

<국내대학원 석사야간과정 훈련과제 연구보고서>

국내 Porcine circovirus type 3 infection 분포의 계절적 변화

2020. 7.

농 립 축 산 식 품 부

농림축산검역본부

김 수 원

목 차

I . Introduction

1. 연구의 목적 및 필요성
2. 연구 내용

II . Materials and methods

1. Viruses and samples
2. PCR
3. Multiplex real-time PCR for pcv2 and pcv3
4. H&E stain
5. ISH(in situ hybridization)
6. IHC(immunohistochemistry)

III . Results

1. Electrophoresis of PCV3
2. Mutiplex quantitative real-time PCR
3. Porcine circovirus type 3 항원 양성률
4. Porcine circovirus type 3 계절적 분포
5. PCV3 양성 조직의 병리학적 소견
6. ISH 분석
7. IHC 분석

IV. Discussion

1. Porcine circovirus type 3 항원 양성률

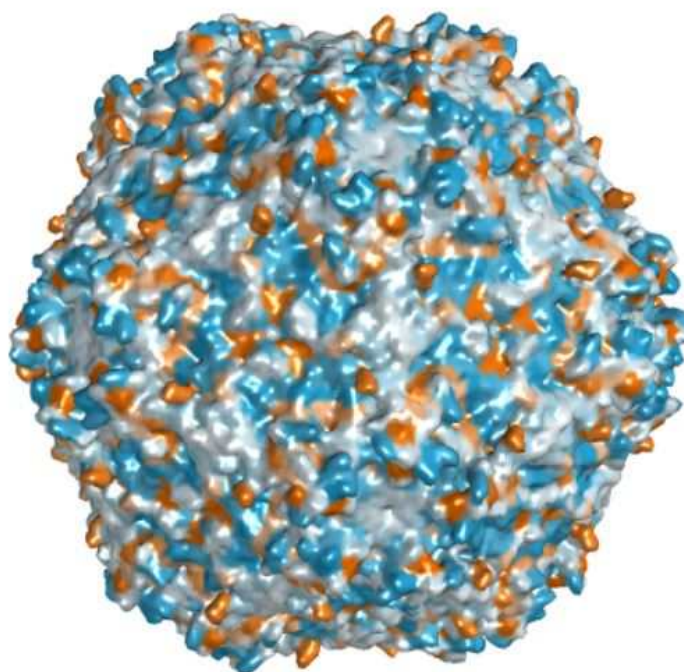
2. PCV3 & PCV2 infection rate by month
3. Pathological lesion
4. ISH(in situ hybridization)
5. IHC(immunohistochemistry)

REFERENCES(참고문헌)

Appendix

I . Introduction

1. 연구의 목적 및 필요성



< structure of porcine circovirus >

Porcine circovirus(PCV)는 small, non-enveloped, single-strand circular DNA로써, family Circoviridae, genus Circovirus에 속하는 virus이다.

Porcine circovirus type 3(PCV3)는 2016년 미국의 돼지 농장에서 최초로 보고되었으며, 이후 브라질, 중국, 폴란드 그리고 국내에서도 PCV3가 확인된 바 있다. PCV3는 ssDNA로써 최근 미국,

중국 등에서 DNA sequence가 보고되었으며, Porcine circovirus type1이나 type2와는 유전적인 관련성이 적은 새로운 유형의 바이러스로 알려져 있다.

국내에서 PCV3는 porcine dermatitis and nephropathy syndrome(PDNS), reproductive failure, multi-systemic inflammation 등의 임상증상을 가진 개체에서 확인되었으며, PCV3의 유전적인 특성은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 그러나, 국내에서 확인된 PCV3가 US strains과 Nucleotide sequence가 90% 이상 일치하는 등 국내 돼지농장에서 만연되어 있을 가능성이 높은 것으로 보인다.

PCV3와 같은 genus Circovirus에 속하는 porcine circovirus type 1은 돼지에 큰 병원성이 없으며, porcine circovirus type 2는 porcine circovirus associated disease(PCVAD)의 주요 병인체로써, post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), reproductive disorders, enteritis, proliferative and necrotizing pneumonia, PRRS를 유발함으로써 양돈 산업에 경제적으로 큰 피해를 주고 있으며 최근에는 백신이 개발되어 PCV2에 의한 피해를 줄이는 데 도움이 되고 있다.

지금까지 연구결과를 토대로 PCV3는 다른 바이러스성 또는 세균성 질환과 복합적으로 감염되어 있는 것으로 보이며, 임상증상을 보이는 개체뿐만 아니라 임상증상이 없는 정상적인 개체에서도 일부 발견되고 있다. 따라서, 계절에 따른 PCV3의 infection 분포

변화를 연구하는 것은 국내에서 Porcine circovirus type 3에 의한 질병을 선제적으로 예방하는데 있어서 필요한 연구라고 사료된다.

2. 연구 내용

이 연구의 목적은 임상증상이 없는 건강한 돼지에서 PCV3 infection 양상을 연구하고자 함으로써, 농장에서 정상적으로 출하 및 도축되는 돼지에서 폐, 림프절(hilar lymph node)을 sampling하기로 하였으며, 전라북도 내 임의의 돼지농장을 대상으로 하였다.

시료채취는 봄(3~5월), 여름(6~8월), 가을(9~11월), 겨울(12~2월)의 4가지 계절로 구분하며, 매 계절별 3회 이상(1회/월) 전북 도내 도축장의 해체검사시 randomly sampling하였다.

(표 1)

구분	Number of samples			비고
	1st	2nd	3rd	
봄(3~5월)				
여름(6~8월)				
가을(9~11월)				
겨울(12~2월)				

< 건강한(non-clinical) 돼지에서 sample한 시료(계절별 분류) >

sampling 후 시료는 실험실 내에서 10개씩 pooling 하여 PCR & multiplex real-time PCR을 이용하여 Porcine circovirus type 3에 감염된 개체수 및 비율을 수치화하며, 추가적으로 계절에

다른 증감의 분포 변화를 그래프화하였다.

또한, PCV3 양성 샘플 H&E 염색을 함으로써, 병리학적 소견을 현미경으로 확인하고자 하였으며, in situ hybridization(ISH)와 immunohistochemistry(IHC) 염색법을 통해 조직 내 병리학적 소견과 virus와의 연관성을 재확인하고자 하였다.

II. Materials and methods

1. Virus and samples

가. 전라북도 내 농장에서 사육된 후 도축장(Nonghyup mokuchon in kimje-city)으로 출하 및 도축된 건강한 비육돈(약 110kg)의 해체 검사시 Lung과 hilar lymph node에서 샘플을 채취하였다.

1) 매월 4개 농장, 1개 농장당 20두씩 샘플 채취하였으며, 자세한 사항은 아래와 같다.

: 4 farms/month, 1920 tissue sampling

Total 48farms, 960 lung & 960 LN

2) 샘플링 부위 : 개체별 lung, hilar lymph node

나. 모든 시료는 채취 당일 일부는 PCR검사를 위해 냉동보관하였고, 나머지 시료는 포르말린으로 고정하여 보관하였다.

다. Nucleic acid extraction(DNA 추출)

1) 냉동보관한 시료는 10개 샘플을 1개로 pooling하여 homogenize 후 DNA를 추출하였으며, 이 과정은 protocol for animal tissue(by GeneAll Exgene Tissue SV)을 준수하였다.

2) extraction이 완료된 시료는 e-spect machine을 통해 DNA 농도를 확인하였다.



PROTOCOL FOR ANIMAL TISSUE

Before experiment

- Prepare the water bath to 56°C.
- Equilibrate buffer AE to room temperature.
- All centrifugation should be performed at room temperature.
- Buffer TB may precipitate at cold ambient temperature.
- If so, completely dissolve it in 37°C water bath.

I. Disrupt 20 mg of tissue as described on step Ia, Ib or Ic, depending on the sample type.

To disrupt the sample finer will accelerate lysis and reduce the lysis time.

For spleen tissue, up to 10 mg can be processed.

If the starting sample is larger than 25 mg (if spleen, 10 mg), increase the volume of buffer TL proportionally. For 50 mg of liver tissue, 400 ul of buffer TL is required.

For over 50 mg of tissue, Exgene™ Tissue SV Midi or MAXI is recommended.

Ia. For soft tissue, such as liver or brain, put 20 mg of the tissue into 1.5 ml tube, add 200 ul of Buffer TL, and homogenize thoroughly with microhomogenizer.

Ib. If microhomogenizer is not available or the tissue is not soft, grind the tissue to a fine powder with liquid nitrogen in a pre-chilled mortar and pestle. Put 20 mg of the powdered tissue into 1.5 ml tube. Add 200 ul of Buffer TL and pulse-vortex for 15 seconds.

Ic. If neither Ia nor Ib is available, mince 20 mg of tissue with sharp blade or scalpel as small as possible. Put the tissue into a 1.5 ml tube. Add 200 ul of Buffer TL and pulse-vortex for 15 seconds.

***** Alternatively, tissue samples can be effectively disrupted using some instruments, such as a rotor-stator homogenizer or a bead-beater.**

2. Add 20 ul of Proteinase K solution. Mix completely by vortexing or pipetting. Incubate at 56°C until the sample is completely lysed.

It is essential to mix the components completely for proper lysis.

If the sample amount is larger than 25 mg (if spleen, 10 mg), increase the amount of Proteinase K proportionally. For 50 mg of liver tissue, 40 ul of Proteinase K solution is required.

Lysis time varies from 10 min to 3 hr usually depending on the type of tissue processed and the disruption method (step1). The lysate should become translucent without any particles after complete lysis. Overnight lysis does not influence the preparation. If the sample tube is incubated in water bath or heating block, vortex occasionally (2-3 times per hour) during incubation to lyse readily. *Lysis in shaking water bath, shaking incubator or agitator would be best for efficient lysis.*

3. Check!! If Buffer TB precipitates, pre-heat in a 37°C water bath to dissolve completely.

Precipitated buffer will cause significant decrease in recover yield.

4. Spin down the tube briefly to remove any drops from inside of the lid.

5. Optional: If RNA-free DNA is required, add 4 ul of RNase solution (100 mg/ml, Cat.No.117-960), vortex to mix thoroughly, and incubate for 2 min at room temperature.

GeneAll® Exgene™ Tissue SV column has stronger affinity to DNA than RNA. Although the treatment of RNase is omitted, RNA occupies very small portion of eluates. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR.

6. Add 400 ul of Buffer TB. Immediately vortex the tube to mix thoroughly. Spin down the tube briefly to remove any drops from inside of the lid.

If the sample is larger than 25 mg (if spleen, 10 mg), increase the volume of buffer TB proportionally. For 50 mg of liver tissue, 800 ul of buffer TB is required.

7. Apply the mixture to the SV column. Centrifuge for 1 min at 6,000 xg above (>8,000 rpm). Replace the collection tube with new one (provided).

If more than 25 mg (10 mg spleen) of tissue is processed, apply the mixture twice; apply 700 ul of the mixture, spin down, discard the filtrate, re-insert to the empty collection tube, and repeat the step again until all of the mixture is applied to the SV column. If the mixture has not passed completely through the membrane, centrifuge again at full speed until all of the solution has been passed through.

Centrifuge at maximum speed will not affect the DNA recovery.

8. Add 600 ul of Buffer BW. Centrifuge for 30 sec at 6,000 xg above (>8,000 rpm). Replace the collection tube with new one (provided).

9. Apply 700 ul of Buffer TW. Centrifuge for 30 sec at 6,000 xg above (>8,000 rpm). Discard the filtrate and reinsert the SV column back into the collection tube.

10. Centrifuge at full speed (above 13,000 xg) for 1 min to remove residual wash buffer. Place the SV column in a fresh 1.5 ml tube (not provided).

Care must be taken at this step for eliminating the carryover of buffer TW. If carryover of buffer TW occurs on column membrane, centrifuge again for 1 min at full speed before transferring to the new 1.5 ml tube.

2. PCR(polymerase chain reaction) & Electrophoresis

가. 10두씩 pooling 하여 PCR 검사를 실시하였다.

