것으로 보고되었지만 [14, 46], 일부에서는 다른 연구 결과를 발표하기도 하였다 [77]. 또한 Hesse 등 [42]은 야외에서 검출된 PCV2에 대한 유전자 분석결과 PCV2a의 ORF1 부분의 염기서열과 PCV2b의 ORF2 부위의 염기서열이 혼재된 바이러스를 검출하였으며, 이는 PCV2a와 PCV2b가 재조합 될 수 있는 증거로 보고한 바 있다.

PCV2a와 PCV2b 사이에는 95% 이상의 유전적 상동성이 있는 것으로 알려져 있다 [78]. 따라서 두 유전자형의 감별을 위해서는 고감도의 프라이머를 제작해야 하기 때문에 그 대상 부위를 선정하기가 쉽지 않은 상황이다 [58]. 본 연구에서 사용한 프라이머는 두 가지 유전자형 중에서 가장 상동성이 낮은 ORF2 부위가 포함되도록 제작되어 비교적 용이하게 유전자형을 감별할 수 있었다 [58].

2003년부터 2010년까지 제주도 내 총 101개 농장의 돼지를 대상으로 PCV2a 및 PCV2b의 감염 상황을 조사하였다. 검사 결과 2003년에는 PCV2a는 PCV2b보다 많이 검출되었으나 그 이후에는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 반면 PCV2b는 2003년 이후 점차 증가하여 PCV2a에 비하여 월등히 검출률이 높아 거의 모든 야외 시료에서 100% 확인되었다. 이러한 연도별 변화 추이는 Kim 등 [45]이 2000년부터 2008년까지 국내 돼지를 대상으로 PCV2 유전자형을 분석한 결과와 대체로 유사하였다. 단지 두 유전자형의 증감이 교차하는 해는 본 연구가 2003~2004년 사이인 반면 Kim 등 [45]의 연구에서는 2001~2002년 사이로 나타나 제주도 지역이 2년 정도 늦은 것으로 확인되었다. 스페인의 경우, 2000~2001년 사이에 두 유전자형의 증감이 교차하기 시작하였으며, 이 시기는 PCVAD 진단이 최고조로 증가하는 시점과 일치하였다 [21]. 캐나다에서는 2005~2006년 사이에

검사한 총 83두의 돼지 중 66두에서 PCV2b가 검출되어 2005년부터 이미 2b 유전자형이 보다 많이 감염되기 시작하였다 [31]. 캐나다에서도 스페인의 경우와 유사하게 2004년부터 PCVAD에 의한 폐사율이 급증하였다. 따라서 PCV2b 유전자형의 출현과 전 세계적인 PCVAD의 발생 증가와는 밀접한 상관성이 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서 연도별 PCVAD 발생 정도와 두 유전자형의 감염 정도를 비교한 결과, 제주도에서도 다른 국가와 유사하게 두 유전자형의 감염 빈도가 역전된 이후인 2006~2007년 사이 PCVAD의 발생률이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 특히 북미 지역의 PCVAD 발생 상황과 흡사하였다 [14, 75].

돼지의 연령별로 PCV2 유전자형의 감염 정도를 비교한 결과, 모든 연령군에서 PCV2b가 우세하게 검출되었다. 총 4두의 유산 시료를 검사한 결과, PCV2b 단독 감염이 3두로 PCV2a에 비해 높은 감염률을 나타내었다. 그러나 이는 소수의 한정된 시료에 대한 결과인 만큼 유산의 발생과 바이러스 유전자형과의 상관관계는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. PCVAD의 가장 일반적인 유형으로 알려진 PMWS는 주로 이유자돈에서 문제시되는 전신적인 질병이며, 발병률과 폐사율 또한 비교적 높다 [34]. 반면, 육성·비육돈에서는 일반적으로 호흡기에 국한된 병변을 형성하기 때문에 폐사율이 낮은 편이다 [38, 41]. 본 연구에서 PCV2b 감염은 이유자돈 및 육성·비육돈 모두에서 PCV2a에 비하여 높은 감염률을 보이고 있었다. 따라서 돈군을 구성하고 있는 돼지의 연령대별로 PCV2a와 2b의 감염률은 특별한 차이를 나타내지 않았다.



### 제 3 장

## PCVAD 돼지에서 괴사성 림프절염에 대한 병리학적 연구

Pathologic Studies for Necrotizing Lymphadenitis  
in PCVAD Pigs

## I. 서 론

림프절은 조직학적으로 치밀하고 피막에 둘러싸인 면역기관으로 림프여포와 속겉질로 구성된 피질과 여과 기능을 하는 수질로 구분된다 [11]. 림프절의 영역 별로 림프여포는 주로 B 림프구(B lymphocyte), 속겉질은 T 림프구(T lymphocyte)로 구성되며, 수질부에는 탐식능이 있는 큰포식세포가 존재한다 [11, 90]. 그리고 림프는 여러 조직에 있는 항원을 림프절로 운반하며, 림프절에서 림프구와 큰포식세포에 의해 농축된다. 체내에서 순환하는 림프구는 특수화된 소정맥을 통해 림프절로 들어가며 항원과 접촉하게 된다. 따라서 림프절은 항원의 검출과 전달을 증진시키기 위해 림프 유래 항원을 혈액 유래 림프구에 제시하는 역할을 하는 중요한 장기이다 [90]. 조직학적으로 돼지의 림프절은 다른 포유동물과는 반대로 피질부분이 림프절의 중심부위에 있고 수질부분이 가장자리에 위치하는 것이 특징적이다 [11]. 이러한 구조는 림프구 재순환의 기능적 측면에서 다른 동물에 비해 보다 효율적이며, 피질 및 속겉질의 세포 구성은 다른 동물과 크게 다르지 않다 [11].

이러한 림프절의 면역학적 방어 기능에도 불구하고 몇몇 바이러스 또는 세균과 같은 병원체의 감염은 오히려 숙주의 면역력을 억제시키는 역할을 한다. 돼지에서는 *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*와 같은 세균과 CSFV, PRRSV, 오제스키병 바이러스(Aujeszky's disease virus, ADV) 등의 바이러스 감염으로 면역억제가 발생하고 2차적인 다른 병원체의 감염이 용이해지는 것으로 알려져 있다 [86]. 최근 PCVAD의 원인체인 PCV2 또한 돼지에서 면역억제를 유발하는 병원체로 보고되었다 [16, 22, 23, 94].

PCVAD 돼지의 여러 조직 병변 중에서도 림프절 병변은 본 질병의 진단에 있어 가장 중요하다. 주요 소견은 림프여포의 소실을 동반한 림프구 고갈, 조직구/다핵거대세포의 침윤 및 특이적인 PCV2 특이 봉입체의 출현이다 [88, 96]. 이러한 림프절의 형태학적 변화로 인하여 면역과 방어 등의 기능적인 장애가 초래되고 이로 인해 다른 병원체의 감염이 빈번하게 이루어진다. 대부분 PCVAD 돼지에서

PCV2 단독 감염에 비하여 기타 병원체와의 중복 감염이 월등히 많은 것은 PCV2가 돼지의 면역체계를 억제하는 병원체로 작용하기 때문으로 이해된다 [88].

최근에는 PCVAD 돼지에서 기존에 알려진 림프절 병변과는 다른 괴사성 림프절염이 확인되었다 [84, 96]. 이 병변은 림프절 실질 내 다양한 범위의 응고 괴사(coagulation necrosis)가 특징적이다 [96]. 하지만 PCV2와 병변과의 상관관계 및 발생기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다 [96]. 일부 연구에 따르면 괴사성 림프절염은 PCV2에 의한 세포자멸사 [47] 또는 혈전(thrombosis)이 동반된 혈관 손상 [32]과 관련이 있을 것으로 추정되고 있다.

본 연구는 PCVAD로 진단된 돼지에서 괴사성 림프절염의 발생빈도를 조사하고 병변에 대한 병리학적 연구를 수행하여 발병기전을 분석하고자 하였다. 또한 PCV2 감염과 괴사성 림프절염 발생의 연관성을 찾고, 괴사와 염증이 동반된 림프절과 정상 림프절을 세포 수준에서 비교함으로써 숙주의 면역에 미치는 영향을 알아보려고 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

#### 1) 괴사성 림프절염 돼지의 선정

2003년부터 2010년까지 제주대학교 수의과대학 병리학교실에서 병리학적 검사를 통해 PCVAD로 진단된 제주도 소재 101개 양돈 농장의 총 313두 돼지를 실험에 공여하였다. 이 중에서 병리조직학적 검사를 통해 괴사성 림프절염이 있는 돼지를 선발하였다.

#### 2) 시험군의 구성

괴사성 림프절염이 있는 돼지의 병리학적 특징을 비교하기 위하여 총 3개의 시험군을 설정하였다. 시험군은 음성 대조로 정상 돼지군(G1, 5두), PCVAD로 진단되었으나 괴사성 림프절염이 관찰되지 않은 돼지군(G2, 5두) 및 괴사성 림프절염을 동반한 PCVAD 돼지군(G3, 15두)으로 구성하였다(Table 3-1). 괴사성 림프절염이 확인된 20두의 돼지 중 5두는 심한 사후변화가 동반되어 있고 구성 세포의 형태학적 구분이 불분명하여 시험군에서 제외하였다.

Table 3-1. Design for experimental groups

Group	Histopathologic character of pigs	No. of pigs
G1	Normal pigs	5
G2	PCVAD pigs without necrotizing lymphadenitis	5
G3	PCVAD pigs with necrotizing lymphadenitis	15

## 2. 병리학적 검사

의뢰된 돼지는 통상적인 절차에 따라 부검을 수행하여 육안적 병변을 면밀하게 관찰하고 림프절을 채취하여 10% 중성완충포름알린 용액에 고정하였다. 고정이 완료된 림프절은 일반적인 조직처리 방법에 따라 파라핀 포매하여 3~4  $\mu\text{m}$  두께로 절편을 제작한 다음 H&E 염색을 실시하였다. 염색이 끝난 절편은 봉입 후, 광학 현미경(Olympus BX51, Japan)을 이용하여 검경하였다.

괴사성 림프절염의 병변에 대한 평가는 Krakowka 등 [51]의 보고를 참고하여 병변이 없는 등급(no lesion)에서부터 심한 정도(severe)까지 총 5단계로 나누어 평가하였다(Table 3-2).

Table 3-2. Histopathologic scoring system of necrotizing lymphadenitis in pigs

Score	-	+	++	+++	++++
Severity	No lesion	Minimal	Mild	Moderate	Severe

괴사성 림프절염 병변 내 기타 병원체의 존재 여부를 확인하기 위하여 추가적인 조직 절편을 제작하였다. Gram 염색(Sigma, USA) 및 periodic acid Schiff (PAS) 염색(Sigma, USA)을 수행하여 림프절 내 세균 또는 진균의 존재 여부를 검사하였다.

