

돼지 유행성 설사 바이러스의 분리동정

박남용 · 조경오 · 조성수* · 하용공*

서 론

돼지 유행성 설사(porcine epidemic diarrhea; 이하 PED로 약칭)는 자돈뿐만 아니라 성돈에서도 심한 설사를 주증상으로 하는 급성 바이러스성 전염병으로서 우리나라에서도 발병되고 있는 것 같다고 2,3년 전부터 양돈 업계에서 논란이 많았던 질병이다. 1972년 영국¹³⁾에서 처음 보고된 이래 유럽^{17,20)}과 일본⁶⁾에서 보고되었으며, 국내에서의 정식보고는 없는 것 같다.

PED 바이러스는 전염성 위장염(transmissible gastroenteritis; 이하 TGE로 약칭)의 원인 바이러스와 같은 코로나바이러스과의 바이러스로서 외막에 표면돌기(projection)를 가진 평균 130nm 크기의 RNA 바이러스이며^{7,15)} 또한 이들은 외형상 매우 유사하고 유발된 임상증상이나 병리조직학적 소견도 대동소이 하여 그 감별이 쉽지 않은 것이 사실이다.

PED 바이러스는 트립신이 첨가된 Vero cell(African green monkey kidney cells)에서는 증식이 잘 되지만, TGE 바이러스가 잘 배양되는 PK15 (porcine kidney cells), ST(McClurkin swine testicle)세포, SPK(primary swine kidney)세포 그리고 SK2(secondary swine kidney) 세포에서는 트립신의 첨가유무와 상관없이 증식이 되지 않는 특성이 있다.^{7,8)}

지난 겨울에 이어 금년 봄에 이르기까지 돼지의 설사질환이 전국적으로 확산되어 관련업계에 큰 피해를 입히면서 심각했던 이 질병은 대부분의 TGE가 아닌 PED로 판명되었기에 그 증례의 한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 : 약 20,000두 규모의 사양관리 양호한 농장

전남대학교 수의과대학 · * 중앙가축전염병 연구소

의 35일령 육성돈 돼지(A-1)와 60일령 육성돈 돼지(A-2)의 분변 및 장을 재료로 사용하였는데 지난 1993년 2월 5일경부터 폭발적으로 전파를 하는 설사질환이 있었던 곳이지만 이들 돼지들의 모돈은 임신중에 TGE 바이러스, 로타바이러스, 클로스트리디움 및 대장균 혼합백신을 분만 5주전과 2주전에 2차에 걸쳐서 철저히 수행했던 양돈장이다.

분변에서 바이러스의 전자현미경적 관찰 : 장 내용물을 PBS로 5배 희석하여 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 10,000 Xg에서 2시간 초원심분리하였다. 그 결과 생긴 작은 입자층을 증류수에 부유시킨 후 formvar-coated grid에 3분간 봉입후 2% potassium phosphotungstate(pH 7.2)로 2분간 염색하여 Carl Zeiss 109 투과전자현미경으로 관찰하였다.

간접면역형광항체법 : 냉동보관중인 장조직을 5 μ m로 냉동절편한 후 아세톤에 5분간 고정하였고, Tris buffer로 5분간씩 3번 수세하였다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위하여 10배 희석한 정상 송아지 혈청 (Sigma, USA)을 40°C에서 15분간 작용시킨 후 5분간씩 3번 Tris buffer로 씻어낸 후 1차 항체로서 50배 희석한 porcine anti-PED virus hyperimmune serum(스위스 쥘리히 수의과대학 바이러스학 교실 M. Ackermann 교수 분양)을 30°C에서 60분간 작용시킨 다음 Tris buffer로 5분간씩 3번 수세하였다. 이차항체는 100배 희석한 FITC-labelled goat anti-porcine anti-body (Biomeda, USA)를 30°C에서 40분간 작용시켰으며, 5분간씩 3번 Tris buffer로 씻은 후 글리세린으로 봉입하여 형광현미경 (Olympus, Japan)으로 검하였다.