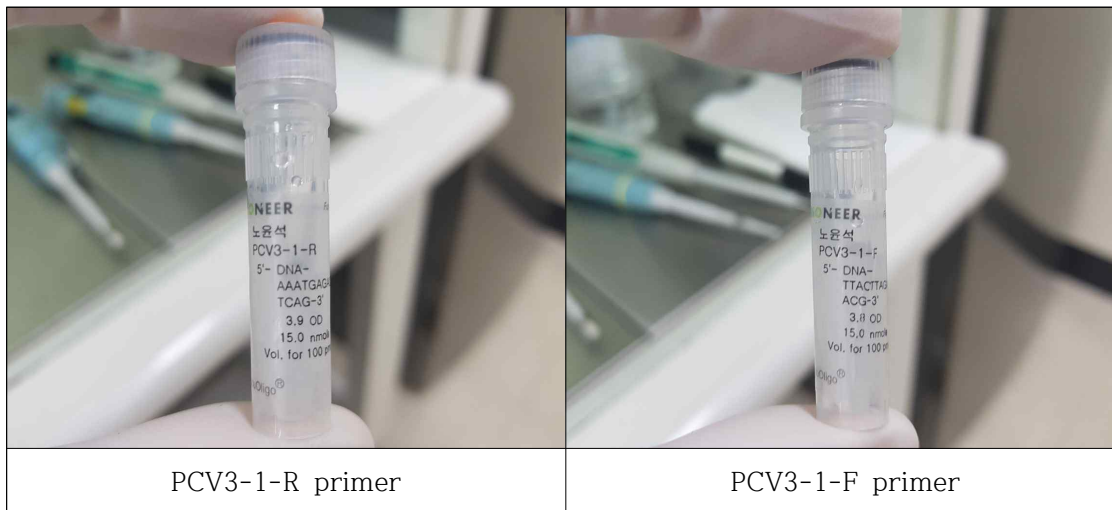
: Total 192 samples, 96 lung & 96 hilar LN

나. Preparation of a set of primer for PCV3 detection

TABLE 1 List of primers used in this study

Primer name	Nucleotide sequence	Primer location (nt) ^a	Product length (bp)	Purpose
PCV3-1-F	T T A C T T A G A G A A C G G A C T T G T A A C G	1339-1363	649	Detection
PCV3-1-R	A A A T G A G A C A C A G A G C T A T A T T C A G	1987-1965		

* Reference : Ku et al., 2016



다. Master Mix PCR well 이용

: 각 well당 18 μ g(DDW14 μ g+F-primer1 μ g+R-primer1 μ g+샘플2 μ g)

라. PCR setting

1x	35x	1x	infinite
94°C, 5min	94°C, 30sec 62°C, 30sec 72°C, 1min	72°C, 10min	4°C

마. PCR로 증폭이 완료된 template는 20개 단위로 Electrophoresis를 진행하였다. agar gel 농도는 1.5%, 용매는 TAE buffer(1X)를 이용하였으며, 30분간 gel loading 후 Image Quant LAS 500으로 band를 확인하였다. PCV3의 경우 649bp에서 band 확인이 가능하였고 100bp DNA Ladder를 이용하였다.

바. PCV2 및 PCV3-positive sample은 야외 감염된 돼지로부터 분리주를 사용하였다.(CBNU 질병진단센터)

3. Multiplex real-time PCR for pcv2 and pcv3

가. 본 실험에서는 일반 PCR 기법과 병행하여 농림축산검역본부에서 연구과제로 개발중이며, PCV2와 PCV3를 한번에 확인 가능한 multiplex real-time PCR method를 활용하여 porcine circovirus 2,3를 확인하고자 하였다.

나. PCV2 및 PCV3를 동시 검출하는 이 진단법은 DNA와 결합력이 높은 PNA(Peptide Nucleic Acids) probe를 이용하여 특정한 용해온도(Melting temperature)를 분석함으로써 특이도를 향상시킬 수 있는 진단법으로 개발중이다.



PCV detection kit for mqPCR

4. H&E stain

PCV3가 검출된 조직에 대한 병리학적 소견을 확인하고자, 포르말린으로 고정된 조직(Lung, hilar LN)을 H&E stain하였다.

H&E stain이란 hematoxylin과 eosin이라는 두 염색물질을 이용하는 염색법으로써, 헤마톡실린은 어두운 파랑 혹은 보라색으로 염색되는 염기성/양이온성 물질로 호염기성 물질(산성/음이온성)에 결합한다. 주로, 핵에 있는 DNA/RNA, 조면소포체의 리보솜에 있는 RNA에 결합하여 보라색을 띤다.

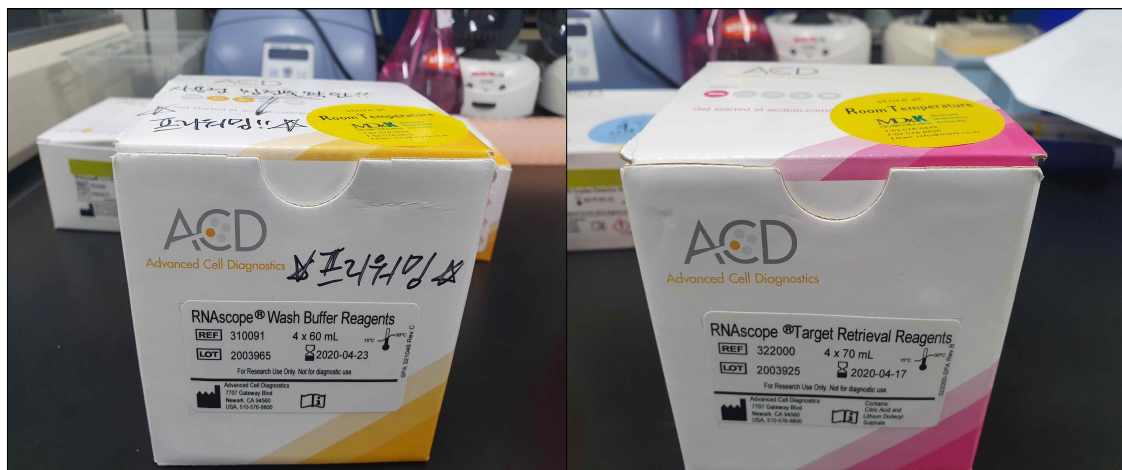
에오신은 빨강 혹은 분홍색으로 염색되는 산성/음이온성 물질로, 호산성 물질(염기성/양이온성)에 결합한다. 세포질에 있는 단백질, 근육세포와 세포 내부의 막에 있는 미세섬유와 세포외 섬유도 에오

신에 염색된다. 본 실험에서는 자동염색기를 사용하여 염색하였다.

5. ISH(in situ hybridization)

PCV3 항원이 검출된 조직의 병리학적 소견을 현미경으로 확인 후, 이 병변이 porcine circovirus type 3에 의한 것인지 검증하기 위하여 in situ hybridization(ISH) 염색법을 수행하였다.

in situ hybridization은 유전자의 조직, 조절 및 기능을 이해하는 데 중요한 단계로써, 염색체 또는 조직에서 probe를 사용하여 특정 Nucleic acid의 위치를 확인하는데 사용됩니다. 이 실험에서는 ACD(Advanced cell diagnostics)사에서 제조한 RNAscope® 2.5 HD Duplex Detection Kit(Chromogenic) User Manual을 준수하여 실험을 진행하였다.



RNAscope(ISH) 염색용 시약



RNAscope probe

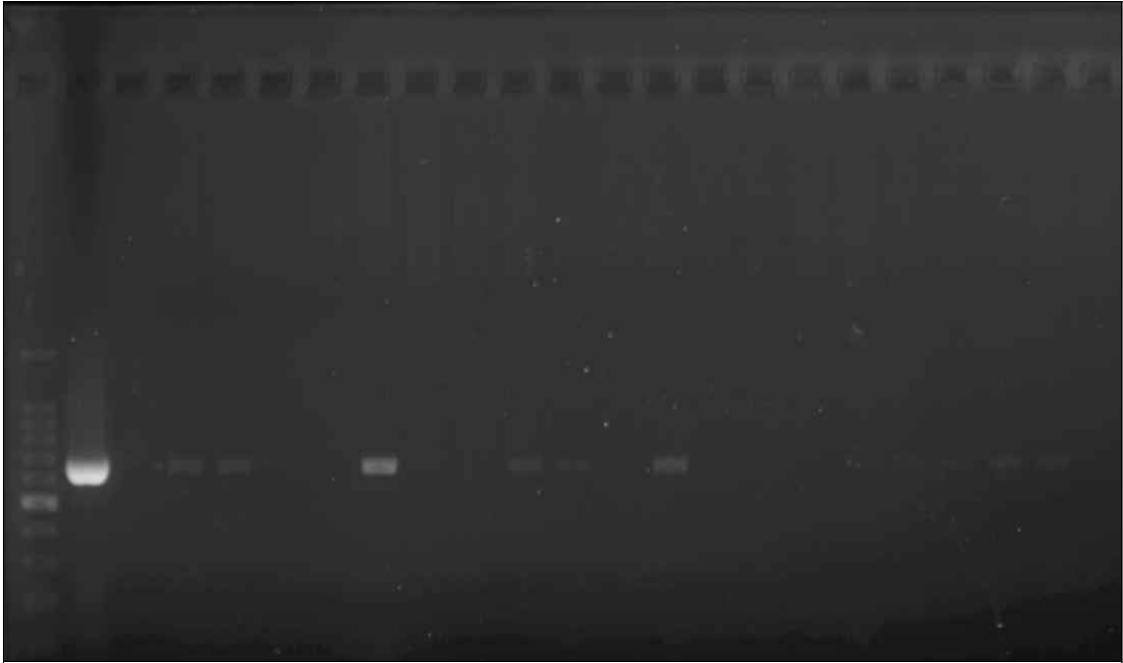
6. IHC(immunohistochemistry)

H&E stain과 in situ hybridization을 통해 확인한 병리학적 병변이 porcine circovirus type 2에 의한 것인지 확인하고자 PCV2 항체를 이용하여 IHC를 진행하였다.

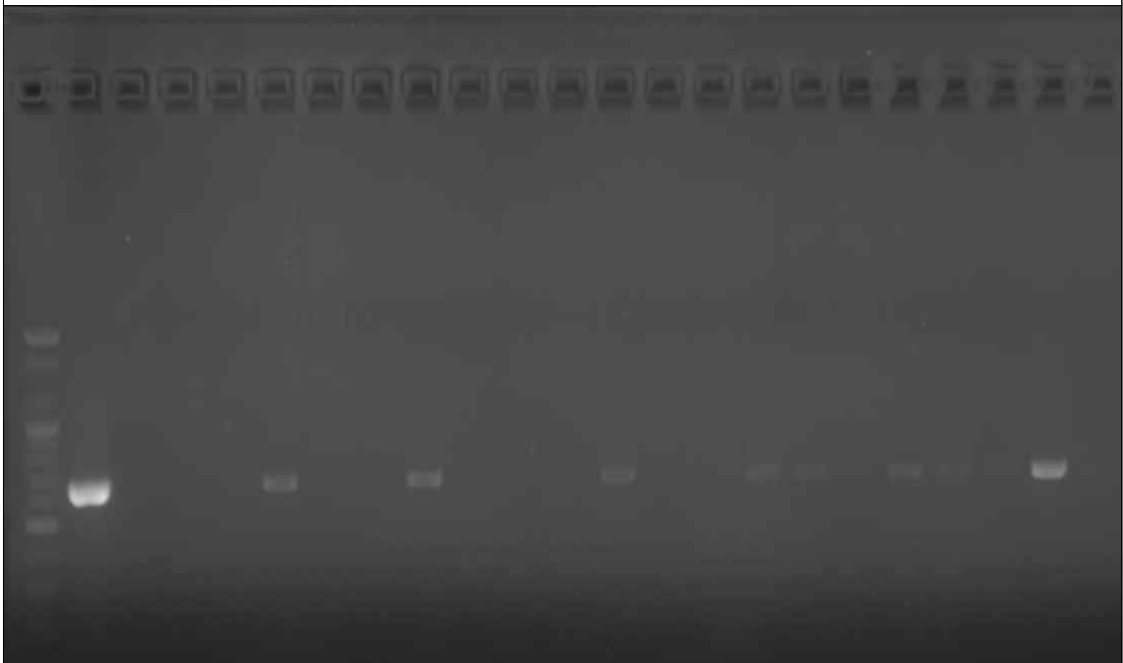
IHC는 면역염색의 가장 일반적인 방법으로써, 조직내에서 항원에 결합하는 항체의 원리를 이용하여 특정 항원(단백질)을 선택적으로 식별하는 염색방법이다. 본 실험에서는 pcv2 항원을 식별하고자 pcv2 항체를 이용하였고, 항체와 결합하는 2차 항체로써 DAB(diaminobenzidine), counterstain으로 methyl green을 이용하였다.