### 3. PCR

괴사성 림프절염 병변 내 ADV의 감염 여부를 확인하기 위해 PCR을 실시하였다. DNA추출은 G-spin™ DNA extraction kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하였다. ADV의 검출을 위한 primer는 소 등 [5]이 제시한 염기서열에 준하여 제작하였다(Cosmogenetech, Korea; Table 3-3). PCR 반응은 추출한 DNA 2  $\mu$ l와 각각의 primer 0.5  $\mu$ l (20 pmol) 및 DNase RNase free distilled water 17  $\mu$ l를 PCR premix (Maxime PCR premix, iNtRON biotechnology, Korea)에 첨가하고 94°C에 5분간 반응한 다음 94°C, 57°C 및 72°C에 각각 30초씩 30회 반복하고 최종 72°C에서 5분간 반응하였다 [5]. 반응 종료 후, 각각의 반응액 7  $\mu$ l씩을 취하여 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 실시한 다음 ethidium bromide 용액(0.5  $\mu$ l/ml in DW)으로 염색하였다. UV transilluminator (Mupid-Scope WD, TaKaRa, Japan)로 ADV에 대한 특이적인 밴드 유무를 확인하였다.

Table 3-3. Oligonucleotide primer pairs for the detection of ADV

Agent	Primer	Sequences(5' to 3')	Position (bp)
ADV	ADS/A	CGT ACC GCG CCC ACG TGG CC	263
	ADS/B	GTC GGT GAG GAT GTT CAC GC	

#### 4. IHC

괴사성 림프절염 병변에서 PCV2 및 PRRSV 항원의 분포와 림프절을 구성하는 세포수의 정량적 변화상을 확인하기 위하여 EnVision™ peroxidase-conjugated polymer reagent (Dako, Denmark)를 이용하여 IHC를 수행하였다. 각 조직은 4~5  $\mu\text{m}$  두께로 박절하여 silane coating micro slides glass (MUTO PURE CHEMICALS, Japan)에 부착하였다. 조직 절편이 완전히 부착된 다음, 일반적인 조직처리 방법으로 탈파라핀 및 함수과정을 거쳐 자연적으로 존재하는 peroxidase를 제거하기 위하여 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 10분간 반응하였으며, 항원성 부활은 각 항체의 처리 조건에 준하여 수행하였다. 바이러스를 확인하기 위한 1차 항체로는 rabbit anti-PCV2 antibody와 mouse anti-PRRSV (SDOW17) antibody를 사용하였다(Table 3-4). 림프절 내 고내피세정맥(high endothelial venule, HEV)의 변화상을 확인하기 위한 1차 항체로는 rabbit anti-Human von Willebrand factor (vWF) antibody를 적용하였으며, 세포의 분포 및 변화상을 확인하기 위한 1차 항체로는 rabbit anti-Human CD3 antibody, mouse anti-Human CD79 $\alpha$  antibody, rabbit anti-Human lysozyme antibody를 사용하였다(Table 3-5). 모든 항체는 antibody diluent solution (DAKO, USA)에 적정 비율로 희석한 다음 절편에 적하하여 37°C에서 1시간 반응하였다. 그 후 EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (EVN) reagent (DAKO, Denmark)를 적하하여 37°C에서 40분간 반응하였다. 각 단계별로 반응 후에는 PBS로 10분씩 2회에 걸쳐 수세하였다. 모든 반응이 끝난 절편은 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB; DAKO, Denmark)로 발색 시킨 후, 3차 증류수에서 반응을 종결하였다. 대조염색은 Mayer's hematoxylin (Sigma, USA)으로 핵염색 하였으며, 탈수와 투명과정을 거쳐 봉입하였다. 염색이 끝난 조직 슬라이드는 광학현미경(Olympus BX51, Japan)으로 양성 대조군 및 음성 대조군과 비교하여 바이러스 항원의 존재 여부와 분포 정도, 고내피세정맥의 변화상 및 림프절 내 세포수의 정량적 변화상을 관찰하였다.

Table 3-4. Primary antibodies for the detection of PCV2 and PRRSV

Antibody	Target virus	Source	Dilution	Antigen retrieval
Rabbit anti-PCV2	PCV2	Iowa State University, USA	1:1,000	Protease X IV0.05%; 37°C, 20 min
Mouse anti-PRRSV (SDOW17)	PRRSV	South Dakota State University, USA	1:5,000	Protease X IV0.05%; 37°C, 20 min

Table 3-5. Primary antibodies to evaluate the cellular populations in porcine lymph node

Antibody	Target cell	Source	Dilution	Antigen retrieval
Rabbit anti-vWF	Endothelial cell	A0082, Dako	1:400	Proteinase K 0.002%; 37°C, 30 min
Rabbit anti-CD3	T lymphocyte	A0452, Dako	1:50	10nmol/L citrate buffer, pH6.0; 95~99°C, 1 h
Mouse anti-CD79a	B lymphocyte	M7051, Dako	1:50	1mmol/L EDTA, pH9.0; 95~99°C, 1 h
Rabbit anti-lysozyme	Macrophage	A0099, Dako	1:200	Proteinase K 0.002%; 37°C, 30 min

조직 내 바이러스 항원을 검출하기 위한 IHC 결과는 Galindo-Cardiel 등 [32]이 제시한 방법을 기초로 표지된 항원의 양과 분포에 따라 총 5단계로 구분하여 아래와 같이 평가하였다(Table 3-6).

Table 3-6. IHC scoring system for viral antigens in lymph node sections

Score	-	+	++	+++	++++
IHC labelling	No labelling	Focal (<25%)*	Multifocal (25%~50%)	Multifocal to diffuse (>50%)	Diffuse labelling

\* Labelling area of the tissue section.

또한 vWF의 발현에 따른 고내피세정맥의 변화상은 림프절 내 고내피세정맥의 증생 정도를 고려하여 수적 변화가 거의 없고 혈관과 림프관의 기저막(basement membrane)에만 부분적으로 발색을 보이는 미약한 정도(minimal)부터 기저막, 내피세포 및 내강을 차지하고 있는 물질에 강한 발색을 보이는 심한 정도(severe)까지 총 4단계로 나누어 구분하였다 [32].

림프절 내 세포의 분포 및 수적 변화는 고배율(400배) 시야에서 무작위로 5개 부위를 선택하여 세포 표지자 양성인 세포의 수를 세고, 평균값을 계산하여 시험군 별로 비교하였다.

## 5. 통계처리

IHC를 통하여 얻어진 각 시험군별 T, B림프구 및 큰포식세포의 수적 변화는 One-way ANOVA test로 그 유의성을 평가하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 정규성을 가정하고, Levene test로 등분산성을 검정한 후 등분산인 경우 모수적 방법인 분산분석으로 집단 간 평균의 차이를 검정하였다. 사후분석으로 등분산이나 표본수(N수)가 다를 경우 Scheffe를 사용하였으며, 등분산을 가정하지 않을 경우에는 Dunnett T3를 사용하였다. 통계 프로그램은 SPSS ver. 10.1K (SPSS Inc., Chicago, USA)를 이용하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 괴사성 림프절염 발생 상황

병리조직학적 검사를 통하여 PCVAD로 진단된 총 313두의 돼지 중 괴사성 림프절염이 동반된 돼지는 20두(6.4%)로 확인되었다. 연도별로는 2005년 2두(6.1%), 2006년 3두(4.5%), 2007년 5두(7.7%), 2008년 5두(12.8%), 2009년 4두(8.0%) 및 2010년 1두(5.3%)로 나타나 2005년 이후 지속적으로 발생하고 있었다 (Table 3-7).

Table 3-7. Annual prevalence of necrotizing lymphadenitis in PCVAD pigs

Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
No. of PCVAD pigs	15	25	33	67	65	39	50	19	313
No. of pigs with NL*	0	0	2	3	5	5	4	1	20
%	0	0	6.1	4.5	7.7	12.8	8.0	5.3	6.4

\* NL : necrotizing lymphadenitis.

#### 2. 육안적 검사

육안적으로 괴사성 림프절염이 있는 림프절은 정상에 비해 5배 이상 현저하게 종대되어 있고 단단하며, 국소 혹은 다발성으로 발적되어 있었다(Fig. 3-1~3). 단면 절개 시 비교적 경계가 명료한 선홍색 혹은 자적색조의 테두리가 있는 반상 병소가 실질 내에 매몰되어 있었다(Fig. 3-2).

### 3. 병리조직학적 검사

병리조직학적으로 괴사성 림프절염은 림프절 실질 내 비교적 경계가 명료한 응고괴사 소견을 나타내었다(Fig. 3-4). 병변의 분포는 개체 또는 림프절에 따라 국소성부터 미만성까지 다양하게 관찰되었다. 괴사 부위는 대개 림프여포를 포함한 피질부위에서 관찰되었으며 병변이 광범위한 경우에는 피질과 수질의 경계가 소실되기도 하였다. 괴사 부위 내에는 농축되거나 붕괴되는 핵을 가진 괴사세포들과 괴사세포의 파편 및 큰포식세포, 호중구, 소수의 림프구가 혼재된 염증세포 무리가 관찰되었다(Fig. 3-5). 일부 큰포식세포 및 다핵거대세포의 세포질 내에는 호염성의 특이적인 PCV2 봉입체가 관찰되기도 하였다(Fig. 3-6). 또한 괴사 부위 내 혈관은 고도로 확장되고 내강에는 적혈구 및 호산성의 무구조한 섬유소성 물질이 가득 들어 있었으며, 국소적으로 파열되어 주변 조직으로 출혈소견을 나타내었다(Fig. 3-7). 일부 변성된 혈관 내에는 적혈구, 백혈구, 섬유소가 덩어리를 형성하여 내강이 폐쇄된 혈전이 관찰되기도 하였다(Fig. 3-8). 괴사 부위 주변의 피질부위는 정상적인 림프절에 비하여 세포 밀도가 감소하여 있었으며, 피질의 림프여포는 소실되거나 일부 여포를 구성하는 소수의 세포들로 흔적만 남아있었다. 또한 염증이 심한 경우에는 피질 전반에 걸쳐 큰포식세포가 침윤하여 림프여포와 속결질의 구분이 모호하였다.

괴사성 림프절염이 관찰된 15두(G3군)에 대하여 병변 정도를 평가한 결과, 정도는 7두, 중등도 및 심한 정도는 각각 4두로 확인되었다.

vWF 항체를 이용하여 면역염색을 실시한 결과, G1군에서는 정상적으로 존재하는 피질 내 입방형 세포로 이루어진 고내피세정맥과 모세혈관의 기저막 및 일부 세포질에서 양성 반응을 보인 정도 이하의 반응을 나타내었다. 반면, G2군에서는 고내피세정맥의 부분적인 증식과 함께 크기가 증가된 내피세포의 세포질 내에서 반응이 증가된 것을 확인하여 전반적으로 G1군에 비해 반응 정도가 높았다. G3군은 현저하게 증식된 고내피세정맥 및 확장된 혈관의 내피세포의 세포질에 강한 양성반응을 보였으며, 내강의 물질에도 강한 양성반응을 보여 시험군 중에서 가장 강한 양성반응을 나타내었다(Table 3-8, Fig. 3-9).