주화세포 배양 : PED 바이러스의 분리 및 배양에 사용된 주화세포는 Vero, porcine kidney cells(PK15), McClurkin swine testicle(ST)세포, primary swine kidney(SPK)세포 그리고 secondary swine kidney(SK2)세포를 사용하였

다.

중식배지는 Eagle's minimal essential medium(EMEM, Gibco, USA)에 10% heatinactivated fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA) 그리고 1ml당 100IU penicillin 과 100 μ g의 스트렙토마이신을 넣었다. 유지배지는 EMEM에 2% FBS와 0.3% tryptose phosphate broth(Difco, USA), 0.02% yeast extract(E. Merck AG, Germany) 그리고 ml당 10 μ g의 트립신을 첨가하였다. 각 세포들은 증식배지에 부유시켜 세포수가 배지 1ml에 10만개씩 되도록 조절한 다음 150cm² 세포배양 플라스크에 분주하여 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다.

분변에서 바이러스 분리: 돼지 설사분변을 PBS(pH 7.4)로 5배 희석하여 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 10,000 Xg에서 1시간 초원심분리하였다. 초원심분리 하여 생긴 침전물을 PBS로 3ml되게 희석하여 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

바이러스 조직배양: 플라스크에 Vero cell의 단층이 완전히 형성되면, 증식배지액을 버리고 PBS로 두번 세척한 후 시료를 플라스크에 0.5ml씩 접종한 다음 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 작용시켰다. 그후 유지배지액을 플라스크에 5ml씩 주입하여 매일 세포변성효과(cytopathic effect; CPE)를 관찰하였다. 시료를 접종한지 7일 후에도 CPE가 형성되지 않은 것은 세포와 배양액을 채취하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 -80°C에서 3회 동결융해시키면서 blind passage하였다.

Vero cell에서 CPE가 형성된 것은 배양세포를 채취하여 -80°C에서 3번 동결융해시켜서 PK15(porcine kidney cells) 그리고 ST(McClurkin swine testicle)세포, SPK(primary swine kidney)세포, SK2(secondary swine kidney)세포에 상기한 순서대로 접종하여 CPE 형성유무를 관찰하였다.

분리바이러스의 중화시험: porcine anti-PED virus hyperimmune serum과 Vero cells에서 배양된 바이러스를 1:1로 혼합하여 37°C에서 1시간 중화시킨다음 트립신이 첨가된 Vero cell에서 배양하였다.

간접형광항체반응: 시료를 접종후 48시간 간격으로 탈락된 세포를 채집하여 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 PBS로 한번 세척하였다. 세척·침전된 세포를 PBS로 재부유 한 뒤 슬라이드 그라스위에 도말한 다음 건조하고 4°C acetone으로 5분간 고정한 후 -20°C에서 보관하면서 장절편과 같은 방법으로 염색 사용하였다.

조직배양 바이러스의 전자현미경적 관찰: 배양한 세

포를 채집하여 -80°C에서 3회 동결융해시킨다음 분변에 시와 같은 방법으로 검사하였다.

결 과

분변내 바이러스의 전자현미경적 관찰: 원심분리한 장 내용을 전자현미경으로 관찰한 결과 A-1과 A-2에서 표면돌기를 가진 90~160nm크기의 다형태성 바이러스 입자들이 다수 관찰되었다. 바이러스 캡시드와 표면돌기와의 거리는 12~15nm정도였다(Fig. 1).

간접면역형광항체법: 주로 소장의 용모상피세포의 세포질내에서만 형광항체 양성반응이 관찰되었으며, 양성반응의 정도는 공장과 회장에서 가장 뚜렷하였고, 결장 상피세포에서도 약간의 반응이 관찰되었다(Fig. 2).