III. Results

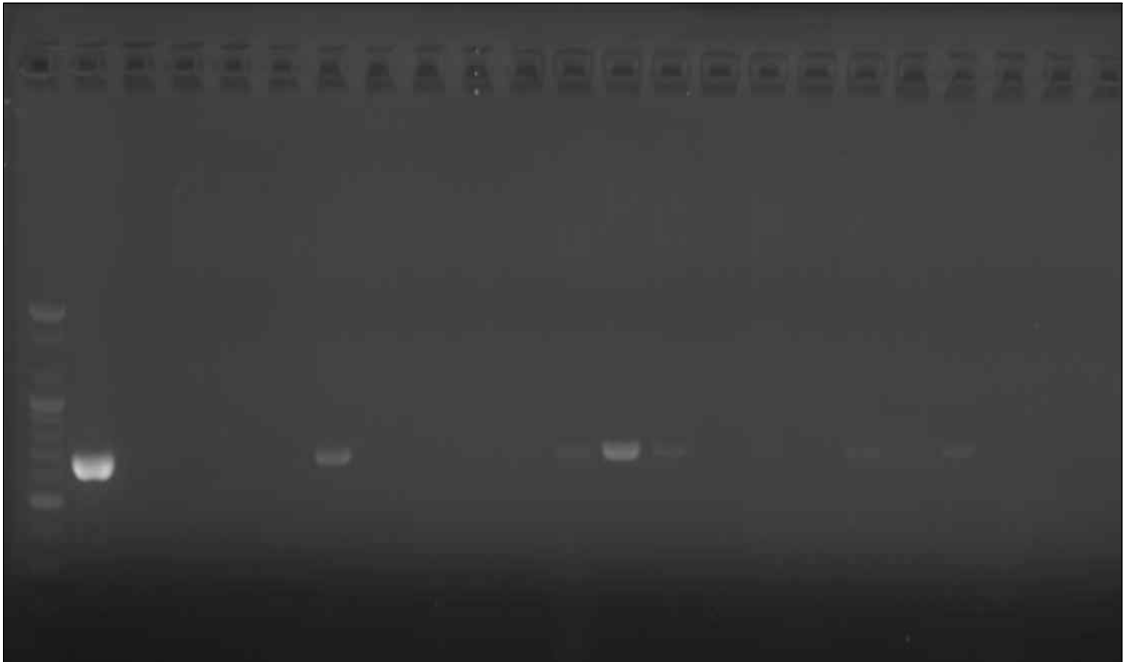
1. Electrophoresis of PCV3



Sample no. 1 ~ 20



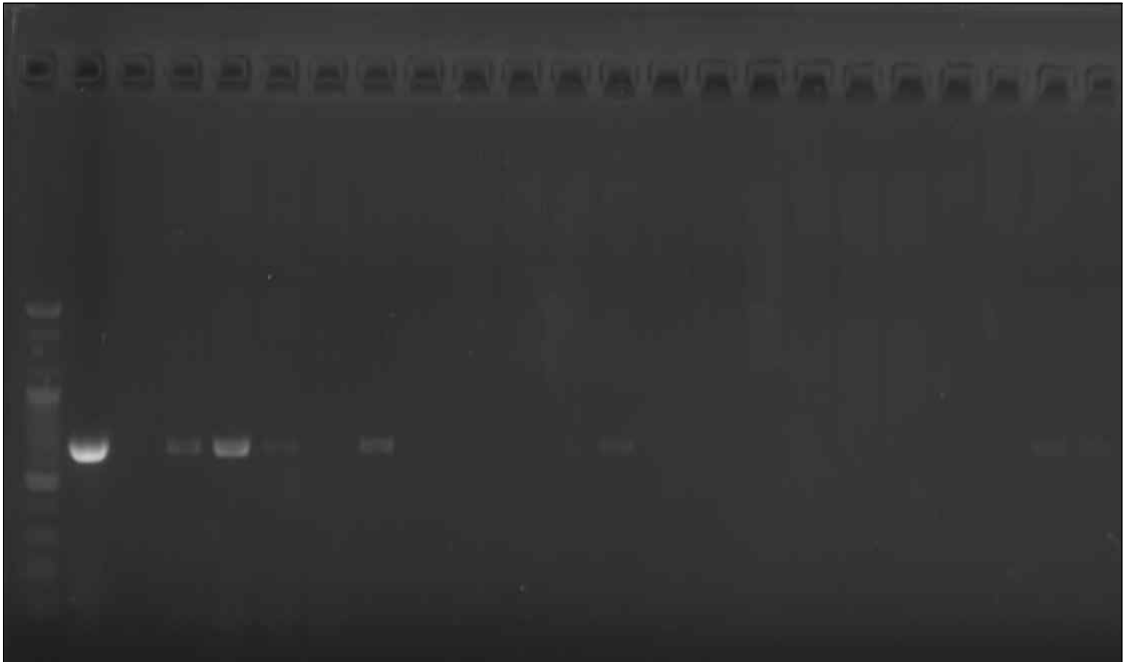
Sample no. 21 ~ 40



Sample no. 41 ~ 60



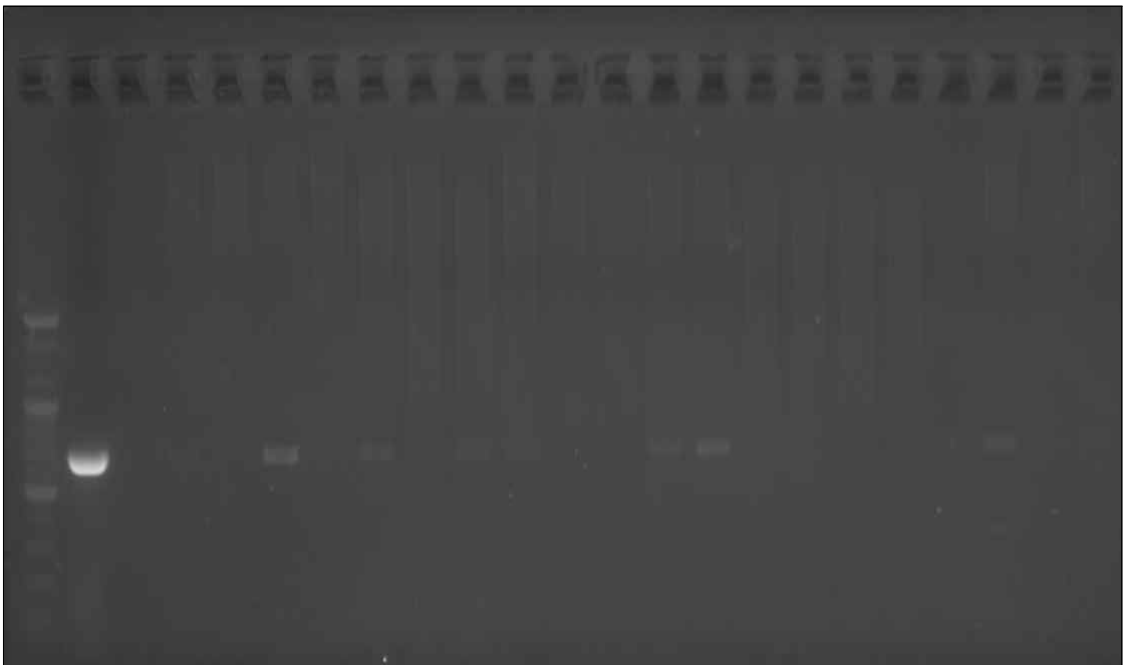
Sample no. 61 ~ 80



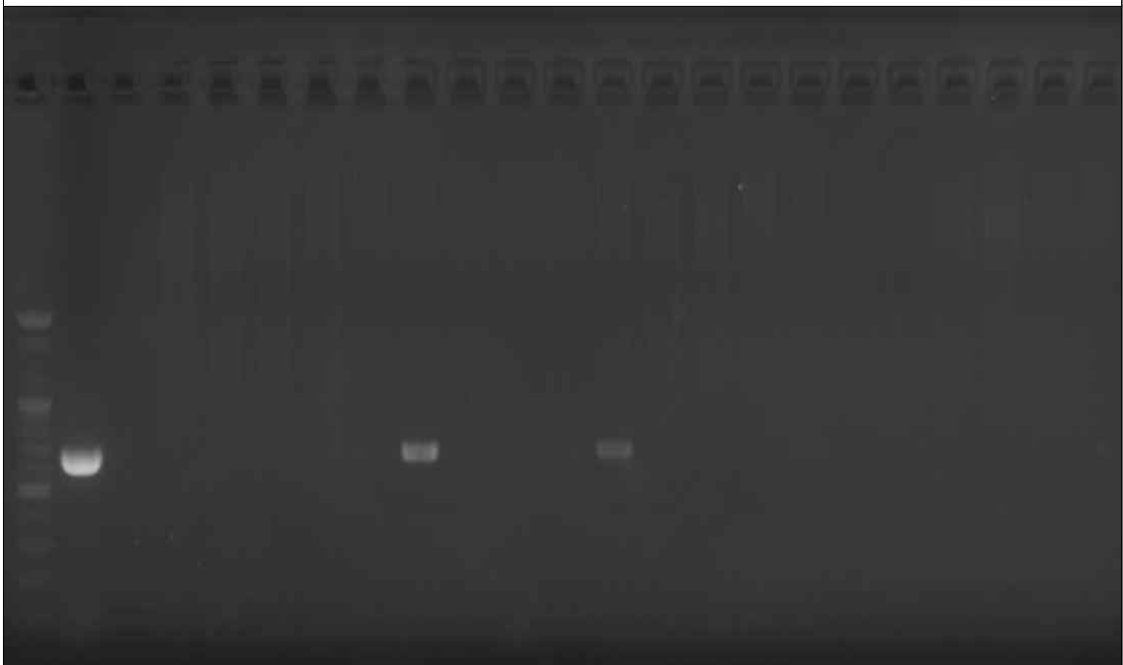
Sample no. 81 ~ 100



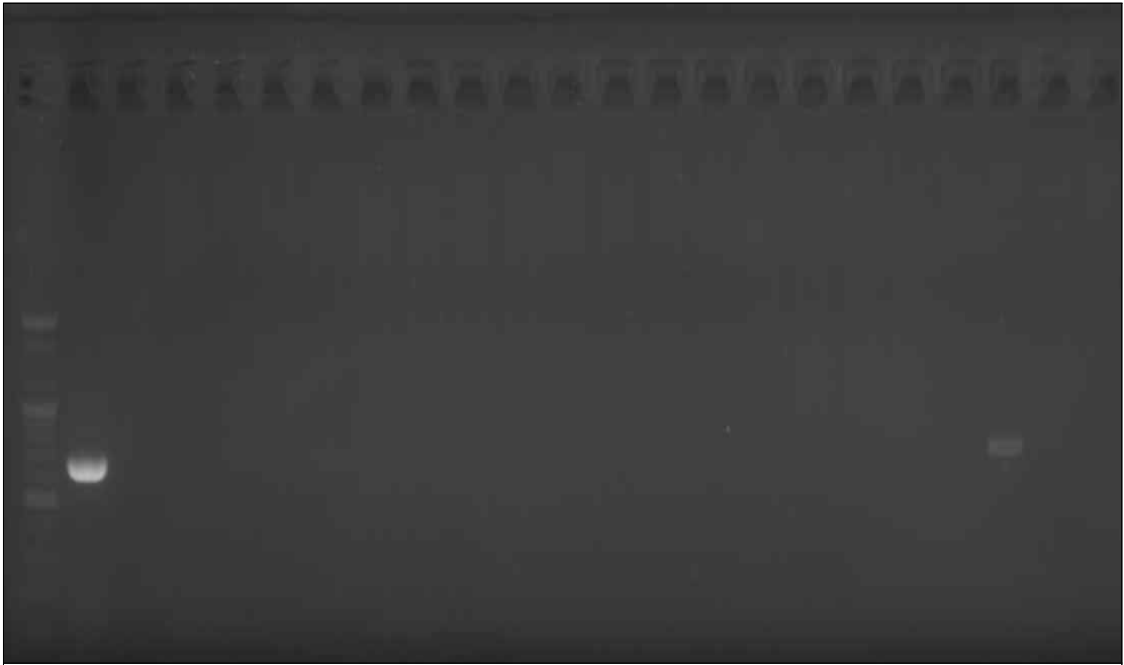
Sample no. 101 ~ 120



Sample no. 121 ~ 140



Sample no. 141 ~ 160

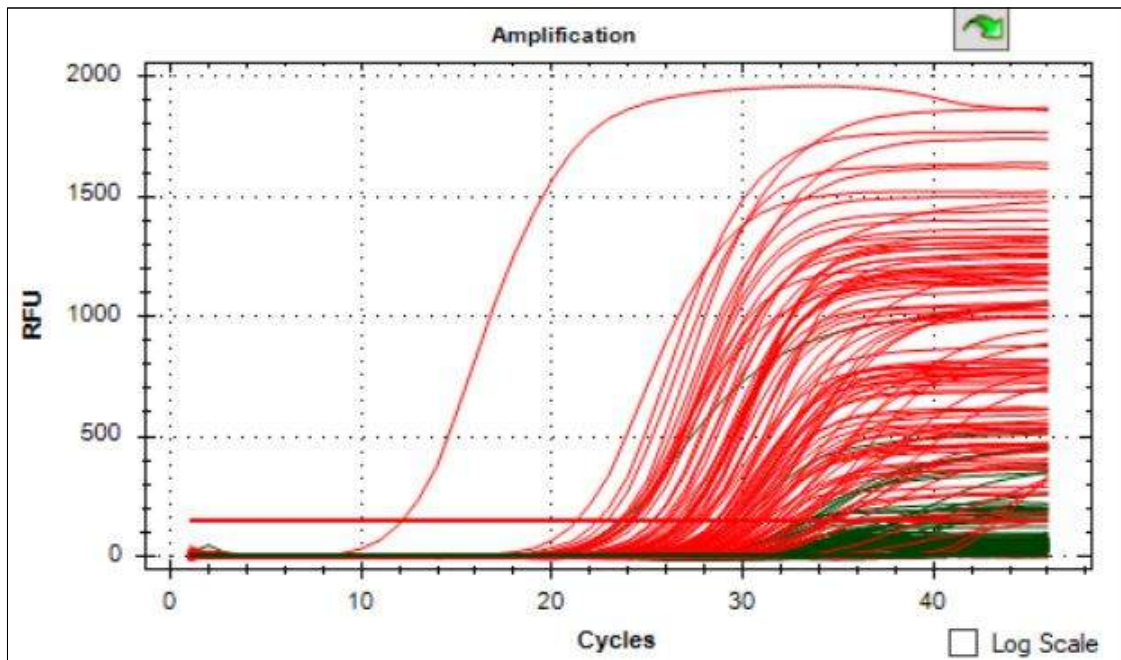


Sample no. 161 ~ 180

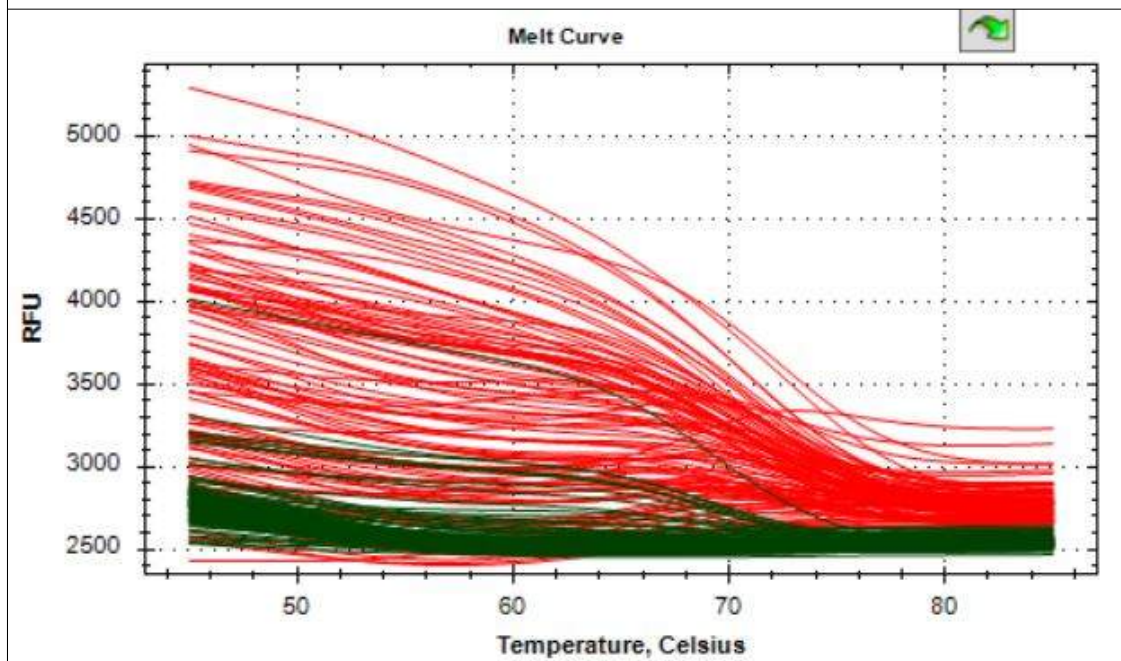


Sample no. 181 ~ 192

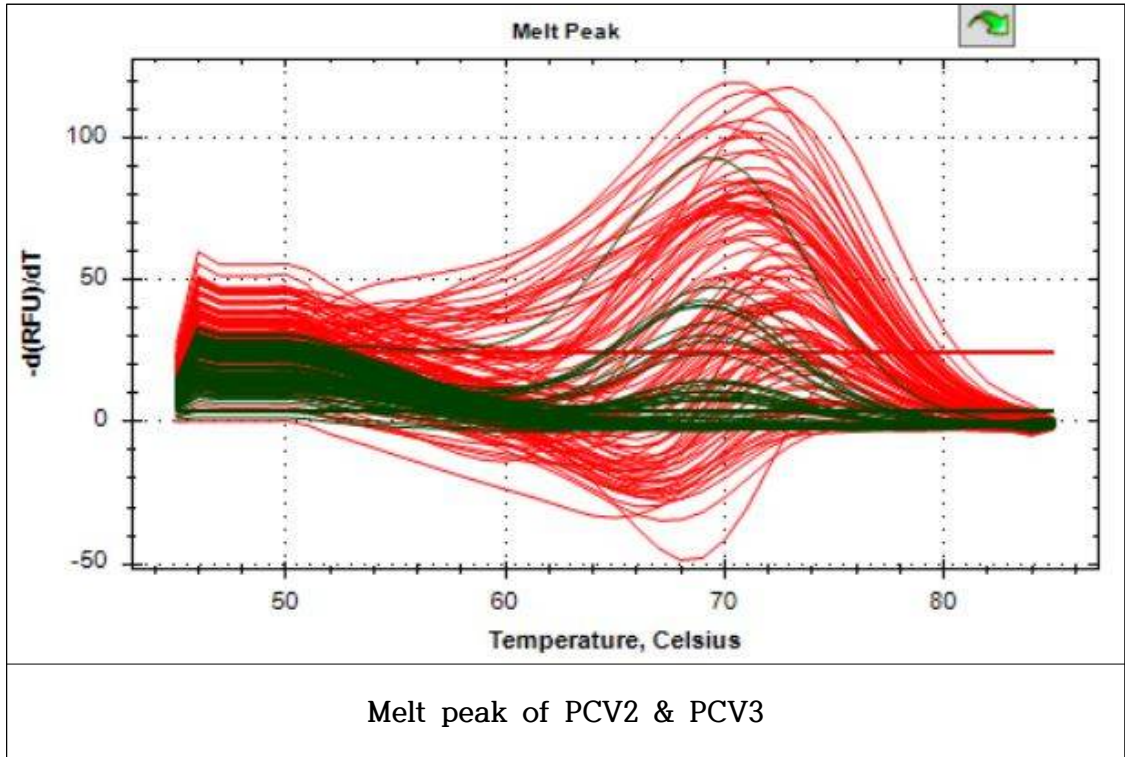
2. Mutiplex quantitative real-time PCR



Amplification of PCV2 & PCV3



Melt curve of PCV2 & PCV3



3. Porcine circovirus type 3 항원 양성률

가. 농장단위 PCV3 양성률은 68.8%(33/48)이고, 샘플당 PCV3와 PCV2 양성률은 각각 32.8%(63/192)와 83.9%(161/192)로 확인되었다. PCV3와 PCV2 복합감염률은 31.8%(61/192)이었다. 또한, PCV3 단독감염률은 1%(2/192)밖에 되지 않았다.

PCV3	계	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
양성 농장수	33	3	3	2	1	0	3	4	3	4	3	4	3
양성률	0.688	0.75	0.75	0.5	0.25	0	0.75	1	0.75	1	0.75	1	0.75

< 농장단위 PCV3 양성률 >

PCV3	계	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
양성 샘플수	63	7	9	5	2	0	4	7	6	7	5	5	6
양성률	0.328	0.44	0.56	0.31	0.13	0.00	0.25	0.44	0.38	0.44	0.31	0.31	0.38

< 샘플별 PCV3 양성률 >

PCV2	계	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