#### 4. 괴사성 림프절염에서 병원체의 검출

괴사성 림프절염 병변에서 세균 또는 진균의 감염여부를 확인하기 위하여 각 림프절에 대한 Gram 및 PAS 염색을 실시한 결과 모두 음성으로 확인되었다.

괴사성 림프절염 병변부에서 ADV 감염 여부를 검사한 결과 모든 돼지에서 음성으로 확인되었다.

PCV2와 PRRSV의 존재여부를 알아보기 위하여 괴사성 림프절 시료에 IHC 기법을 적용한 결과, PCV2는 15두의 돼지 모두에 항원이 존재하고 있었으며, PRRSV는 2두에서만 항원이 검출되었다.

시험군 별로 PCV2 항원의 분포 정도를 조사한 결과, G1군은 모두 음성이었으며, G2군은 일부 세포에 국한된 미약한 정도부터 중등도까지 다양하게 관찰되었고 양성 반응은 주로 림프절에 침윤된 큰포식세포의 세포질에서 확인되었다. G3군의 경우 G2군과 유사하게 림프절에 침윤된 큰포식세포의 세포질에서 대부분의 항원이 검출되었으며, 때로 다핵거대세포의 세포질에서도 양성 반응을 나타내기도 하였다. 전반적인 림프절 내 PCV2 항원의 발현 정도는 G2군에 비해 G3군에서 강하게 나타났다. 따라서 G3군에서 PCV2 감염이 더욱 심하고 광범위한 것으로 입증되었다. 특히 괴사부위에 침윤된 염증세포에서 강한 양성반응을 보였으며, 심하게 확장되고 변성된 혈관의 일부 내피에서도 미약한 양성반응을 확인할 수 있었다 (Table 3-8, Fig. 3-10 and 11).

시험군 중 G2군 및 G3군에서 각각 2두씩 총 4두의 돼지 림프절에서 PRRSV 항원이 검출되었다. 검출된 항원은 모두 국소적으로만 존재하여 경도 이하의 분포를 보였다(Table 3-8).

Table 3-8. Results of histopathologic scoring, amounts of PCV2 and PRRSV nucleic acid, and vWF labeling in lymph nodes of experimental pigs

Group	Case No.	Necrosis	PCV2	PRRSV	vWF
G1	1	-	-	-	+
	2	-	-	-	+
	3	-	-	-	++
	4	-	-	-	++
	5	-	-	-	++
G2	1	-	++	++	++
	2	-	+++	-	+++
	3	-	+++	-	++
	4	-	++	+	+++
	5	-	+	-	+++
G3	1	++	++	-	++
	2	++	++++	-	+++
	3	+++	++++	-	++++
	4	++	+++	-	+++
	5	++++	++++	-	++++
	6	+++	++++	-	++++
	7	++++	++++	-	++++
	8	++	++++	++	+++
	9	+++	++++	-	++++
	10	++++	++++	-	++++
	11	++++	++++	-	++++
	12	+++	++++	-	++++
	13	++	+++	-	+
	14	++	++++	++	+++
	15	++	++++	-	+++

## 5. 림프절 구성 주요 세포의 분포 및 수적 변화

각 시험군별 CD3, CD79a 및 lysozyme 항체에 대한 양성세포의 변화상을 비교한 결과, T 림프구는 G1군에 비해 G2군과 G3군 모두에서 유의성 있게 감소하였다( $P<0.01$ ). 감소 정도는 G3군이 G2군에 비하여 더욱 현저하였다. B 림프구 또한 G1군에 비해 G2군과 G3군 모두 유의성 있게 감소하였으며( $P<0.01$ ), G3군에서 다른 군에 비해 가장 심하게 월등히 적게 분포하고 있었다. 이러한 세포의 감소 정도는 B 림프구가 T 림프구에 비하여 현격하게 심하였다. 그러나 큰포식세포는 G1군에 비해 G2군( $P<0.01$ )과 G3군( $P<0.05$ ) 모두 유의성 있게 증가하였으며, 이 중 G2군의 증가가 가장 높았다(Table 3-9, Fig. 3-12~14).

Table 3-9. Mean number of immuno-positive cells in porcine lymph nodes of each group

Antibody	Target cell	Group (Mean $\pm$ SD)		
		G1	G2	G3
CD3	T lymphocyte	677.2 $\pm$ 62.6	386.1 $\pm$ 61.8**	208.3 $\pm$ 98.2**
CD79a	B lymphocyte	315.3 $\pm$ 98.0	60.2 $\pm$ 27.3**	11.2 $\pm$ 16.3**
Lysozyme	Macrophage	33.2 $\pm$ 8.4	95.5 $\pm$ 22.2**	65.0 $\pm$ 22.4*

\*  $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

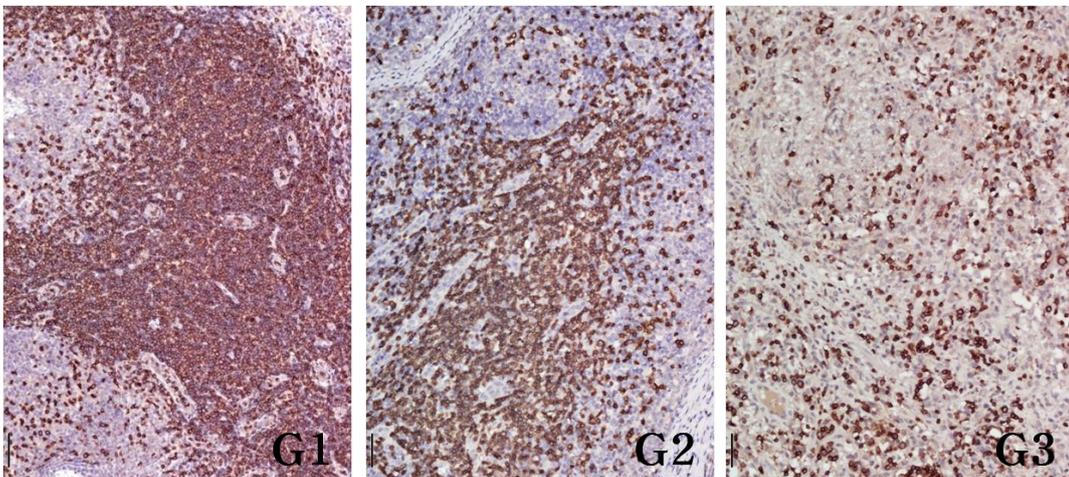
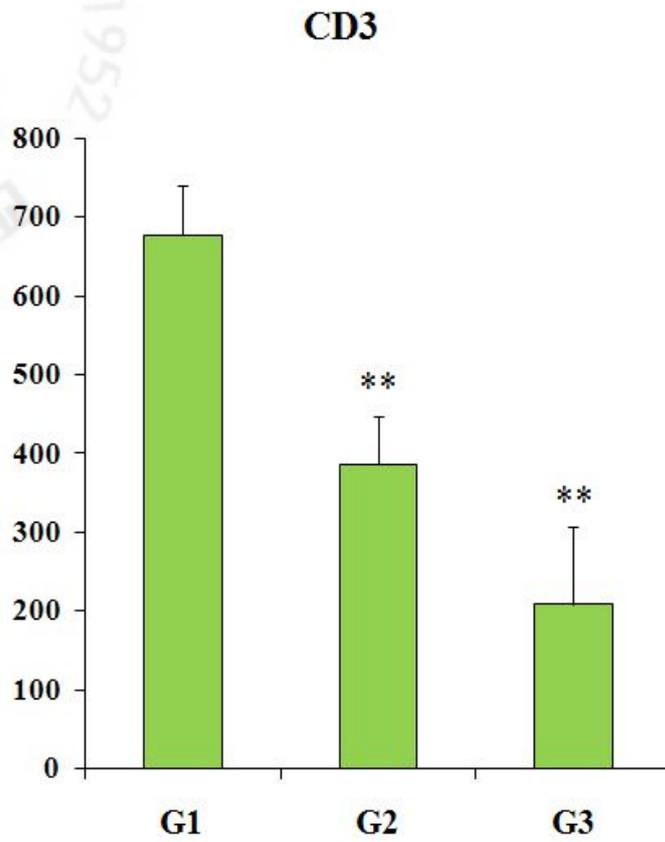


Fig. 3-12. Numbers of CD3 positive T cells in lymph nodes of each group by IHC. Bar=50  $\mu$ m. \*\*P<0.01.

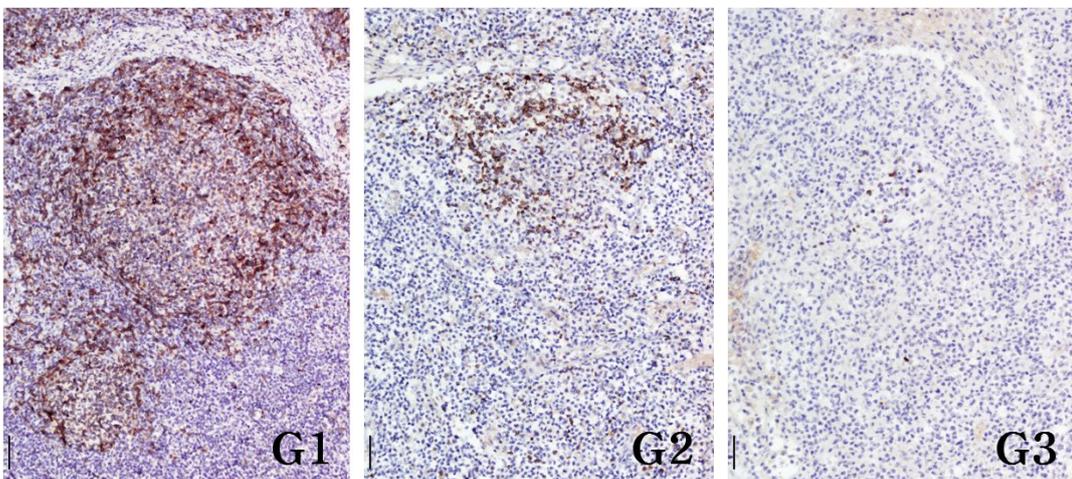
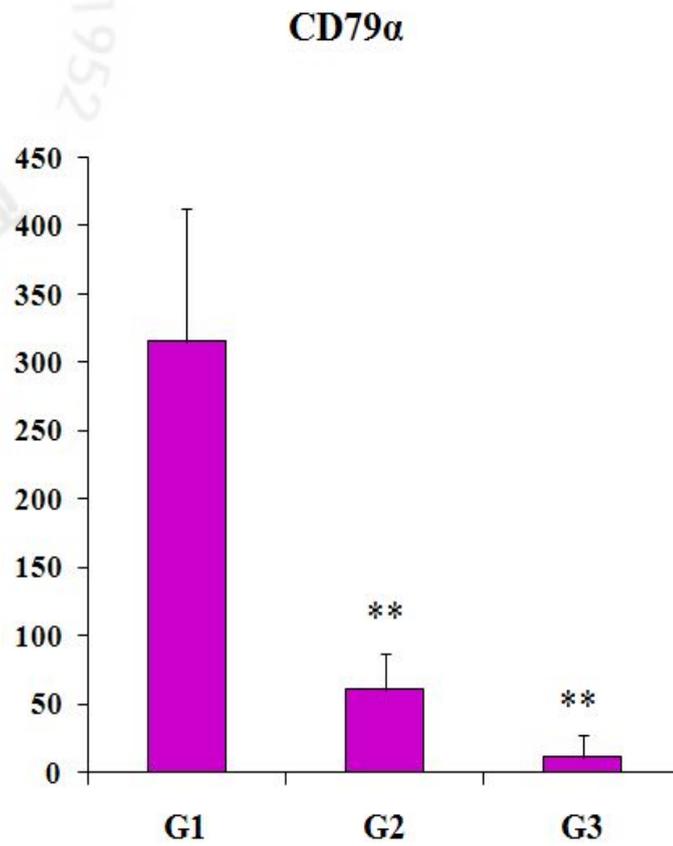