바이러스분리: A-1과 A-2의 분변을 원심분리 하여 Vero cell 정상세포(Fig. 3)에 접종하였던 바 접종후 20시간째부터 CPE가 관찰되었다(Fig. 4). 감염된 세포는 정상세포에 비해 원형으로 종창되었고, 내부의 혼탁도가 점점 증가하면서 세포용해가 나타나고, 어떤 세포들은 탈락된 후 공동을 형성하였다. 80% 이상의 CPE는 접종후 30시간째에 관찰되었으며 (Fig. 5) 또한 접종후 3일내지 5일후에 합포체들이 관찰되었는데 합포체의 핵수는 5개에서 많게는 100개 이상에 이르렀으며, 이들은 형성된 지 20시간 이후에는 주위 세포로부터 수축된 후 탈락되었다.

바이러스 분리주의 다른 주화세포에서의 배양: Vero cell에서 CPE가 형성된 A-1과 A-2의 배양세포를 PK15, ST세포, SPK세포 그리고 SK2세포에 접종한 결과 CPE는 형성되지 않았으며, 이를 다시 blind passage 시켰으나 CPE는 관찰할 수 없었다.

분리바이러스의 중화시험: PED 바이러스 분리주를 porcine anti-PEDvirus hyperimmune serum으로 중화처리한 후 트립신이 첨가된 Vero cell에서 3일간 배양한 결과 어떠한 세포변성효과(CPE)가 형성되지 않아 완전한 중화가 이루어졌다(Fig. 6).

간접면역형광항체법: A농장 1과 2의 Vero cell 배양에서 탈락된 일부 단일세포와 합포체의 세포질내에서 강한 과립성의 형광항체 양성반응이 세포질내에서 확인되었다(Fig. 7).

조직배양 바이러스의 전자현미경적 관찰: Vero cell에서 CPE가 관찰된 A농장 1과 2의 배양세포에서 다형태성의 표면돌기를 가진 90~160nm 크기의 바이러스입자들이 관찰되었으나 표면돌기는 볼 수 없었다(Fig. 8).

고 찰

돼지에서 모든 연령에 걸쳐서 심한 설사를 일으키는 바이러스성 전염병으로는 TGE와 PED가 있다. PED는 돈군에 PED 바이러스에 대한 면역여부에 따라서 여러형태로 그 증상이 발현되는데 면역이 형성되지 않는 농장에서는 전연령에 걸쳐서 심한 설사와 자돈에서는 50%~90%에 달하는 폐사율이 발생하지만, 면역이 형성된 농장에서는 그렇게 심한 증상은 관찰되지 않는다.¹⁵ TGE의 발병양상도 TGE 바이러스에 대한 돈군의 면역성에 따라 크게 유행병성 TGE(epizootic TGE)와 지방병성 TGE(enzoootic TGE)로 나눌 수 있는데 전자는 돈군에 TGE 바이러스에 대한 면역이 형성되지 않는 경우에 발생하며, 특징적으로 전 연령에 걸쳐서 급성의 설사가 발생하고 포유자돈에서는 폐사율이 100%에 이른 반면에 후자는 TGE의 발병을 경험했거나 TGE 백신을 한 경우에도 발생하는 형태로서, 신생자돈은 모체이행항체로 TGE 바이러스에 대해 수동면역 되기 때문에 유행병성 TGE와는 생후 6일령 이상에서 6주령까지의 포유돈과 육성돈 혹은 육성돈과 비육돈에서 느린 전파와 낮은 폐사율을 특징으로 발생한다.^{9~11,15} 그래서 TGE 바이러스에 대해 돈군이 면역이 형성되어 있는 농장에서 전 연령에 걸쳐서 심한 설사와 자돈의 높은 폐사율이 발생한다면 PED 가능성이 높다고 할 수 있다. 본 실험에 사용될 농장의 돼지들도 분만 5주전과 2주전에 TGE 백신을 2차에 걸쳐 철저히 접종시켜 분만되었기 때문에 TGE 바이러스에 대한 돈군면역이 잘 형성되어 있다고 볼 수 있어 전 연령에 걸쳐서 설사를 하고 자돈에 심한 폐사율을 야기하는 증상은 PED일 가능성이 높다고 추정할 수 있었다.