양성 샘플수	161	12	14	15	6	12	15	15	14	14	14	15	15
양성률	0.839	0.75	0.88	0.94	0.38	0.75	0.94	0.94	0.88	0.88	0.88	0.94	0.94

< 샘플별 PCV2 양성률 >

PCV3 & PCV2	계	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
양성 샘플수	61	7	8	5	1	0	4	7	6	7	5	5	6
양성률	0.318	0.44	0.50	0.31	0.06	0.00	0.25	0.44	0.38	0.44	0.31	0.31	0.38

< PCV3 & PCV2 복합감염률 >

나. Lung과 hilar lymph node에 장기에 따른 PCV3 검출율을 비교해 보면, Lung에서의 검출율이 43.8%(42/96)이고 hilar lymph node에서는 21.9%(21/96)의 검출율을 나타내었다. 같은 개체 또는 농장에서 PCV3가 감염된 경우에도 hilar lymph node보다는 lung에서의 감염이 많은 걸 볼 수 있다.

PCR & mqPCR TEST

Total : 192 samples

	PCV3 PCR	PCV3 mqpcr	PCV2 mqpcr
Positive	55(28.6%)	42(21.9%)	161(83.8)
L	38(25*+13)	29(25*+4)	75
LN	17(9*+8)	13(9*+4)	86

* : pcr & mqpcr 결과 둘다 양성인 샘플수

4. Porcine circovirus type 3 계절적 분포

가. PCV3가 모두 검출되지 않은 5월을 기준으로 볼 때, 6월(25%), 7월(44%)이 될수록 검출율이 증가하다 2월까지 약 30%~56% 정도의 검출율을 나타내었다. 그리고 3월(31%), 4월(13%)로 감소하다가 5월에 0%를 보였다.

**PCV3 infection rate by month
(by sample)**



나. 같은 농장, 같은 개체의 샘플을 이용한 PCV2 검출율과 비교해볼 때, PCV3와 유사하게 4월에 virus 검출율이 확연하게 줄었고 5월을 기점으로 약간 상승하다가 연중내내 일정 비율의 검출율이 지속되었다.

**PCV3 & PCV2 infection rate by month
(by sample)**



5. PCV3 양성 조직의 병리학적 소견

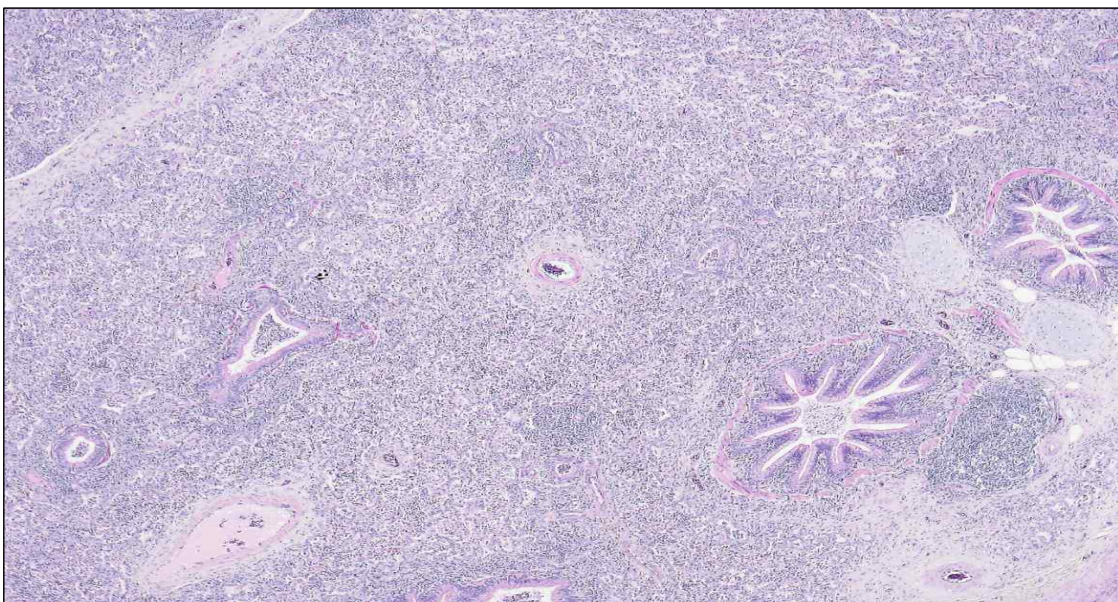
PCR & multiplex real-time PCR 검사 결과 모두 PCV3-positive이 나오고 PCV2-negative인 샘플(lung)을 H&E stain 후 현미경으로 확인을 하였다.