Fig. 3-13. Numbers of CD79 $\alpha$  positive B cells in lymph nodes of each group by IHC. Bar=50  $\mu$ m. \*\*P<0.01.

### Lysozyme

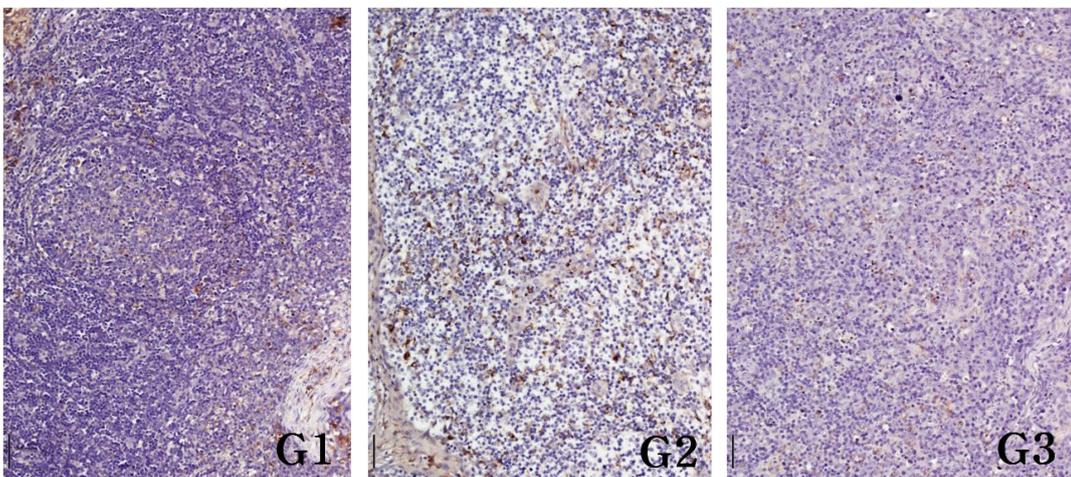
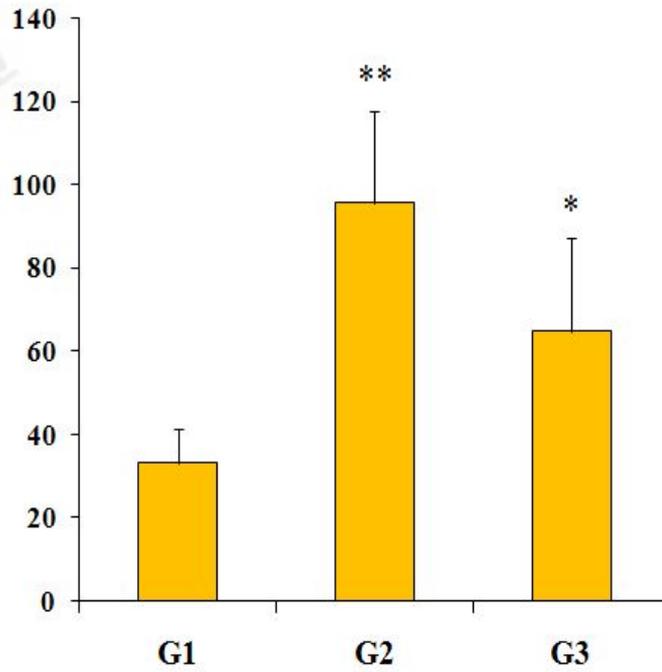


Fig. 3-14. Numbers of lysozyme positive macrophages in lymph nodes of each group by IHC. Bar=50  $\mu$ m. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

## Legends for Figures

Fig. 3-1. The mesenteric lymph nodes were severely enlarged.

Fig. 3-2. Cut surface of the mesenteric lymph nodes. Multiple red foci were observed in the lymph nodes.

Fig. 3-3. The superficial inguinal lymph nodes showed marked swelling and multiple red foci.

Fig. 3-4. Well-demarcated coagulation necrosis with marked congestion was found in lymph node. H&E. Bar=500  $\mu\text{m}$ .

Fig. 3-5. Note mixed population of inflammatory cells, necrotic cellular debris and hemorrhage in necrotic area. H&E. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

Fig. 3-6. Numerous basophilic inclusion bodies of PCV2 were observed in the necrotic area. H&E. Bar=20  $\mu\text{m}$ . Insert: Note PCV2 specific grape-like intracytoplasmic inclusion bodies in macrophage. H&E. Bar=10  $\mu\text{m}$ .

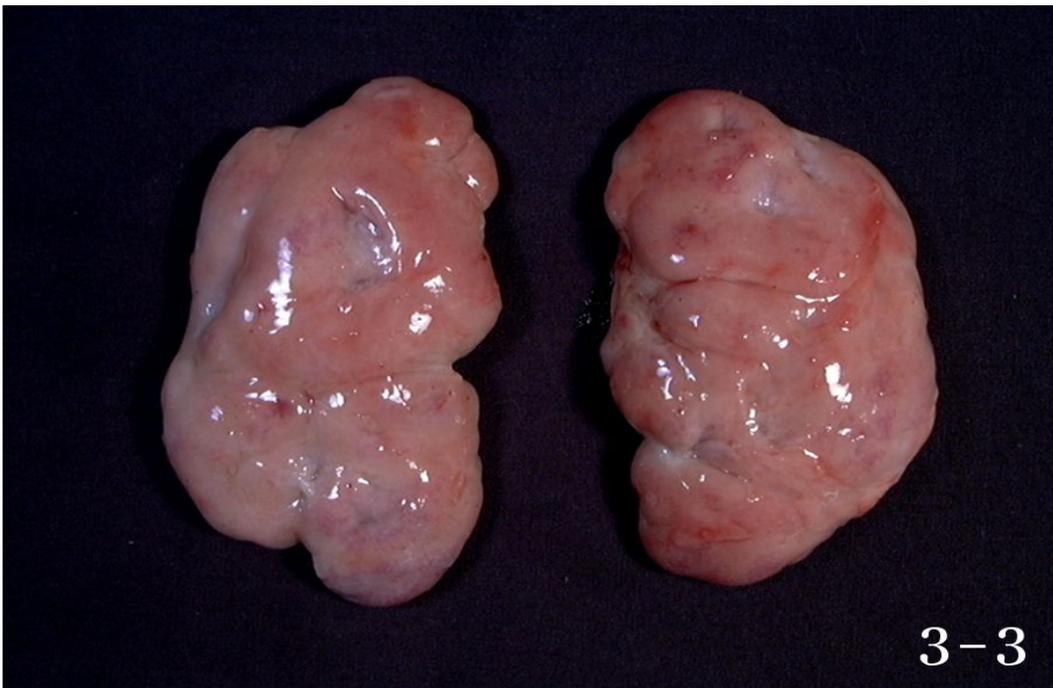
Fig. 3-7. Severe vascular congestion, edema and hemorrhage were found in the necrotic area. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