일반적으로 장질환을 일으키는 바이러스의 배양시에는 트립신의 첨가가 필요한데 즉, rotavirus, astrovirus 그리고 소 coronavirus 배양시 트립신을 첨가하면 배양이 잘 된다. 또한 TGE 바이러스 경우도 트립신 첨가 배지에서 증식이 잘 된다고 하나 트립신을 첨가하지 않아도 배양은 된다고 한다.^{7,8} 하지만 본 실험에서 PED 바이러스를 Vero cell에서 계대배양 시키기 위해서는 반드시 트립신을 첨가하여야만 했으며, 트립신을 첨가하지 않은 Vero cell에서는 바이러스가 증식되지 않아 CPE가 형성되지 않았으므로 이는 TGE 바이러스와 감별할 수 있는 특징으로 사료되었다. 한편 첫번째 Vero cell 배양에서는 트립신을 첨가하지 않아도 증식은 잘 되었는데 이는 아직 원심분리한 시료내의 분변잔존물의 영향으로 보여진다.⁸

Vero cell에서 분리한 바이러스를 PK15등 돼지 유래 다

른 세포주에 접종한 결과 CPE는 형성되지 않았으며 이러한 세포주에 트립신을 첨가하여도 변화가 관찰되지 않았다. 이점이 PED 바이러스와 TGE 바이러스와의 중요한 감별방법으로 TGE 바이러스는 상기의 돼지 유래 세포주에서 증식이 잘되는 반면에 PED 바이러스는 이러한 세포주에서는 전혀 증식이 되지 않았다. 또한 이러한 세포주를 이용 PEDV 배양시 트립신을 첨가하여도 바이러스는 증식이 안된다고 하며 세포의 변성이 간혹 관찰되는 것은 트립신 처리에 의한 손상이지 바이러스의 증식에 의한 것은 아니라고 한다.^{7,8} 본 실험에서도 트립신을 첨가한 경우 세포손상이 보였으나 이를 간접면역형광항체법으로 실험한 결과 양성반응은 관찰되지 않았다.

PED 바이러스에 대한 CPE의 형성은 접종후 20시간째에 관찰되어 다른 보고⁷⁾ 보다는 빠른 경향이 있었다. 합포체는 접종후 1일내지 2일후에 관찰되었으며 핵의 수는 5개에서 많게는 100개에 이르기까지 많았고, 합포체가 형성된 후 48시간이 경과되면 주위세포로부터 수축된 후 탈락되는 등 다른 보고와 유사하였다.^{7,8}

간접면역형광항체법으로 소장 및 결장의 상피세포 그리고 CPE가 형성되어 탈락된 세포를 검사한 결과 형광항체 양성반응이 세포질내에서 미세한 과립성으로 관찰되어 다른 보고와 유사하였다.^{2~4,12,14,21}

원심분리한 분변시료를 전자현미경으로 관찰한 결과 표면돌기를 가진 90~160nm 크기의 전형적인 coronavirus 입자들이 보였고,^{1,5,15,16,18} CV777 PED 바이러스와 국내 분리주도 바이러스 입자 크기가 비슷하였으나 다만 표면돌기를 전자현미경으로 관찰하기가 힘들었다. 이러한 결과는 검사재료의 차이는 물론 재료의 채취와 처리과정의 차이에서 왔지 않나 추정된다.

결 론

전 돈군에 걸쳐 심한 설사를 보이는 돼지의 분변 및 장을 이용하여 PEDV에 대한 분리 동정시험과 함께 간접면역형광항체법과 전자현미경적 관찰을 하였던 바 그 성적을 요약하면 다음과 같다.

1. 돼지의 설사 분변을 전자현미경으로 관찰한 결과 다형태성의 표면돌기를 가진 90~160nm 크기의 PED 바이러스가 다수 관찰되었다.