PCR & mqPCR TEST

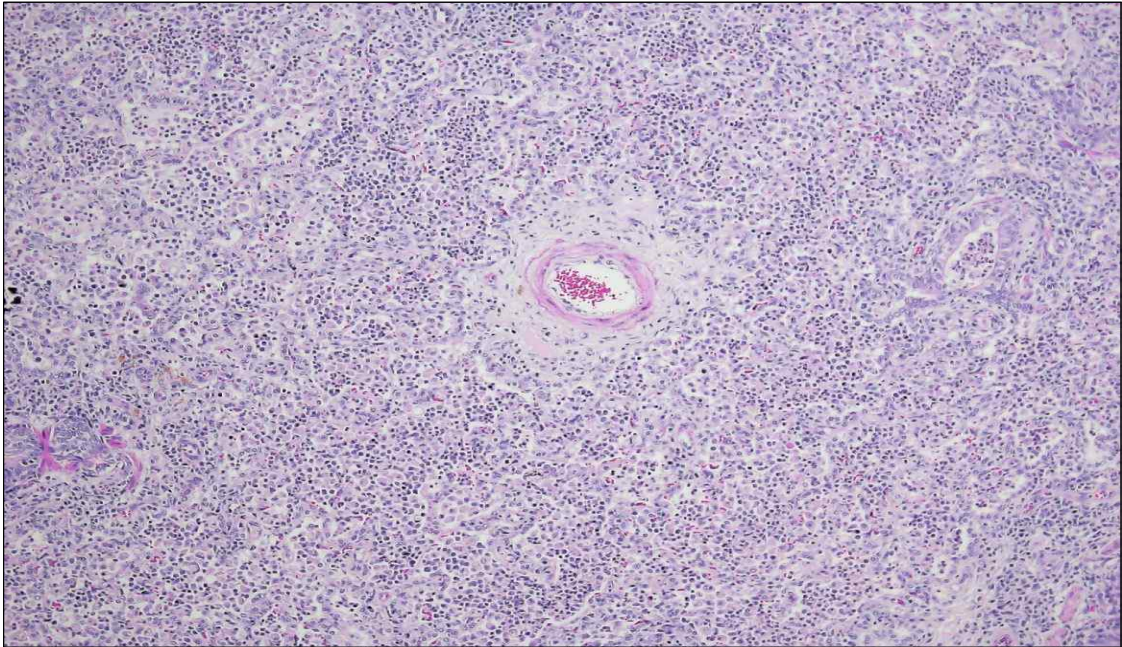
	PCV3 PCR	PCV3 mqpcr	PCV2 mqpcr
4 1-2 L	O	O	X

가. Lung

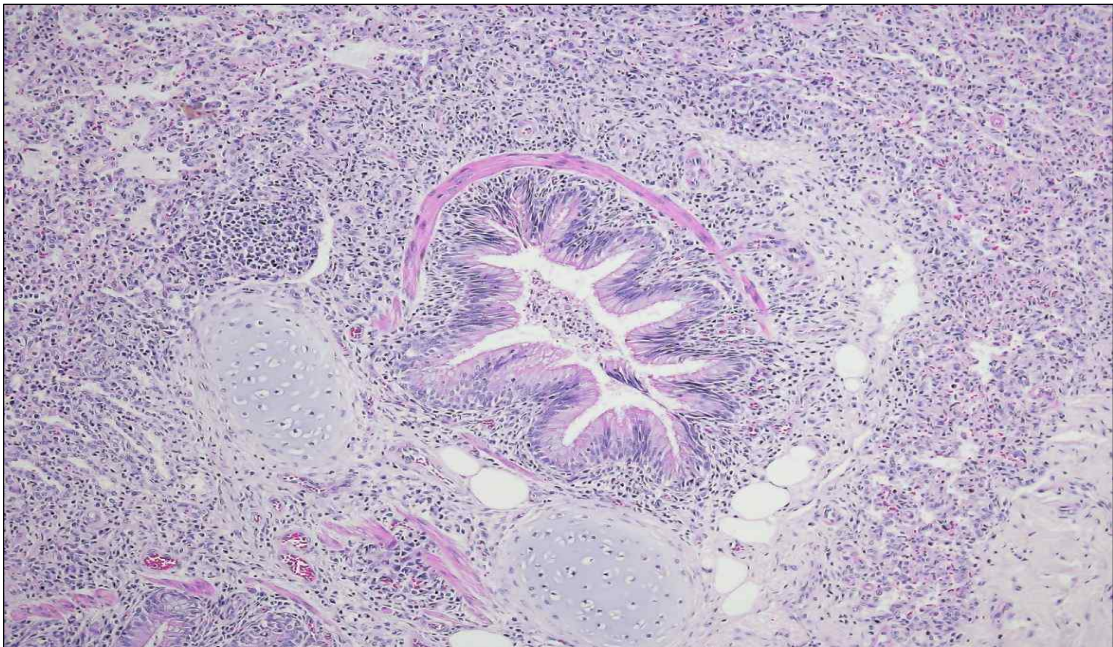
폐조직의 구조가 심하게 파괴되어 형태를 알아볼 수 없을 정도이며 interstitial pneumonia가 모든 폐조직에 걸쳐서 퍼져 있다. 혈관에는 림프구가 침투된 perivascular cuffing가 확인 되며, 기관지주변에도 bronchopneumonia가 관찰된다.



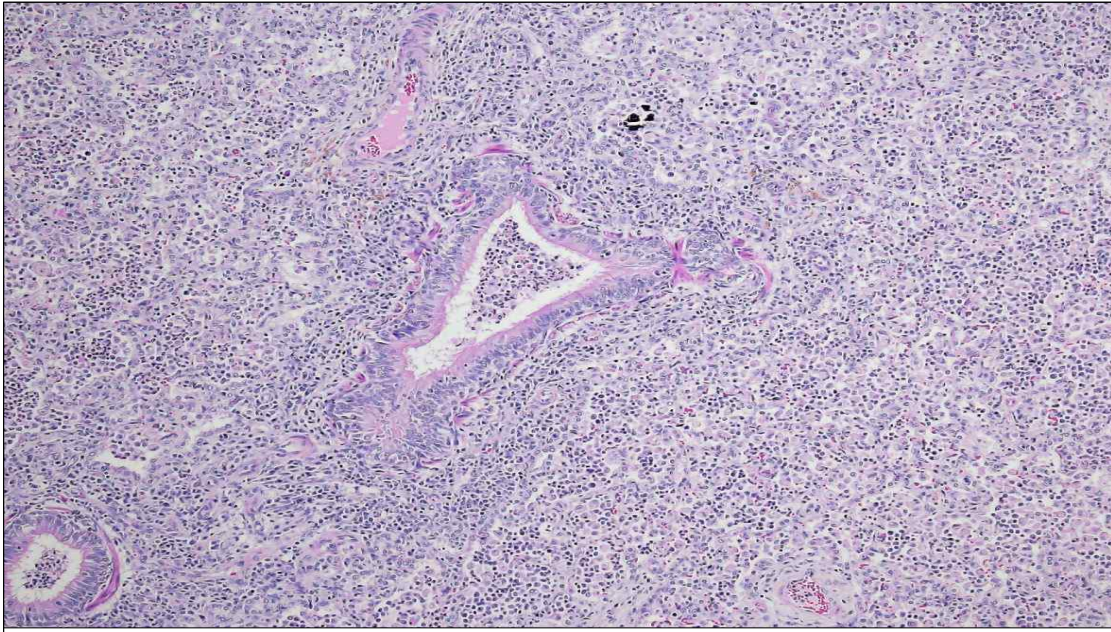
Interstitial pneumonia(100x)



Perivascular cuffing(200x)



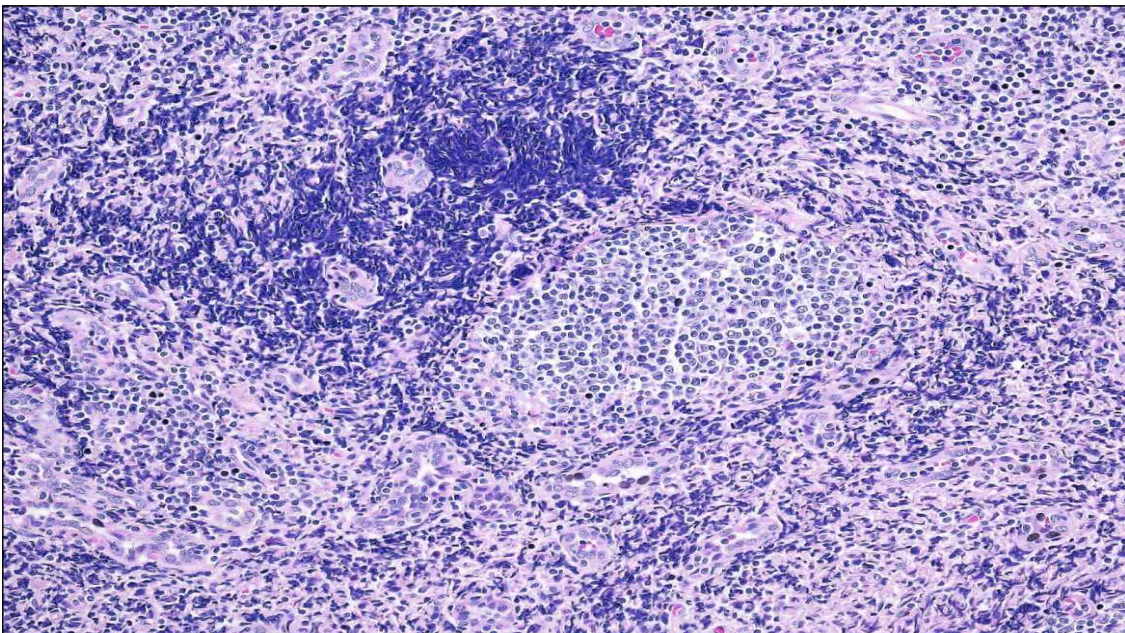
Bronchopneumonia(200x)



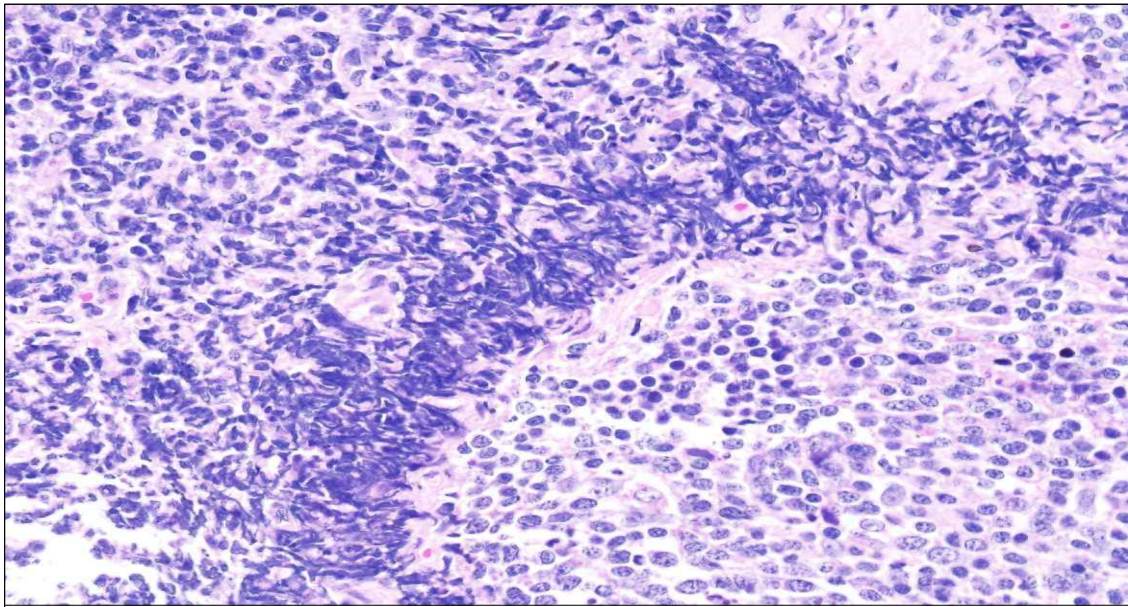
Interstitial pneumonia(200x)

나. Hilar lymph node

hilar lymph node에서는 macrophage infiltration이 다수 발견되며, lymphoid depletion 소견도 보인다.