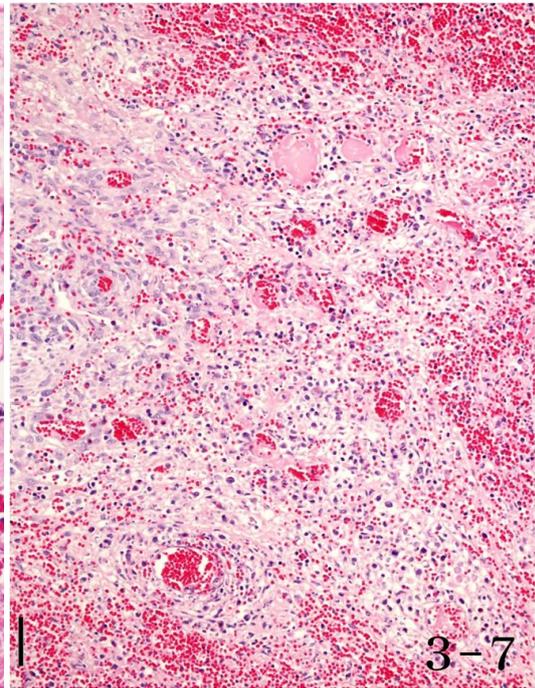
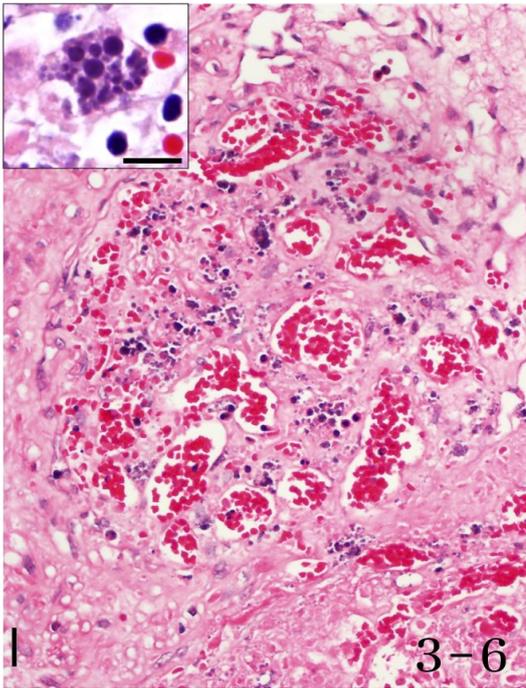
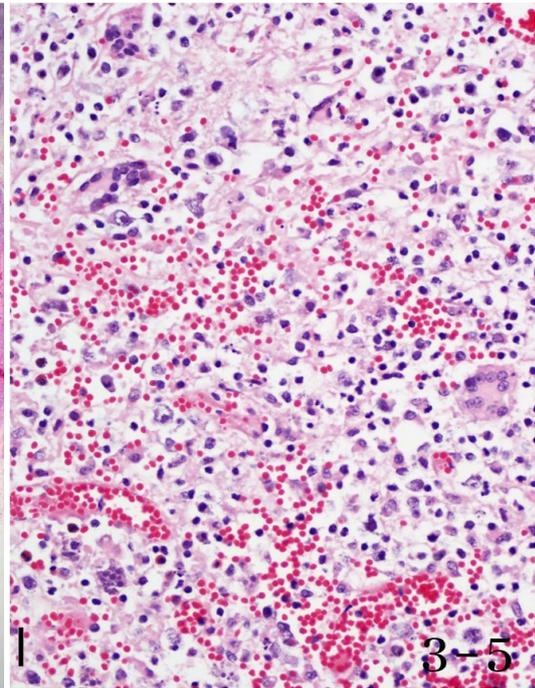
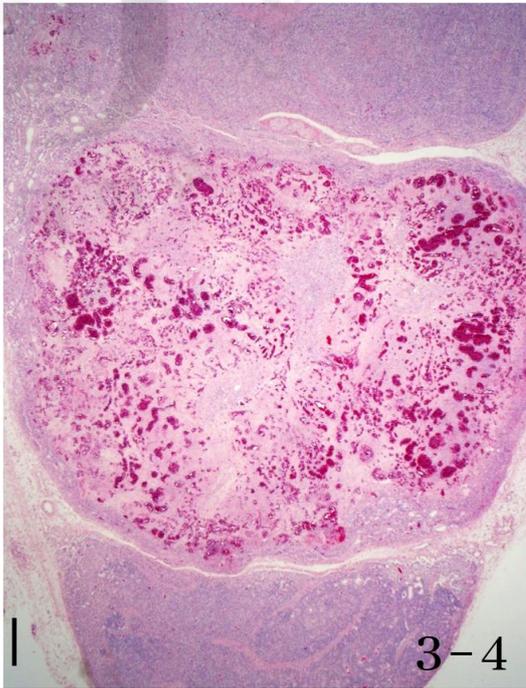
Fig. 3-8. Large blood vessel showed eosinophilic fibrinoid degeneration of vascular wall and intra-vascular thrombosis. H&E. Bar=50  $\mu\text{m}$ .

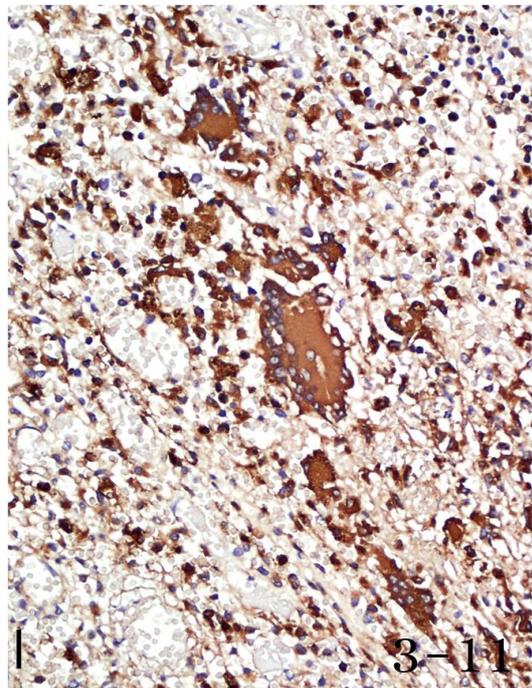
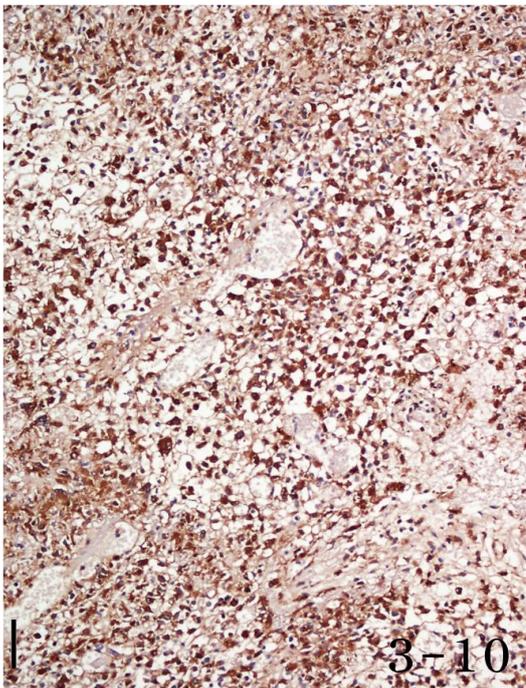
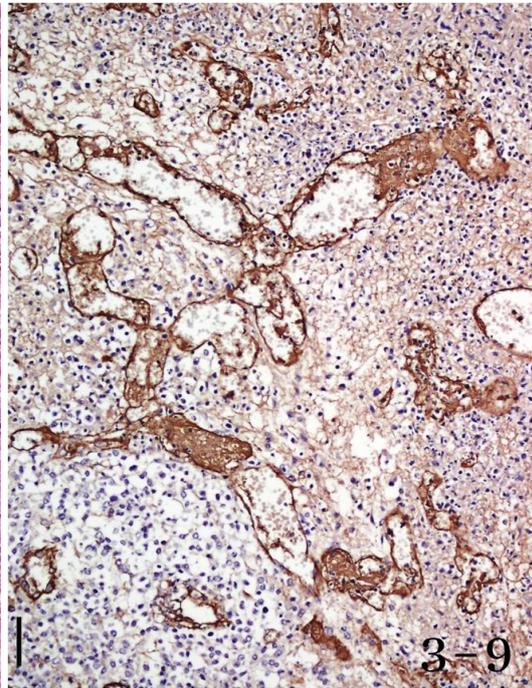
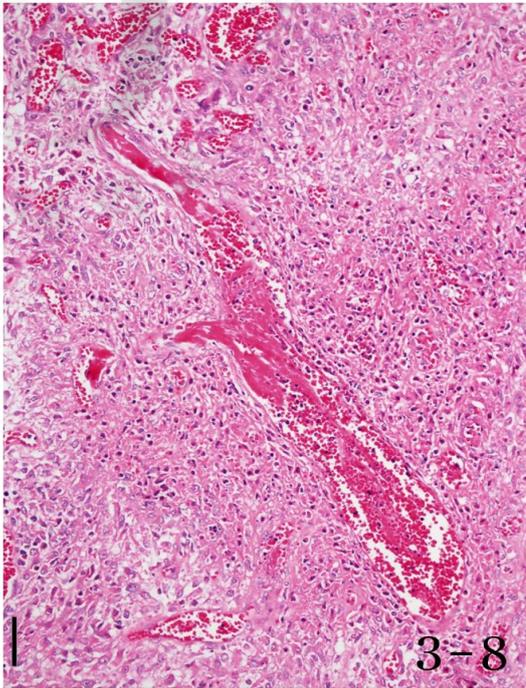
Fig. 3-9. Widespread endothelial and intravascular labeling of vWF in dilated blood vessels including high endothelial venules. IHC. Bar=50  $\mu$ m.

Fig. 3-10. Note diffuse positive reaction for numerous PCV2 antigens in the necrotic area. IHC. Bar=50  $\mu$ m.

Fig. 3-11. Multinucleated giant cells showed strong positive reactions for PCV2 antigen in lymph node. IHC. Bar=20  $\mu$ m.







#### IV. 고 찰

2003년부터 2010년까지 PCVAD로 진단된 돼지에서 괴사성 림프절염의 발생 상황을 조사한 결과, 6.4%의 발생률을 보였다. 이는 Segalés 등 [96]이 PCV2 자연 감염 돼지에서 조직병리검사를 통해 확인한 9.9%에 비해 다소 낮은 수치였다. 본 소견은 2005년 이후 매년 발생하고 있으며, PCVAD의 발생이 증가하면서 괴사성 림프절염의 발생도 증가하는 경향을 나타내고 있었다.

PCV2 감염은 서혜부 림프절을 비롯한 전신 림프절의 종대가 특징적이며, 체표 림프절의 경우에는 외부에서도 촉진이 가능할 정도로 커진다. 본 연구에서도 PCVAD로 진단된 돼지의 림프절은 육안적으로 종대되어 있었으며, 특히 괴사성 림프절염을 동반한 경우에는 그 크기가 5배 이상 증가하고 경도도 단단한 특징을 보였다. 이러한 림프절에 대한 병리조직학적 검사 결과, 괴사뿐만 아니라 다량의 만성 염증세포들이 림프절의 피질 전반에 유입되어 발생한 것으로 사료된다. 또한 대부분의 예에서 동반된 발적 소견은 조직학적으로 괴사부위 또는 그 주위로 혈관의 확장과 함께 출혈로 인하여 형성된 것으로 판단된다. 특히 괴사부위에서는 혈관벽이 변성되거나 심하게 확장된 내강에 혈전을 가지고 있는 혈관을 용이하게 관찰할 수 있었다.