2. 장을 냉동절편하여 간접면역형광항체 염색을 수행했던 바 소장 용모상피세포의 세포질내에서 양성의 반응을 관찰하였고, 음와의 상피세포에도 약간의 양성반응을 볼 수 있었으며, 부위별로는 공장과 회장에서 반응이 가

장 강하였고, 결장에서도 약한 양성반응을 볼 수 있었다.

3. 설사분변 상층액을 트립신이 첨가된 Vero cell에서 배양한 결과 CPE가 형성되었다. 그러나 Vero cell에서 트립신을 첨가하지 않고 배양한 결과 1대 계대배양에서는 약간의 CPE가 형성되었으나, 2대 계대배양에서 부터는 CPE가 형성되지 않았다. 따라서 Vero cell에서 PED 바이러스를 증식시키기 위해서는 트립신첨가가 필요하다.

4. Vero cell에서 CPE가 형성된 세포와 배양액을 PK15, ST, SPK 그리고 SK2 세포에 접종한 결과 CPE가

형성되지 않았다. 또한 바이러스 중화시험 결과 어떠한 세포변성 효과도 관찰되지 않았다.

5. Vero cell에서 CPE가 형성된 PEDV 감염 세포중 탈락된 단일세포와 합포체에서 PED 바이러스에 대한 강한 과립성의 세포질내 양성반응이 관찰되었고 이들 증식 세포들을 수확하여 전자현미경으로 관찰한 결과 분변에서 보이는 것과 같은 다형태성의 90~160nm 크기의 바이러스 입자들이 관찰되었으나 표면돌기는 보기가 어려웠다.

Legends for Figures

Fig. 1. Electron micrograph of a PEDV particle showing typical coronavirus morphology. Arrow points to the virus projection. Bar =100 nm

Fig. 2. Jejunum. Marked positive reaction which was limited in the lining epithelium. Immunofluorescence stain $\times 100$

Fig. 3. Uninfected control of Vero cells. $\times 100$

Fig. 4. CPE in Vero cells infected with PEDV field isolate, at 20 hours after inoculation. $\times 100$

Fig. 5. CPE in Vero cells infected with PEDV field isolate, at 30 hours after inoculation. $\times 100$

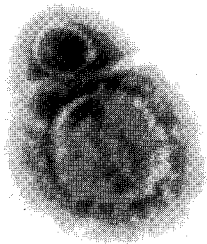
Fig. 6. Serum neutralization test pattern of PEDV field isolate. $\times 100$

Fig. 7. Immunofluorescence pattern of PEDV field isolate infected Vero cells, after 30 hours inoculation. $\times 100$

Fig. 8. Electron micrograph of a cultured PEDV. Bar =100nm

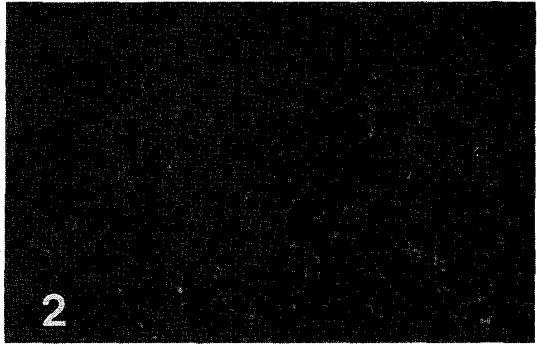
참고문헌

1. Chasey D. and Cartwright SF.: Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. Res Vet Sci. 1978 ; 25 : 255~256.
2. Debouck P. and Pensaert M. : Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus CV 777. Am J Vet Res 1980 ; 41 : 219~223.
3. Debouck P, Pensaert M. and Coussement W: The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777. Vet Microbiol 1981 ; 53 : 157~165.
4. Debouck P, Calle aut P. and Pensaert M : The diagnosis of coronavirus-like agent(CVLA)diarrhea in sucking pigs. Curr Top Ver Med Anim Sci 1981 ; 13 : 59~61.
5. Ducatelle R, Coussement W, Debouck P. and Hoorens J.: Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets. II. Electron microscopis study. Vet Pathol 1982 ; 19 : 57~66.
6. Hiroyoshi K, Tetsuo N, Togo S, et al : Passage in piglets of a coronavirus associated with porcine epidemic diarrhea. J Clin Vet Med 1988 ; 41 : 169~173.
7. Hofmann M, Wyler R : Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. J Clin Microbio 1988 ; 26 ; 2235~2239.
8. Hofmann M. and Wyler R : Quantitation, biological and phsicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus(PDEV). Vet Microbio 1989 ; 20 ; 131~142.
9. Hooper BE. and Haelterman EO. : Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. JAVMA 1966 ; 149 : 1580~1586.