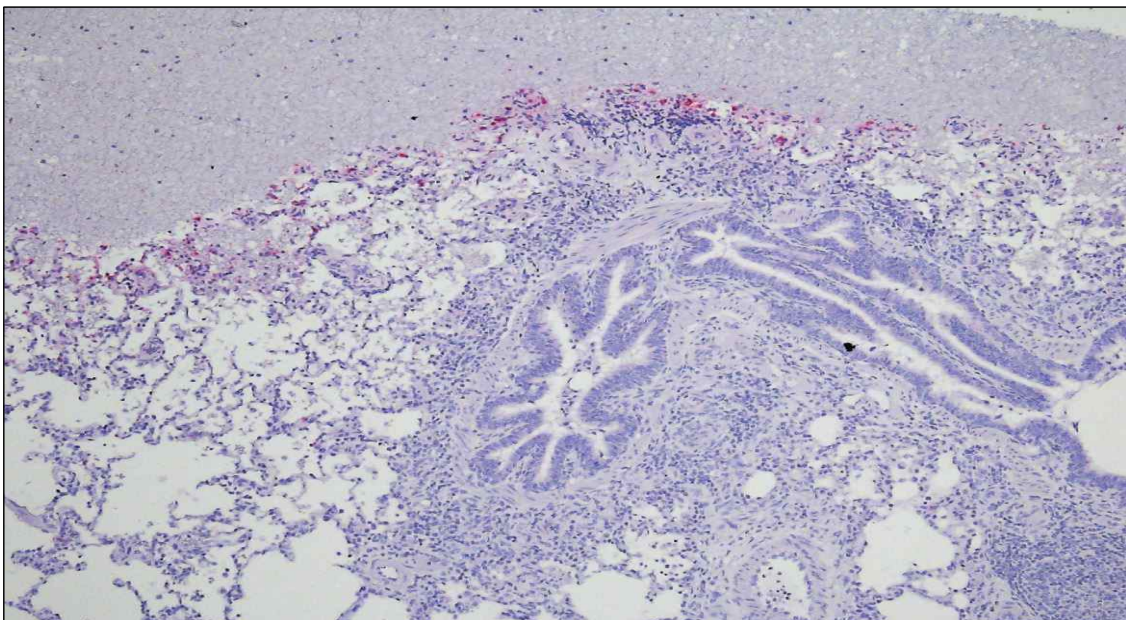
macrophage infiltraion



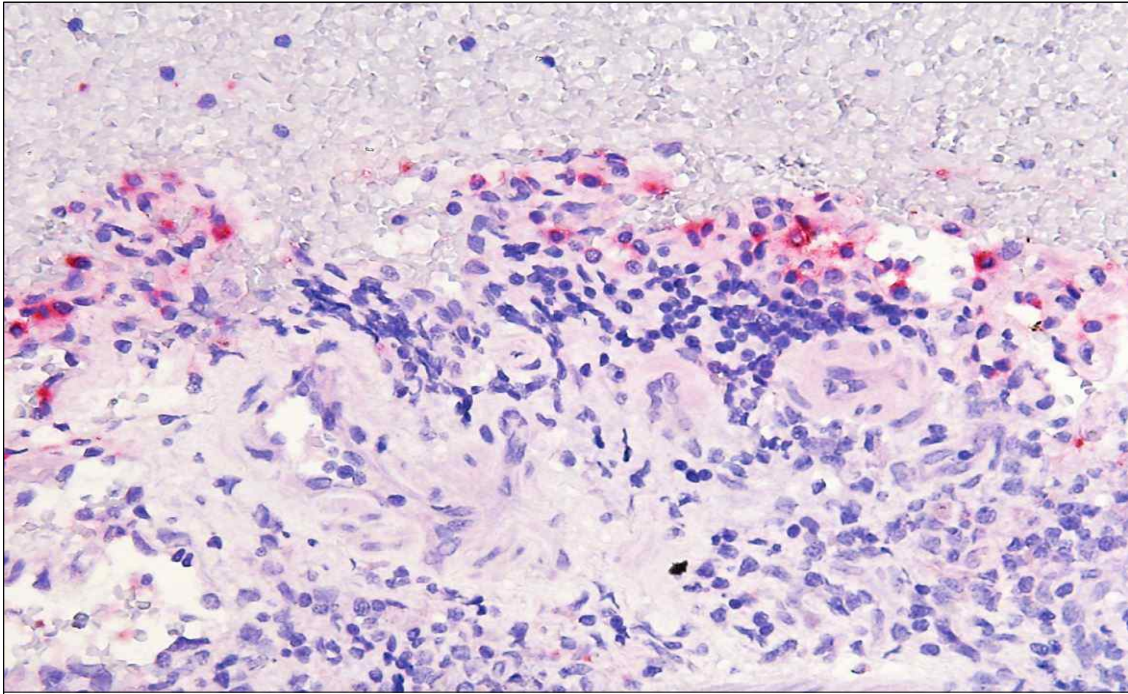
macrophage infiltraion

6. ISH

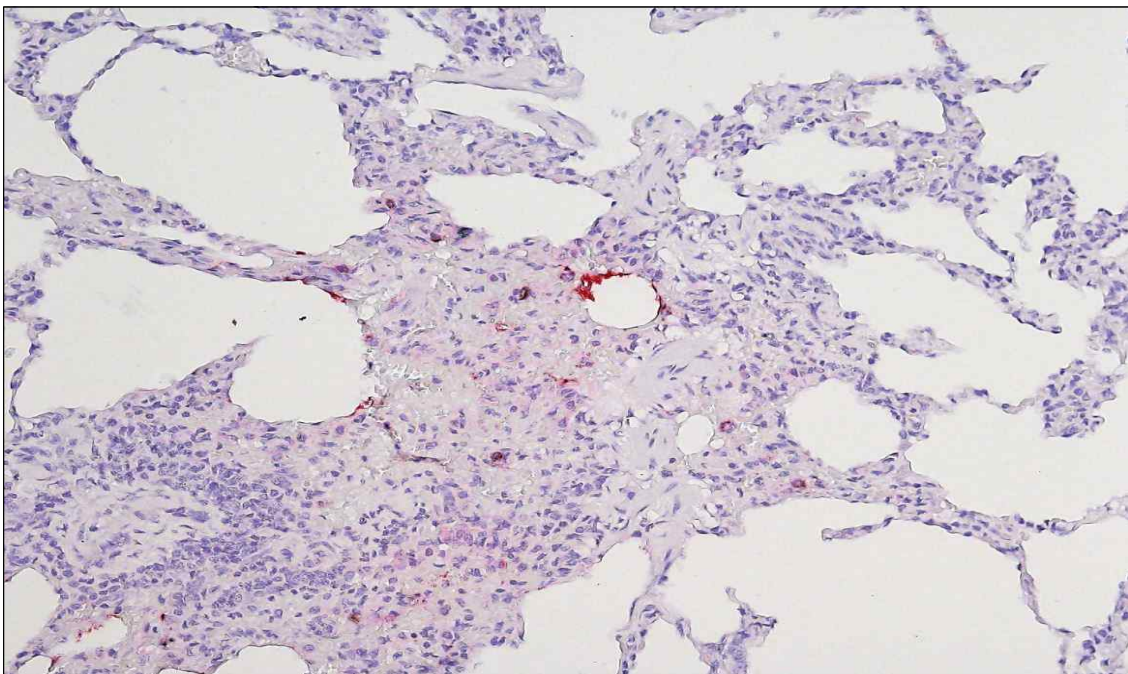
조직 내 porcine circovirus type 3를 확인하기 위한 ISH 염색 결과 lung내 PCV3를 확인할 수 있었다. PCV3와 PCV2 둘다 positive인 샘플에서 virus가 더 많이 검출되었으며, PCV3 단독 감염인 조직에서도 virus가 확인된 것을 볼 수 있었다.



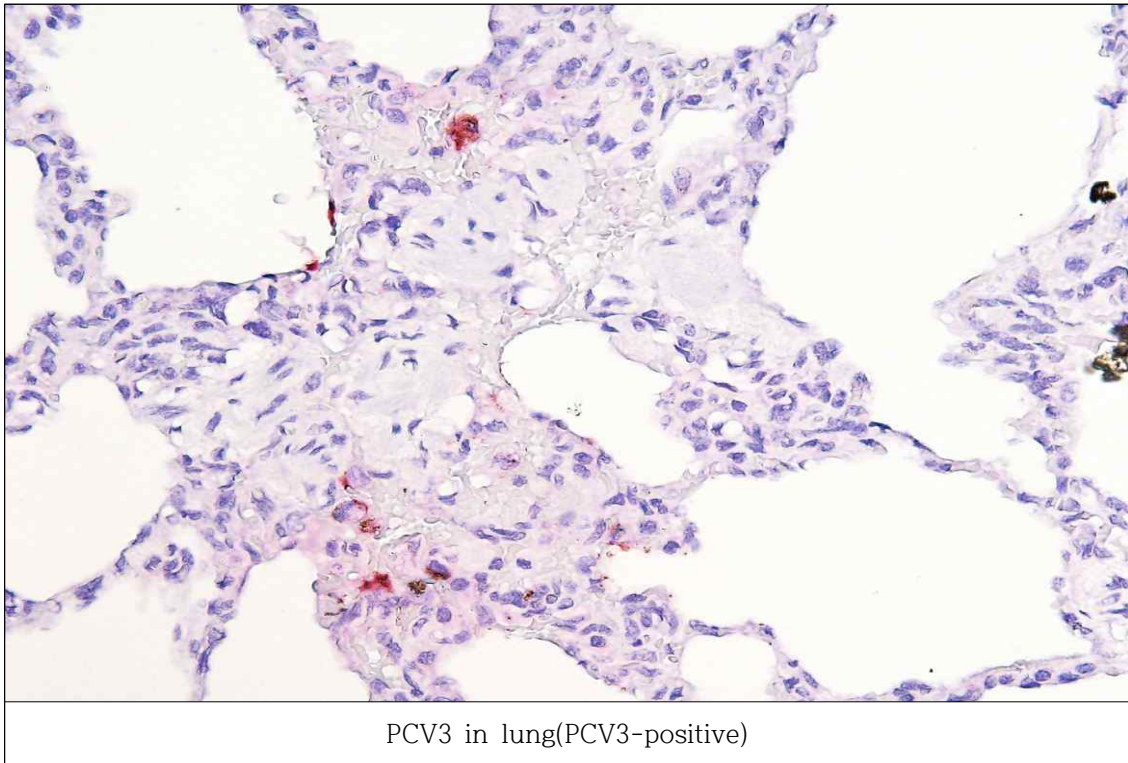
PCV3 in lung(PCV3, PCV2 both positive)



PCV3 in lung(PCV3, PCV2 both positive)



PCV3 in lung(PCV3-positive)