본 연구에서 돼지의 림프절에 괴사 병변을 형성할 수 있는 바이러스, 세균 및 진균의 감염 여부를 확인하기 위한 다양한 검사를 시도하였다. 돼지에서 면역 장기에 출혈 또는 괴사 병변을 유발하는 대표적인 바이러스로는 CSFV와 ADV가 알려져 있다. CSFV는 Flaviviridae과, *Pestivirus*속으로 주로 돼지의 소화기나 호흡기로 감염되며, 대개 7~10일 정도의 잠복기를 거쳐 고열, 포개짐, 식욕결핍, 무기력, 결막염, 호흡기 증상, 변비 또는 설사 및 후지마비 등의 신경증상을 보인다 [55, 69]. 바이러스에 감염되어 급성 경과를 취하는 돼지에서는 비장, 편도 및 림프절과 같은 면역장기를 비롯한 여러 장기에서 출혈과 함께 괴사가 관찰된다 [55]. ADV는 Herpesviridae과, alphaherpesvirinae에 속하며 돼지를 비롯한 다양한 종류의 가축, 실험동물 및 야생 동물에 감수성이 있다 [6, 80, 110]. ADV는 직접

접촉 또는 호흡기계를 통하여 돼지에 감염되어 신경계, 호흡기계, 소화기계, 생식기계 및 조혈기계 장기에서 다양한 병변을 형성한다 [110]. ADV에 의한 국소적인 괴사병변은 비장, 간, 림프절, 부신에서 주로 관찰된다 [80]. Rodríguez-Arrijoa 등 [84]은 PCVAD 돼지의 종격림프절(mediastinal lymph node)에서 괴사성 림프절염을 확인하였으며, 괴사부위에서 PCV2 및 ADV 항원을 검출한 바 있다. 제주도는 국내에서 유일하게 2000년 이후 돼지열병과 돼지 오제스키병이 발생하지 않는 청정지역으로 선포한 바 있다. 본 연구에서는 PCR 검사결과, 괴사성 림프절염을 가진 돼지에서 ADV 항원은 검출되지 않았다. 또한 PRRSV에 대한 IHC 검사를 실시한 결과, 괴사성 림프절염이 관찰된 15두 중 단지 2두에서만 항원이 검출되었고 조직 내 존재하는 항원의 양도 비교적 적어 PRRSV 감염과 괴사성 림프절염 병변의 발생과는 밀접한 관련성이 없는 것으로 판단된다. 기타 세균과 진균의 존재여부를 확인하기 위한 특수염색에서도 전 두수 음성으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 검사한 돼지의 괴사성 림프절염은 PCV2의 감염과 가장 밀접한 관련성이 있음이 입증되었다.

Mandrioli 등 [61]은 ISH를 이용하여 림프절 내 PCV2 항원의 분포 정도에 따라 바이러스의 감염 시기를 3단계로 분류하였다. 즉, 항원이 주로 림프여포에만 국한되어 존재하는 경우는 초기(initial stage), 항원이 피질에서 조직구가 다수 침윤된 수질에 이르기까지 림프절 전반에 걸쳐 미만성으로 존재하는 경우는 중기(intermediated stage) 및 항원이 극히 일부의 세포에만 드물게 존재하는 경우는 말기(final stage)라고 보고하였다. 본 연구에서 괴사성 림프절염을 가지고 있는 G3군의 15두 중 1두를 제외하고는 모두 림프절에 미만성으로 다량의 항원이 존재하고 있었다. 따라서 PCV2 바이러스가 돼지에 감염된 후 중기 정도의 시기에 림프절로 다량의 바이러스 항원이 유입된 후 과다하게 증식되어 괴사성 림프절염이 병발하는 것으로 판단된다.

괴사성 림프절염과 유사한 병변으로 Carman 등 [14]은 PCVAD 돼지의 비장에서 경색(infarction) 병변을 확인하였으며, 경색부위는 혈관염과 무기질 침착(mineralization)도 관찰되었다. 또한 괴사된 혈관 주위로 염증과 함께 다량의 PCV2 항원이 존재함을 보고하였다.

최근 괴사성 림프절염의 발병기전으로는 두 가지의 가설이 제시되었다. 첫 번째는 PCV2 감염으로 혈전을 동반한 혈관 손상이 유발되고 이로 인해 인근 조직의 괴사가 발생한다는 설이며 [32], 두 번째는 조직 내 감염된 PCV2에 의한 직접적인 세포자멸사의 증가로 괴사가 유발된다는 설이다 [47]. PCV2의 ORF3는 caspase-8 pathway와 caspase-3 pathway를 활성화하여 세포자멸사를 유도하는데 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다 [56]. 그러나 PCV2에 감염된 돼지의 림프절을 대상으로 림프절의 반응과 세포자멸사와의 관계를 분석한 최근 연구에서는 림프구 고갈 병변과 세포자멸사와는 큰 연관성이 없는 것으로 보고되었다 [50, 61, 83]. Langohr 등 [52]은 실험적으로 PCV2b를 감염시킨 돼지의 여러 장기에서 만성 림프구 조직구성 또는 형질세포성 동맥주위염 및 동맥내막염(chronic lymphohistiocytic and plasmacytic peri- and endoarteritis)이 유발됨을 확인하였다. 또한 육아종성 및 괴사성 림프절염 부위에서 혈관폐색 소견을 확인하였다. Szeredi 등 [100]은 PCV2에 감염되어 호흡기 증상이 있는 140두의 돼지를 대상으로 폐장의 혈관 병변과 바이러스와의 관련성을 분석하였다. 주요 혈관 병변으로 섬유양 괴사(fibrinoid necrosis), 혈관염, 혈관주위염(perivasculitis) 및 혈관벽의 부종(intramural edema) 등을 관찰하였고, 약 78% 폐혈관 병변에서 PCV2 항원을 검출하였다. 혈전증은 비정상적인 혈관 내 응고물의 형성을 의미하며, 주된 발생 원인은 1) 혈관 내피세포의 손상 2) 혈류의 변화 3) 응고항진 상태가 있다 [105]. 혈관 내피세포의 손상은 다수의 동맥 질환에서 나타날 수 있다 [105]. 혈전의 구성 요소 중 하나인 혈소판(platelet)이 혈관 내피에 다량 부착하면서 혈전 형성이 시작되며, 이 때 혈소판 부착인자인 vWF가 혈관벽에 노출된다 [90]. 혈관 내피의 손상에 따른 본 인자의 증가는 혈관 내부에 혈전 형성을 촉진하는 역할을 하게 된다 [29]. vWF는 림프절의 정상적인 모세혈관과 고내피세정맥에도 물론 존재하고 있다 [82, 89]. 본 연구에서 PCVAD로 진단된 돼지의 림프절(G2군)에서는 정상 림프절(G1군)에 비해 vWF의 발현정도가 증가하였으며, 괴사성 림프절염이 동반된 PCVAD 돼지(G3군)에서는 매우 심하게 증가하여 고내피세정맥과 모세 혈관뿐만 아니라 혈관 내강에 있는 물질까지도 vWF에 양성반응을 나타내어 본 인자가 고도로 증가하였음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Galindo-Cardiel 등 [32]의 보고와도 일치하는 결과로 혈전을 동반한 심각한 맥관계의 손상으로 인하여

괴사성 림프절염이 유발되고 있음을 간접적으로 시사하고 있는 것으로 해석된다.

원발성 또는 속발성 면역결핍(primary or secondary immunodeficiency)은 병원성이 거의 없거나 낮은 감염원이라 할지라도 감염에 대한 숙주의 질병 감수성을 증가시키는 결과를 초래한다. 원발성 면역결핍은 유전적 소인에 의한 면역기관의 장애로 발생하며 돼지에서는 거의 알려져 있지 않다. 반면 속발성 면역결핍은 정상적인 면역기관을 가지고 있으나 질병에 대한 저항성을 억제하는 요인에 의해 발생한다. 돼지에서 이러한 속발성 면역결핍은 모체 이행항체가 충분하지 못하거나, 기타 스트레스, 영양불균형, 면역독성물질 및 면역억제 유발 질병에 의해 발생할 수 있다 [86].

PCV2 감염 돼지의 림프절에서 가장 두드러진 변화는 T, B 림프구의 현저한 감소와 단핵염증세포 및 과립구의 증가이다 [2, 24, 96]. 이와 같은 림프절 내 림프구 수의 심한 감소는 PCV2가 돼지에서 면역억제를 유발할 수 있는 대표적인 바이러스 중 하나라는 사실을 뒷받침하고 있다. 최근에는 세포 표면 단백질에 특이적으로 반응하는 항체를 이용하여 림프장기를 구성하는 주요 세포들을 구분할 수 있는 면역학적 기법이 확립되어 있다. T세포 표지자인 CD3는 신호전달을 매개하는 T 림프구 막투과수용체의 세포질 부분에 반응하고, B 림프구에 존재하는 CD79a 표지자는 파라핀 포매 조직에서도 사용할 수 있어 병리조직학적 연구에 유용하게 활용되고 있다 [90]. 본 연구에서 IHC를 이용하여 각 시험군 별로 림프절의 중요 구성 세포인 T, B 림프구 및 큰포식세포의 수적 분포 상황을 비교 분석한 결과, PCVAD 발병 돼지(G2군, G3군)는 정상 돼지(G1군)에 비해 T, B 림프구의 유의성 있는 감소( $P < 0.01$ )를 보이고 있어 기존 연구 결과 [89]와 일치하였다. 특히 괴사성 림프절염이 있는 G3군에서는 가장 심한 림프구의 감소가 대부분의 돼지에서 확인되었다. 따라서 PCV2에 감염된 돼지에서 림프절에 존재하는 항원의 양이 증가할수록 림프구의 고갈이 더욱 심해지는 것으로 판단하였다.

## 총 결론

2003년부터 2010년까지 제주도에서 PCV2 감염에 의한 PCVAD의 발생상황을 다양한 측면에서 분석하고 병리학적 특징에 대하여 연구하였으며, PCV2의 유전자형인 PCV2a 및 PCV2b의 감염 양상을 비교 분석하였다. 또한 최근에 알려진 괴사성 림프절염에 대한 병리학적 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

2003년부터 2010년까지 제주도 내 PCVAD의 발생률은 31.2%였다. 연도별로는 2003년 이후 질병의 발생이 증가하여 2006년 가장 높은 발생률을 나타내었으나, 이후 점차적으로 감소하였다.

제주도에서는 PCVAD가 환절기인 3~4월에 가장 많이 발생하였으며, 지역별로는 한림읍이 포함된 제주시가 서귀포시에 비해 높은 발생을 보였다. 돼지의 연령별로는 이유자돈에서 PCVAD가 가장 많이 발생하였다.

PCVAD로 진단된 돼지의 주요 임상증상은 위축, 호흡곤란, 설사였으며, 육안적으로는 폐장의 퇴축부전과 고무양 경도 및 림프질의 종대가 특징적이었다. 주요 병리조직학적 소견으로는 폐장의 기관지 또는 세기관지 주위 섬유세포 증식이 동반된 간질성 폐렴과 림프질의 조직구 침윤을 동반한 림프구 고갈이었다.

PCVAD 돼지에서 PCV2와 중복 감염된 병원체의 경우 바이러스는 PRRSV, 세균은 *S. spp.*가 가장 많은 것으로 조사되었다. 중복 감염 양상별로는 3중 감염이 가장 흔하였다.

1994년부터 1998년까지 파라핀 포매 블록을 이용하여 PCV2 항원을 역추적 검사를 실시한 결과, 1995년 시료에서부터 항원이 검출되기 시작하였다.

2003년부터 2010년까지 제주도 돼지를 대상으로 PCV2a와 PCV2b의 감염 상황을 조사한 결과, 2003년을 제외하고 모든 해에 걸쳐 PCV2b가 우세하게 존재하고 PCV2a는 감소하는 경향을 나타내었다.

PCVAD로 진단된 돼지 중에서 괴사성 림프절염 병변을 가진 개체는 6.4%로 확인되었다. 육안적으로 괴사성 림프절염이 있는 림프절은 고도로 종대되고 단단하며, 심하게 발적되어 있었다.