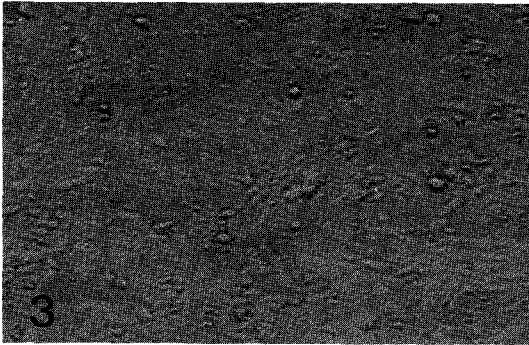


1

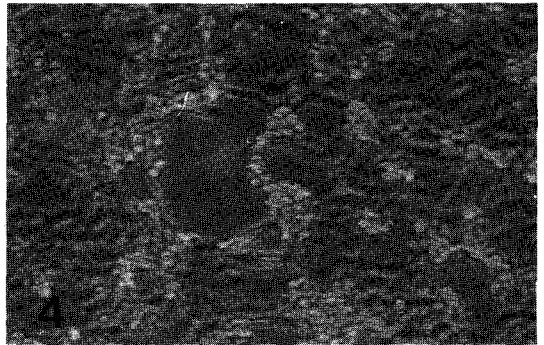
100nm



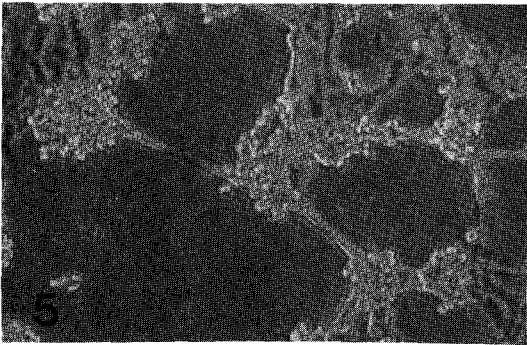
2



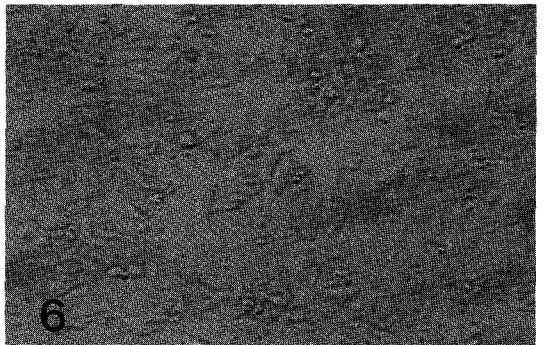
3



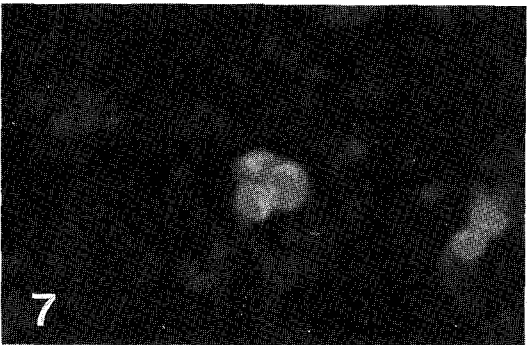
4



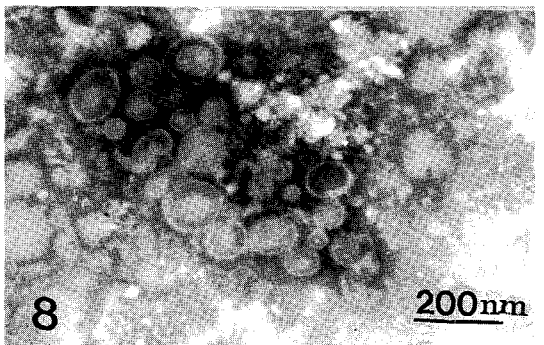
5



6



7



8

200nm

10. Hooper BE. and Haelterman EO : Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *JAVMA* 1969 ; 33 29~36.
11. Nakane P K. and Pierce B G Jr. : Enzyme-labeled antibodies : Preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem* 1966 ; 14 : 929.
12. Okinawa A. and Maeda M : Histopathology of transmissible gastroenteritis in experimentally infected new born piglets. II. Lesions in organs other than digestive tract and pathologic features of TGE. *Nat Inst Anim Health Q* 1966 ; 6 : 64~72.
13. Oldham J. : Pig farming (suppl). 1972 ; 72~73.
14. Pensaet M, Haelterman E O. and Burnstein T. : Transmissible gastroenteritis of swine : virus-intestinal cell interactions. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of the infection. *Arch Ges Virusforsch* 1970 a ; 31 : 321~334.
15. Pensaert MB : Porcine Epidemic Diarrhea. *Disease of Swine* 7th Edition. 1992 ; pp 293~298.
16. Pensaert MB. and Debouck P : A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 1978 ; 28 : 243~247.
17. Pensaert M, Callebaut P. and Debouck P : Porcine epidemic diarrhea (PED) caused by a coronavirus : Present knowledge, *Proc 7th Int Congr Pig Vet Soc, Mexico City* 1982 ; p. 52.
18. Pospischil A, Hess R G. and Bachmann P A. : Light microscope and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with enzootic diarrhoea virus(EVD) : Comparison with transmissible gastroenteritis(TGE)virus and Porcine rotavirus infection. *Zentrabl Veter Inaermed* 1981 ; 28 : 564~577.