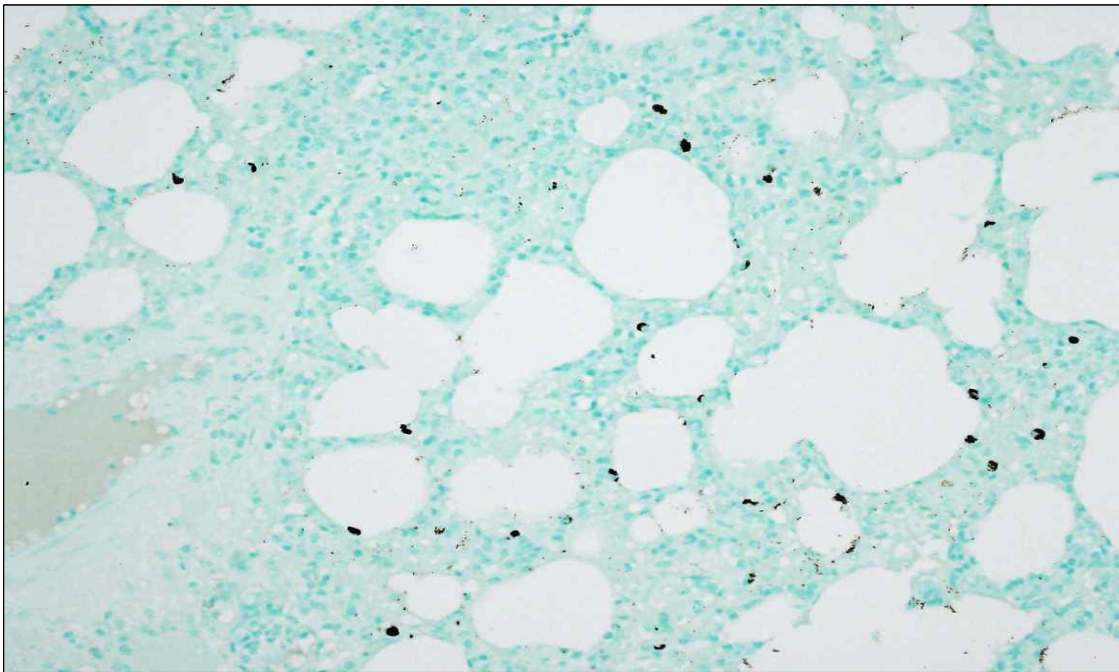


7. IHC

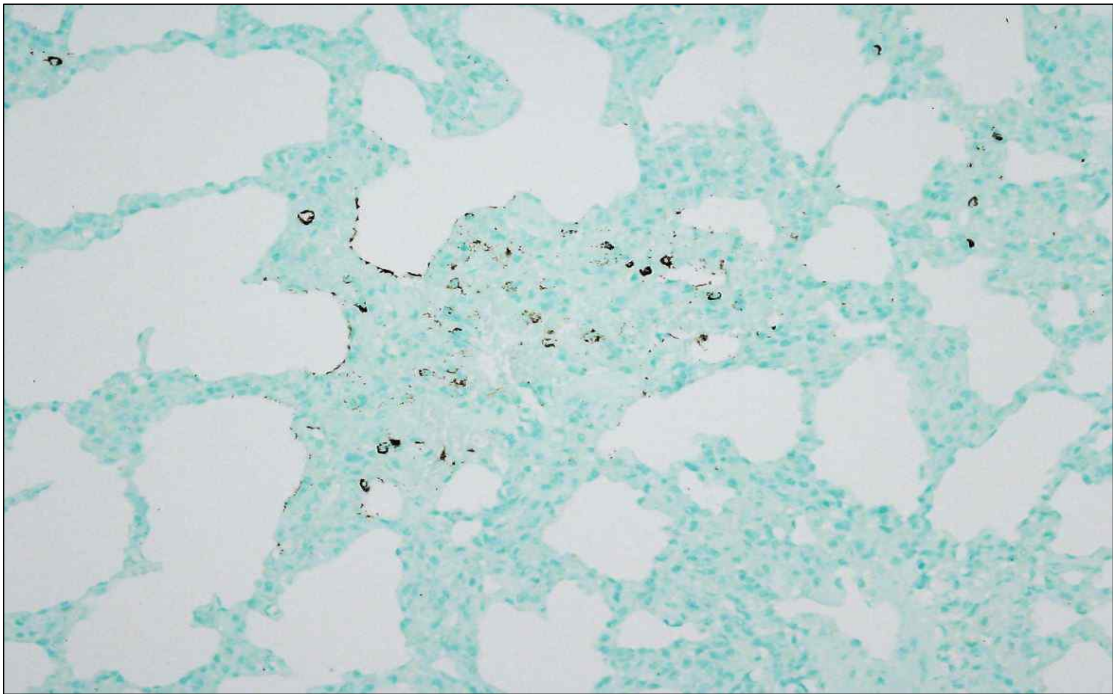
PCV2 antibody를 이용한 IHC 염색 결과를 확인하였다. PCV3, PCV2 둘 다 positive인 샘플과 PCV3만 positive인 샘플 모두에서 PCV2가 검출되었고, both positive인 조직에서 더 많은 PCV2가 확인되었다. PCR 결과 PCV2가 음성인 조직에서도 PCV2가 검출되었는데, PCR의 민감도가 떨어져서 소량의 virus를 감지하지 못하였거나, PCV2 vaccination에 의한 것으로 보인다.



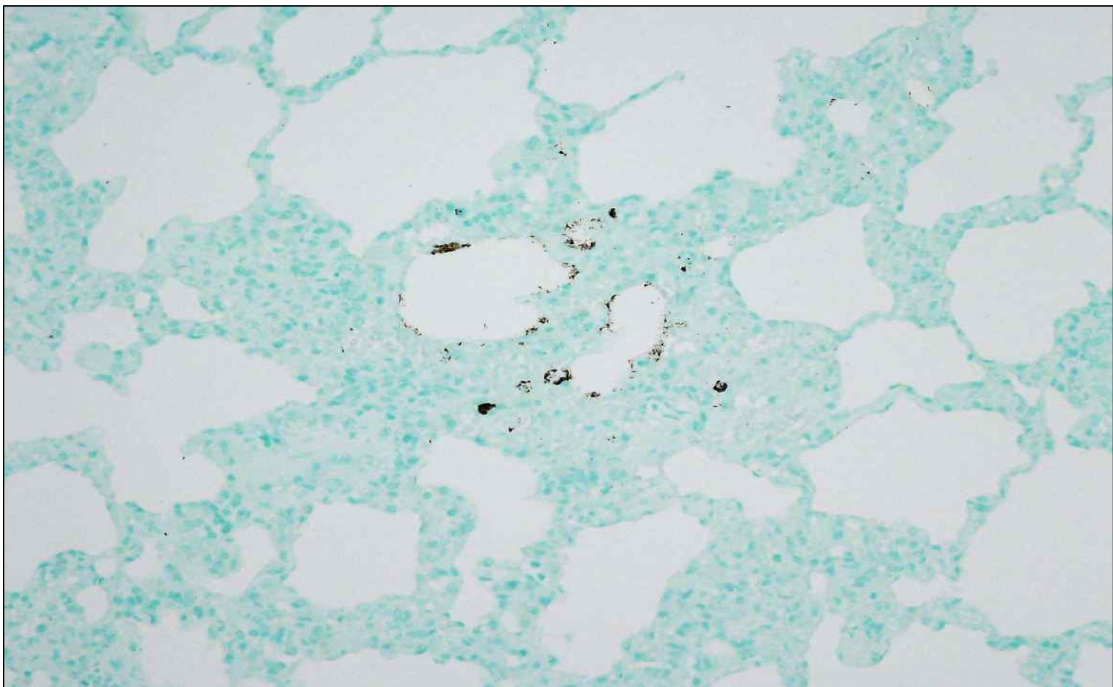
PCV2 in lung(PCV3, PCV2 both positive)



PCV2 in lung(PCV3, PCV2 both positive)



PCV2 in lung(PCV3-positive)



PCV2 in lung(PCV3-positive)

IV. Discussion

porcine circovirus type 3는 2010년 즈음에 미국에서 처음 발견되었으나, porcine circovirus type 3라는 명칭으로 불리면서 정식 연구 및 보고된 것은 2016년 미국에서 시작되었다. 이후, 이러한 novel virus의 존재는 미국 뿐 아니라 중국, 브라질, 폴란드에서도 확인이 되었으며, 이러한 정보를 바탕으로 2017년 즈음에 국내에서도 확인이 되었다.

porcine circovirus type 3에 대한 시료 수집은 기존 PCVAD와 같은 감염 의심 증상 개체의 시료에 대한 추가 검사 형태로 진행되었으며, 국내에서 확인된 PCV3의 nucleotide sequence는 US strain 및 china strain과 90% 이상 일치하는 것으로 보고되어 있다.

novel virus인 PCV3가 추후 전세계적으로 돼지 농장에 어떤 영향을 줄 지는 알 수 없지만, 새로운 바이러스의 출현으로 이에 대한 연구는 세계 곳곳에서 진행되고 있으며 갑작스런 변이에 대한 대처도 원활하게 될 것으로 보인다.

PCV3에 대한 대부분의 연구는 porcine circovirus associated disease(PCAVD), post-weaning multi-systemic wasting syndrome(PWMS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome(PDNS), PRRS에 대한 감염 의심 농장 시료를 대상으로 이루어 지고 있으며, 호흡기·소화계·기타 질병이 없이 정상적으로

사육된 후 도축이 이루어지는 개체에 대한 연구는 거의 없다고 볼 수 있다.

이로 인해 이 연구에서는 아프지 않은 정상 개체를 target으로 하였으며, 지역도 전라북도 내로 국한하여 실험을 진행하였다. sampling은 2018년 7월부터 2019년 6월까지 1년(12개월)에 걸쳐 임의로 농장을 선정하여 채취하였다.

1. Porcine circovirus type 3 양성률

PCV3 polymerase chain reaction 검사를 위한 primer는 중국 내 논문을 참고하였으며, 현재까지의 연구를 토대로 보았을 때, nucleotide sequence가 90% 이상이기 때문에 국내 pcv3 detection은 충분히 가능하다고 판단하였다.

일반 PCR 및 multiplex quantitative real-time PCR 검사 결과는 primer의 차이로 인해 동일하지는 않았으나, 검사 결과 한 개라도 양성인 경우는 양성으로 판단하였다.

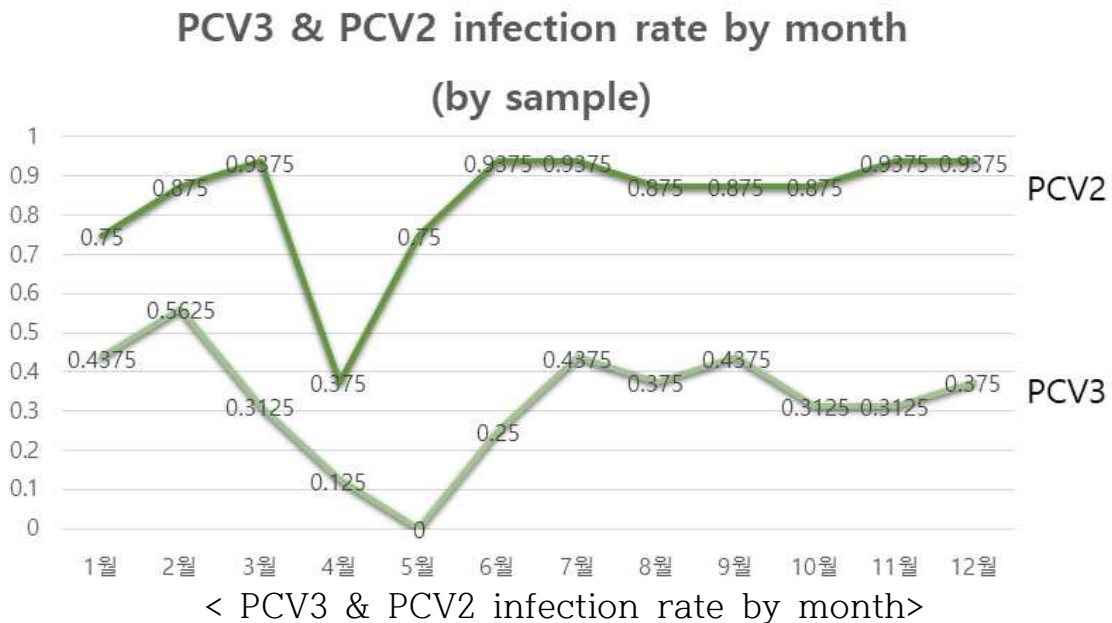
농장 단위의 PCV3의 양성률은 68.8%, PCV2의 경우는 97.9%의 양성률을 보였으며, PCV3 양성 농장은 모두 PCV2가 양성임을 확인하였다. 이 결과로 볼 때, PCV2가 전국적으로 만연해 있다는 것을 확인할 수 있었으며, PCV3도 68.8%로 상당히 많은 농장에서 검출된다는 것을 확인할 수 있었다.

샘플 단위의 PCV3 양성률은 32.8%, PCV2는 83.9%를 보였으며, PCV3 & PCV2 복합 감염률은 31.8%였다. sample 조직으로

구분해보면, PCV3는 lung에서 42건, hilar lymph node에서는 21건이 양성으로 확인되었고 PCV2는 lung에서 75건, hilar lymph node에서 86건이 양성으로 확인되었다.

위 결과를 종합해 보면, PCV3의 농장 감염율은 68.8%지만 개체별 감염율은 32.8%로 PCV2만큼 개체 감염율이 크지 않다는 걸 알 수 있었으며, PCV2는 lung보다 lymph node에서 검출율이 높은 반면, PCV3는 lung에서의 검출율이 2배 높게 확인되었다.

2. PCV3 & PCV2 infection rate by month



위 그래프와 같이 PCV3의 월별 분포를 보면 PCV3는 1년 중 가장 건조한 날씨인 5월에 0%로 한 건도 감염 사실이 확인되지 않았으며 6월부터 점점 증가하는 모습을 보이다가 7월~3월까지 31 ~ 56%의 감염률을 나타내었다. PCV2의 월별 분포와 비교해볼 때 감

염료의 차이는 있지만 PCV2도 4월에 감소하는 추세를 보이는 등 유사한 월별 변화 양상을 보이고 있다.