괴사성 림프절염과 병원체 감염과의 연관성을 검사한 결과 PCV2 감염이 가장 밀접하게 관련되어 있는 반면 PRRSV 등의 감염과는 큰 상관성이 없었다.

괴사성 림프절염이 관찰된 G3군의 돼지는 정상(G1군) 혹은 PCVAD로 진단되었으나 괴사성 림프절염이 관찰되지 않은 돼지(G2군)에 비하여 림프절에서 PCV2 항원의 분포가 가장 많고 vWF에 대해서도 가장 강하게 반응하였다. 또한 G3군이 다른 시험군에 비해 T 및 B 림프구의 감소가 가장 심하였다. 따라서 림프절에 광범위하게 감염된 PCV2로 인한 혈관의 손상이 괴사성 림프절염의 직접적인 발병기전인 것으로 추정된다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때 제주도에서 발생하고 있는 PCVAD는 폐장과 림프절 뿐만 아니라 다른 장기에도 영향을 주는 전신성 질병이며, 2006년 가장 많은 발생을 하였으나 이후 점차 감소하고 있는 추세에 있다. PCV2 바이러스의 유전자형은 PCV2b가 2a에 비하여 더욱 많이 감염되어 있었다. 또한 괴사성 림프절염은 PCV2가 돼지에 심하게 감염되었을 때 나타날 수 있는 PCVAD의 또다른 질병 유형으로 판단된다.

## 참고문헌

1. 김문, 한정희. 돼지 쉼코바이러스 2형 국내분리주의 유전학적 특성 규명. 한국가축위생학회지 2009, 32, 1-10.
2. 김재훈, 노인순, 손현주, 진영화, 황의경, 윤경진. 국내 이유자돈의 쉼코바이러스 감염에 의한 이유후전신소모성 증후군. 대한수의학회지 2003, 43, 463-469.
3. 노인순, 이경우, 김재훈, 한정희, 진영화. 국내 분리 porcine circovirus 2의 이유자돈에 대한 병원성 시험연구. 대한수의학회지 2007, 47, 175-185.
4. 박최규, 이경기, 김현수. Porcine circovirus 2 국내 분리주의 유전적 특성. 대한수의학회지 2004, 44, 571-579.
5. 소병재, 이경기, 김달영, 박최규, 임숙경, 주후돈, 김재훈, 진영화. 돼지 바이러스성 변식장애질병 모니터링 및 진단법 개선 연구. 국립수의과학검역원 연구보고서 2001, 277-297.
6. 이중복, 안수환, 김병한, 송재영, 김용희, 설동섭. 돼지 오체스키병에 관한 연구: 1. 감염자돈으로부터 원인체의 분리 및 동정. 대한수의학회지 1988, 28, 99-103.
7. Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, Espuna E, Saubi N, Riera P, Bøtner A, Charreyre CE. Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. Vet Microbiol 1999, 66, 115-123.

8. **Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C.** Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 1998, **142**, 467-468.
9. **Allan GM, Ellis JA.** Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 2000, **12**, 3-14.
10. **An DJ, Roh IS, Song DS, Park CK, Park BK.** Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res* 2007, **129**, 115-122.
11. **Banks WJ.** Applied veterinary histology. 3rd ed. pp.277-297, Mosby-Year Book, St. Louis, 1993.
12. **Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM.** Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Methods* 2004, **122**, 171-178.
13. **Cameron R.** Diseases of the skin. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). Diseases of swine. 9th ed. p.179-198, Blackwell Publishing, Ames, 2006.
14. **Carman S, Cai HY, DeLay J, Youssef SA, McEwen BJ, Gagnon CA, Tremblay D, Hazlett M, Lulis P, Fairles J, Alexander HS, van Dreumel T.** The emergence of a new strain of porcine circovirus-2 in Ontario and Quebec swine and its association with severe porcine circovirus associated disease--2004-2006. *Can J Vet Res* 2008, **72**, 259-268.

15. **Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, Rowland RR, Dunham AG.** Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 2007, **152**, 1035-1044.
16. **Chianini F, Majó N, Segalés J, Domínguez J, Domingo M.** Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 2003, **94**, 63-75.
17. **Choi C, Chae C.** In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 1999, **121**, 265-270.
18. **Choi C, Chae C, Clark EG.** Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2000, **12**, 151-153.
19. **Choi J, Stevenson GW, Kiupel M, Harrach B, Anothayanontha L, Kanitz CL, Mittal SK.** Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can J Vet Res* 2002, **66**, 217-224.
20. **Choi KS, Chae JS.** Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Republic of Korea. *Res Vet Sci* 2008, **84**, 497-501.

21. Cortey M, Pileri E, Sibila M, Pujols J, Balasch M, Plana J, Segalés J. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J* 2011, **187**, 363-368.
22. Darwich L, Segalés J, Domingo M, Mateu E. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002, **9**, 236-242.
23. Darwich L, Balasch M, Plana-Durán J, Segalés J, Domingo M, Mateu E. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in response to mitogen, superantigen or recall viral antigens. *J Gen Virol* 2003, **84**, 3453-3457.
24. Darwich L, Segalés J, Mateu E. Pathogenesis of postweaning multisystemic wasting syndrome caused by Porcine circovirus 2: An immune riddle. *Arch Virol* 2004, **149**, 857-874.
25. Dewey CE. Diseases of the nervous and locomotor systems. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). *Diseases of swine*. 9th ed. p.87-111, Blackwell Publishing, Ames, 2006.
26. Drolet R, Thibault S, D'allaire S, Thomson R, Done ST. Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS): an overview of the disease. *Swine Health Prod* 1999, **7**, 283-285.

27. Dupont K, Nielsen EO, Bækbo P, Larsen LE. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet Microbiol* 2008, **128**, 56-64.
28. Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 1998, **39**, 44-51.
29. Fukuchi M, Watanabe J, Kumagai K, Katori Y, Baba S, Fukuda K, Yagi T, Iguchi A, Yokoyama H, Miura M, Kagaya Y, Sato S, Tabayashi K, Shirato K. Increased von Willebrand factor in the endocardium as a local predisposing factor for thrombogenesis in overloaded human atrial appendage. *J Am Coll Cardiol* 2001, **37**, 1436-1442.
30. Gagnon CA, del Castillo JR, Music N, Fontaine G, Harel J, Tremblay D. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *J Vet Diagn Invest* 2008, **20**, 545-558.
31. Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 2007, **48**, 811-819.
32. Galindo-Cardiel I, Grau-Roma L, Pérez-Maíllo M, Segalés J. Characterization of necrotizing lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Comp Pathol* 2011, **144**, 63-69.

33. Gelderblom H, Kling S, Lurz R, Tischer I, von Bülow V. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). *Arch Virol* 1989, **109**, 115-120.
34. Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V. Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med* 2009, **23**, 1151-1163.
35. Grierson SS, King DP, Sandvik T, Hicks D, Spencer Y, Drew TW, Banks M. Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK. *Arch Virol* 2004, **149**, 1171-1183.
36. Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 1998, **72**, 5262-5267.
37. Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, Grudeski E, Nayar GP. PCR detection and characterization of type-2 porcine circovirus. *Can J Vet Res* 2000, **64**, 44-52.
38. Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol* 2010, **143**, 120-131.
39. Harding JCS, Clark EG. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swine Health Prod* 1997, **5**, 201-203.

40. **Harding JCS, Clark EG, Strokappe JH, Willson PI, Ellis JA.** Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *Swine Health Prod* 1998, **6**, 249-254.
41. **Harms PA, Halbur PG, Sorden SD.** Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J Swine Health Prod* 2002, **10**, 27-30.
42. **Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR.** Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* 2008, **132**, 201-207.
43. **Kawashima K, Katsuda K, Tsunemitsu H.** Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J Vet Diagn Invest* 2007, **19**, 60-68.
44. **Kennedy S, Segalés J, Rovira A, Scholes S, Domingo M, Moffett D, Meehan B, O'Neill R, McNeilly F, Allan G.** Absence of evidence of porcine circovirus infection in piglets with congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 2003, **15**, 151-156.
45. **Kim D, Ha Y, Oh Y, Chae C.** Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Vet J* 2011, **188**, 115-117.
46. **Kim HK, Lou Y, Moon HJ, Park SJ, Rho SM, Han JY, Nguyen VG, Park BK.** Quantification and genotyping of PCV2 DNA in the tissues of PCV2-infected conventional pigs with different clinical signs. *Korean J Vet Res* 2011, **51**, 7-14.

47. **Kim J, Chae C.** Necrotising lymphadenitis associated with porcine circovirus type 2 in pigs. *Vet Rec* 2005, **156**, 177-178.
48. **Kim J, Chung HK, Chae C.** Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J* 2003, **166**, 251-256.
49. **Kim J, Chung HK, Jung T, Cho WS, Choi C, Chae C.** Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J Vet Med Sci* 2002, **64**, 57-62.
50. **Krakovka S, Ellis J, McNeilly F, Meehan B, Oglesbee M, Alldinger S, Allan G.** Features of cell degeneration and death in hepatic failure and systemic lymphoid depletion characteristic of porcine circovirus-2-associated postweaning multisystemic wasting disease. *Vet Pathol* 2004, **41**, 471-481.
51. **Krakovka S, Ellis J, McNeilly F, Waldner C, Allan G.** Features of porcine circovirus-2 disease: correlations between lesions, amount and distribution of virus, and clinical outcome. *J Vet Diagn Invest* 2005, **17**, 213-222.
52. **Langohr IM, Stevenson GW, Nelson EA, Lenz SD, HogenEsch H, Wei H, Pogranichniy RM.** Vascular lesions in pigs experimentally infected with porcine circovirus type 2 serogroup B. *Vet Pathol* 2010, **47**, 140-147.
53. **Larochelle R, Bielanski A, Müller P, Magar R.** PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 2000, **38**, 4629-4632.

54. **Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R.** Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 1999, **80**, 69-75.
55. **Le Potier MF, Mesplède A, Vannier P.** Classical swine fever and other pestiviruses. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). *Diseases of swine*. 9th ed. p.309-322, Blackwell Publishing, Ames, 2006.
56. **Liu J, Chen I, Kwang J.** Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *J Virol* 2005, **79**, 8262-8274.
57. **López A.** Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In: McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF (ed). *Thomson's veterinary pathology*. 3rd ed. p.125-195, Mosby, St. Louis, 2001.
58. **Lyoo KS, Kim HB, Joo HS.** Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of Porcine circovirus-2. *J Vet Diagn Invest* 2008, **20**, 283-288.
59. **Lyoo KS, Park YH, Park BK.** Prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus from aborted fetuses and pigs with respiratory problems in Korea. *J Vet Sci* 2001, **2**, 201-207.
60. **Lyoo YS, Kim JH, Park CK.** Identification of porcine circoviruses with genetic variation from lymph nodes collected in pigs with PMWS. *Korean J Vet Res* 1999, **39**, 353-358.