19. Witte KH, Prager D. : Detection of antibodies against epizootic diarrhea virus of swine by means of the immunofluorescence blockade test (IFBT). Comparison with indirect immunofluorescence. *Vet Bull(suppl)* 1988 ; 42 : 169.
20. Wood EN. : An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. *Vet Rec* 1977 ; 100 : 243~244.
21. Zepezauer V, Helbing H, Nitzschke B. and Friedrich D : Experiences in field testing of the direct immunofluorescence test for detecting transmissible gastroenteritis virus and epizootic diarrhoea and rotavirus antigen in conventional and intensive pig production units. *Archivfur eper imentelle Veter inarmedizin* 1987 ; 41(6) : 880~884.

Isolation and Identification of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

Nam-yong Park, Kyoung-oh Cho, Seoung-su Cho* and Yong-kong Ha*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University
Choong Ang Animal Disease Laboratory*

Abstract : Attempts to isolate porcine epidemic diarrhea virus(PEDV) were made by inoculating feces homogenates into Vero cells cultures with trypsin. Cytopathic effects(CPE), such as vacuolation, formation of syncytia, and fusion of cells, were detected even at first inoculation in Vero cells. Once adapted, the virrs formed numerous syncytia containing from 5 to over 100 nuclei. CPE by serum neutralization test was also examined in Vero cells and other porcine cell lines. PEDV in feces and cell culture had typical coronavirus morphology, 90~160 nm viral particles in diameter with 12~15nm intervals between projection and capsid. Propagation of PEDV isolated in Vero cells was unsuccessful in several primary and secondary fetal porcine cell cultures irrespectve of trypsin addition for differentiation with TGEV. By indirect immunofluorescence technique, the cytoplasm of enterocytes was appeared strongly positive reaction against PEDV in the jejunum and ileum but slight response in the colon.