61. **Mandrioli L, Sarli G, Panarese S, Baldoni S, Marcato PS.** Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 2004, **97**, 25-37.
62. **Mankertz A, Domingo M, Folch JM, LeCann P, Jestin A, Segalés J, Chmielewicz B, Plana-Durán J, Soike D.** Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res* 2000, **66**, 65-77.
63. **Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G, Buhk HJ.** Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J Virol* 1997, **71**, 2562-2566.
64. **McIntyre L, Chaiyakul M, Clark EG, Marshall F, Czub M.** Genomic analysis of porcine circovirus type-2 isolates in Alberta pigs demonstrating clinical porcine circovirus associated disease (PCVAD). *Can J Vet Res* 2010, **74**, 149-52.
65. **McNeilly F, McNair I, Mackie DP, Meehan BM, Kennedy S, Moffett D, Ellis J, Krakowka S, Allan GM.** Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch Virol* 2001, **146**, 909-922.
66. **Meehan BM, Creelan JL, McNulty MS, Todd D.** Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 1997, **78**, 221-227.

67. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J Gen Virol* 1998, **79**, 2171-2179.
68. Misinzo G, Delputte PL, Meerts P, Lefebvre DJ, Nauwynck HJ. Porcine circovirus 2 uses heparan sulfate and chondroitin sulfate B glycosaminoglycans as receptors for its attachment to host cells. *J Virol* 2006, **80**, 3487-3494.
69. Moennig V, Floegel-Niesmann G, Greiser-Wilke I. Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge. *Vet J* 2003, **165**, 11-20.
70. Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, Halbur PG, Morgan MK, Yoon KJ, Paul PS. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 1998, **36**, 2535-2541.
71. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 2000, **81**, 2281-2287.
72. Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, **241**, 92-97.

73. O'Connor B, Gauvreau H, West K, Bogdan J, Ayroud M, Clark EG, Konoby C, Allan G, Ellis JA. Multiple porcine circovirus 2-associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit. *Can Vet J* 2001, **42**, 551-553.

74. Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J Vet Med Sci* 1999, **61**, 1119-1123.

75. Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 2007, **19**, 591-615.

76. Opriessnig T, Halbur PG. Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res* 2011, DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.014.

77. Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, Patterson AR, Pal N, Carman S, Meng XJ, Halbur PG. Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection. *J Gen Virol* 2008, **89**, 2482-2491.

78. Olvera A, Cortey M, Segalés J. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* 2007, **357**, 175-185.

79. **Pallarés FJ, Halbur PG, Opriessnig T, Sorden SD, Villar D, Janke BH, Yaeger MJ, Larson DJ, Schwartz KJ, Yoon KJ, Hoffman LJ.** Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Vet Diagn Invest* 2002, **14**, 515-519.

80. **Pejsak ZK, Trusczyński MJ.** Aujeszky's disease (Pseudorabies). In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). *Diseases of swine*. 9th ed. p.419-420, Blackwell Publishing, Ames, 2006.

81. **Pogranichniy RM, Yoon KJ, Harms PA, Sorden SD, Daniels M.** Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 2002, **14**, 449-456.

82. **Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT.** Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 2006, **54**, 385-395.

83. **Resendes AR, Majó N, Segalés J, Mateu E, Calsamiglia M, Domingo M.** Apoptosis in lymphoid organs of pigs naturally infected by porcine circovirus type 2. *J Gen Virol* 2004, **85**, 2837-2844.

84. **Rodríguez-Arriolja GM, Segalés J, Rosell C, Quintana J, Ayllón S, Camprodón A, Domingo M.** Aujeszky's disease virus infection concurrent with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet Rec* 1999, **144**, 152-153.

85. **Rodríguez-Arrijoja GM, Segalés J, Balasch M, Rosell C, Quintant J, Folch JM, Plana-Durán J, Mankertz A, Domingo M.** Serum antibodies to porcine circovirus type 1 and type 2 in pigs with and without PMWS. *Vet Rec* 2000, **146**, 762-764.

86. **Roth JA, Thacker EL.** Immune system. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). *Diseases of swine*. 9th ed. p.15-35, Blackwell Publishing, Ames, 2006.

87. **Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara JA, Folch JM, Rodríguez-Arrijoja GM, Duran CO, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M.** Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 2000, **146**, 40-43.

88. **Rosell C, Segalés J, Plana-Durán J, Balasch M, Rodríguez-Arrijoja GM, Kennedy S, Allan GM, McNeilly F, Latimer KS, Domingo M.** Pathological, immunohistochemical, and in-situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J Comp Pathol* 1999, **120**, 59-78.

89. **Sarli G, Mandrioli L, Laurenti M, Sidoli L, Cerati C, Rolla G, Marcato PS.** Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol* 2001, **83**, 53-67.

90. **Searcy G.** The hematopoietic system. In: McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF (ed). *Thomson's veterinary pathology*. 3rd ed. p.325-379, Mosby, St. Louis, 2001.

91. **Segalés J.** Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res* 2011, DOI: 10.1016/j.virusres.2011.10.007.
92. **Segalés J, Allan GM, Domingo M.** Porcine circovirus diseases. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (ed.). *Diseases of swine*. 9th ed. p.299-307, Blackwell Publishing, Ames, 2006.
93. **Segalés J, Cortey M.** Changes in age at diagnosis of PMWS in pigs in Spain, 1998 to 2008. *Vet Rec* 2010, **167**, 940-941.
94. **Segalés J, Domingo M, Chianini F, Majó N, Domínguez J, Darwich L, Mateu E.** Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol* 2004, **98**, 151-158.
95. **Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Bækbo P, Allan G.** PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec* 2008, **162**, 867-868.
96. **Segalés J, Rosell C, Domingo M.** Pathological findings associated with naturally acquired porcine circovirus type 2 associated disease. *Vet Microbiol* 2004, **98**, 137-149.
97. **Segalés J, Allan GM, Domingo M.** Porcine circovirus diseases. *Anim Health Res Rev* 2005, **6**, 119-142.

98. **Sorden SD, Harms PA, Nawagitgul P, Cavanaugh D, Paul PS.** Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Vet Diagn Invest* 1999, **11**, 528-530.
99. **Stevenson GW, Kiupel M, Mittal SK, Choi J, Latimer KS, Kanitz CL.** Tissue distribution and genetic typing of porcine circoviruses in pigs with naturally occurring congenital tremors. *J Vet Diagn Invest* 2001, **13**, 57-62.
100. **Szeredi L, Dán A, Solymosi N, Cságola A, Tuboly T.** Association of porcine circovirus type 2 with vascular lesions in porcine pneumonia. *Vet Pathol* 2011, DOI: 10.1177/0300985811406888.
101. **Thacker EL.** Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001, **17**, 551-565.
102. **Thibault S, Drolet R, Germain MC, D'Allaire S, Larochelle R, Magar R.** Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* 1998. **35**, 108-116.
103. **Thomson JR, Higgins RJ, Smith WJ, Done SH.** Porcine dermatitis and nephropathy syndrome. clinical and pathological features of cases in the United Kingdom (1993-1998). *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002, **49**, 430-437.
104. **Tischer I, Miels W, Wolff D, Vagt M, Griem W.** Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch Virol* 1986, **91**, 271-276.

105. **Van Vleet JF, Ferrans VJ.** Cardiovascular system. In: McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF (ed). Thomson's veterinary pathology. 3rd ed. p.197-233, Mosby, St. Louis, 2001.

106. **Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS, Ellis JA, Allan GM.** Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2. *J Vet Diagn Invest* 2000, **12**, 400-405.

107. **Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJ, Elbers AR.** Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet Microbiol* 2004, **19**, 203-214.

108. **Wen L, Guo X, Yang H.** Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China. *Vet Microbiol* 2005, **110**, 141-146.

109. **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.** Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 1999, **11**, 530-532.

110. **Zachary JF.** Nervous system. In: McGavin MD, Zachary JF (ed). Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed. p.833-971, MOSBY ELSEVIER, St. Louis, 2007.

## 요 약

# 제주도 내 Porcine Circovirus Associated Disease의 발생상황 조사 및 병리학적 연구

돼지 썬코바이러스 2형(PCV2)은 porcine circovirus associated disease(PCVAD)의 원인체로 알려져 있으며, 전 세계적으로 양돈 산업에 큰 경제적 손실을 주고 있는 중요한 바이러스이다.

PCVAD의 발생 상황을 알아보기 위하여, 제주도 소재 양돈 농장으로부터 제주대학교 수의과대학 병리학교실에 의뢰된 돼지를 실험에 공여하였다. 총 1,003두 돼지를 조사한 결과, 313두(31.2%)가 PCVAD로 진단되었다. 가장 특징적인 임상증상은 위축 및 호흡곤란과 같은 호흡기증상 이었다. PCVAD 돼지에서 병리조직학적 소견은 간질성 폐렴과 림프절의 림프구 고갈이 가장 특징적인 병변으로 확인되었다. 감염 유형별로는 PCV2와 PRRSV의 중복 감염이 가장 빈번하였다. 파라핀 블록을 이용한 중합효소연쇄반응(PCR) 검사 결과, 1995년 시료에서부터 PCV2 감염이 확인되었다.

최근의 PCVAD 연구는 PCV2 바이러스의 유전자형 분석을 통한 역학적 측면에 초점이 맞추어져 있다. 제주도 돼지에서 PCV2a 및 PCV2b 유전자형의 발생 상황을 조사하기 위하여 총 375두의 돼지에 대하여 PCR을 실시하였다. 그 결과, PCV2a와 PCV2b는 각각 44.0%, 98.7%가 검출되었다. PCV2b는 2003년 이후 증가하여 2005년부터는 의뢰된 시료에서 100%의 감염률이 지속되었다.

괴사성 림프절염은 PCV2에 자연 감염된 돼지에서 나타날 수 있다. 본 연구에서 PCVAD로 진단된 돼지 중 괴사성 림프절염 병변을 가진 개체는 20두(6.4%)로 확인되었다. 괴사성 림프절염과 병원체 감염과의 연관성을 검사한 결과 PCV2 감염이 가장 밀접하게 관련되어 있는 반면 PRRSV 등의 감염과는 큰 상관성이 없었다. 면역조직화학염색을 통하여 림프구 고갈은 괴사성

림프절염을 동반한 PCVAD 이환 돼지에서 더욱 심하게 나타났다. 따라서 림프절에 광범위하게 감염된 PCV2로 인한 혈전을 동반한 혈관의 손상이 괴사성 림프절염의 직접적인 발병기전인 것으로 추정된다.

---

주요어: 면역조직화학염색, 괴사성 림프절염, PCR, PCVAD, PCV2a, PCV2b