3. Pathological lesion

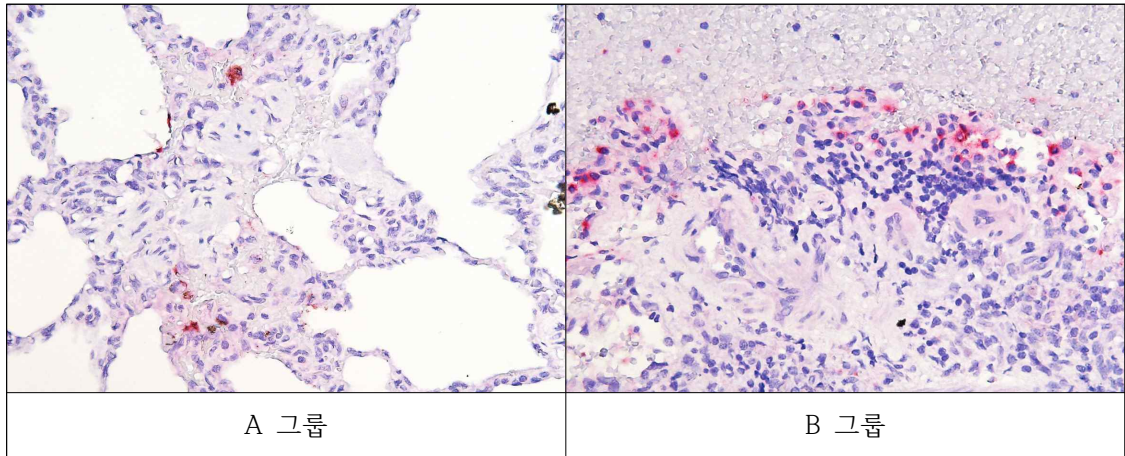
porcine circovirus type 3 positive 조직의 병리학적 소견을 확인하고자 아래와 같이 4개 그룹으로 나누어 H&E 염색을 실시하였다.

A 그룹	B 그룹	C 그룹(control)
PCV3-positive & PCV2-negative	PCV3-positive & PCV2-positive	PCV3-negative & PCV2-negative (control)

PCV3-positive & PCV2-negative sample인 4 1-2 L을 H&E 염색하여 관찰한 결과 interstitial pneumonia, perivascular cuffing 소견을 확인하였으며, hilar lymph node에서는 macrophage infiltration, lymphoid depletion 소견이 확인 관찰되었다.

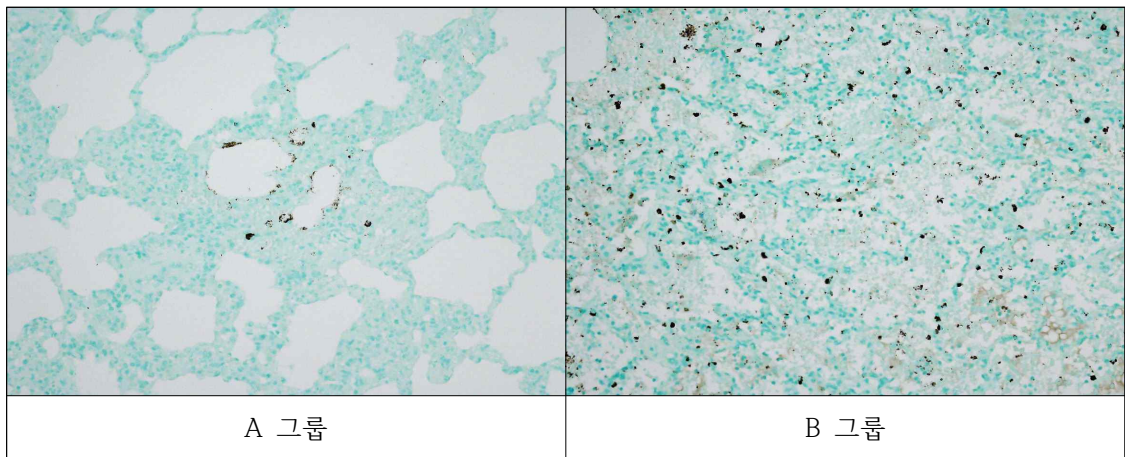
4. ISH(in situ hybridization)

lung의 병리학적 이상 소견과 porcine circovirus type 3와의 연관성을 확인하고자 실시한 ISH 염색 결과 PCV3 양성 조직인 A와 B 그룹에서 porcine circovirus type 3가 확인되었으며, lung에서만 관찰이 되었다. 이 때, PCV2와 복합 감염된 B 그룹에서 더 많이 관찰된 것을 알 수 있었다.



5. IHC(immunohistochemistry)

동일 조직에 대한 PCV2 감염 정도를 확인하기 위해 실시한 ISH 염색 결과 복합감염된 B 그룹에서 다수가 확인이 되었으며, PCV2 negative로 간주된 A 그룹에서도 약간의 PCV2 항체가 검출되었는데, 이는 PCV2 백신에 의한 것이거나 또는 본 연구에 사용된 primer로 검출이 안된 PCV2 genotype인 것으로 생각해 볼 수 있겠다.



A그룹보다는 B그룹에서 porcine circovirus type3와 type2가 훨씬 더 많이 관찰되었고, 병리학적 이상 소견도 더 뚜렷하게 나타났다. A그룹(only PCV3 positive group)의 H&E, ISH, IHC 염색 사진을 비교분석해 볼 때, porcine circovirus type 3에 의해 interstitial pneumonia, bronchopneumonia와 같은 소견을 나타내고 있었다.

본 연구는 porcine circovirus type 3의 전라북도 내 감염 양상과 계절에 따른 변화 양상을 연구하고자 함이었으며, 이에 덧붙여 PCV3에 의한 병리학적 영향성을 파악하고자 하였다. PCV3 단독 감염 시료가 드물기 때문에 약간의 어려움이 있었으며, 이에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Reference

1. Allan, G., Krakowka, S., Ellis, J., Charreyre, C., 2012. Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Res.* 64, 4-9.
2. Hye-Ryung Kima, Yu-Ri Parka, Da-Rae Lima, Min-Ji Parka, Ji-Young Parkb, Seong-Hee Kimb, Kyoung-Ki Leeb, Young S. Lyooc, Choi-Kyu Park, Multiplex real-time polymerase chain reaction for the differential detection of porcine circovirus 2 and 3. *Journal of Virological Methods* 250 (2017) 11-16
3. Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q., 2017. Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 703-708.
4. Palinski, R., Pi~neyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., . . . Hause, B. M. (2016). A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *Journal of Virology*, 91(1), e01879-16.
5. Seung-Chai Kim¹, Salik Nazki¹, Sam Kwon¹, Jhung-Hyun Juhng¹, Kyeong-Hwan Mun¹, Do-Young Jeon¹, Chang-Gi Jeong¹, Amina Khatun¹, Seog-Jin Kang² and Won-Il Kim^{1*}, Kim et al. *BMC Veterinary Research* (2018) 14:294
6. Tischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., Koch, M.A., 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA.

Nature 295, 64-66.

7. Kwon, T., Lee, D.U., Yoo, S.J., Je, S.H., Shin, J.Y., Lyoo, Y.S., 2017a. Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotype shift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Res.* 228, 24-29.
8. Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 591-615.

Appendix 1. 농가별 sampling raw data

구분	농장주	소재지	두수	시료수 (Lung)	시료수 (hilar LN)	시료 채취일	비고
1	김*민	정읍시	20	4	4	2018-07-30	5두식 풀링
2	권*순	정읍시	20	4	4	2018-07-30	"
3	김*규	김제시	20	4	4	2018-07-30	"
4	이*호	정읍시	20	4	4	2018-07-30	"
5	김*관	김제시	20	4	4	2018-08-17	"
6	최*윤	정읍시	20	4	4	2018-08-17	"
7	김*섭	남원시	20	4	4	2018-08-17	"
8	표*수	익산시	20	4	4	2018-08-17	"
9	성*욱	김제시	20	4	4	2018-09-19	"
10	윤*엽	익산시	20	4	4	2018-09-19	"
11	박*덕	김제시	20	4	4	2018-09-19	"
12	조*환	정읍시	20	4	4	2018-09-19	"
13	양*석	김제시	20	4	4	2018-10-12	"
14	이*주	고창군	20	4	4	2018-10-12	"
15	윤*엽	익산시	20	4	4	2018-10-12	"
16	표*수	익산시	20	4	4	2018-10-12	"
17	황*순	김제시	20	4	4	2018-11-09	"
18	양*석	김제시	20	4	4	2018-11-09	"
19	김*민	정읍시	20	4	4	2018-11-09	"
20	김*기	김제시	20	4	4	2018-11-09	"
21	윤*엽	익산시	20	4	4	2018-12-07	"
22	최*윤	정읍시	20	4	4	2018-12-07	"
23	김*민	정읍시	20	4	4	2018-12-07	"
24	표*수	익산시	20	4	4	2018-12-07	"

구분	농장주	소재지	두수	시료수 (Lung)	시료수 (hilar LN)	시료 채취일	비고
25	성*욱	김제시	20	4	4	2019-01-25	5두식 풀링
26	양*석	김제시	20	4	4	2019-01-25	"
27	김*화	김제시	20	4	4	2019-01-25	"
28	김*민	정읍시	20	4	4	2019-01-25	"
29	이*주	고창군	20	4	4	2019-02-19	"
30	이*형	임실군	20	4	4	2019-02-19	"
31	김*민	정읍시	20	4	4	2019-02-19	"
32	김*민	정읍시	20	4	4	2019-02-19	"
33	양*석	김제시	20	4	4	2019-03-22	"
34	표*수	익산시	20	4	4	2019-03-22	"
35	박*애	김제시	20	4	4	2019-03-22	"
36	김*기	김제시	20	4	4	2019-03-22	"
37	최*윤	정읍시	20	4	4	2019-04-19	"
38	최*석	정읍시	20	4	4	2019-04-19	"
39	양*석	김제시	20	4	4	2019-04-19	"
40	이*형	임실군	20	4	4	2019-04-19	"
41	표*수	익산시	20	4	4	2019-05-24	"
42	김*순	정읍시	20	4	4	2019-05-24	"
43	황*순	김제시	20	4	4	2019-05-24	"
44	양*석	김제시	20	4	4	2019-05-24	"
45	윤*엽	익산시	20	4	4	2019-06-28	"
46	이*관	진안군	20	4	4	2019-06-28	"
47	박*애	김제시	20	4	4	2019-06-28	"
48	최*윤	정읍시	20	4	4	2019-06-28	"
계			960	192	192		

Appendix 2. PCV3 & PCV2 항원 양성률

구분	DNA sample	PCV3 PCR	PCV3 (mqPCR)	PCV2 (mqPCR)	구분	DNA sample	PCV3 PCR	PCV3 (mqPCR)	PCV2 (mqPCR)
1	7 1-1 L	○	△	○	5	7 1-1 N	○	○	○
2	7 1-2 L	○	○	○	6	7 1-2 N			
3	7 2-1 L			○	7	7 2-1 N			○
4	7 2-2 L			○	8	7 2-2 N	○		○
9	7 3-1 L	○	○	○	13	7 3-1 N			○
10	7 3-2 L			○	14	7 3-2 N			○
11	7 4-1 L	○	△	○	15	7 4-1 N			○
12	7 4-2 L			○	16	7 4-2 N	△		○
17	8 1-1 L	△	△	○	21	8 1-1 N			○
18	8 1-2 L	○	○	○	22	8 1-2 N			○
19	8 2-1 L	○	△	○	23	8 2-1 N	○		○
20	8 2-2 L			○	24	8 2-2 N			○
25	8 3-1 L			○	29	8 3-1 N			○
26	8 3-2 L	○	○	○	30	8 3-2 N	○		○
27	8 4-1 L				31	8 4-1 N			○
28	8 4-2 L				32	8 4-2 N			○
33	9 1-1 L	○		○	37	9 1-1 N	△		○
34	9 1-2 L	○	△	○	38	9 1-2 N			○
35	9 2-1 L			○	39	9 2-1 N	○	△	○
36	9 2-2 L	○	○	○	40	9 2-2 N			○
41	9 3-1 L				45	9 3-1 N			○
42	9 3-2 L				46	9 3-2 N		○	○
43	9 4-1 L			○	47	9 4-1 N			○
44	9 4-2 L	○		○	48	9 4-2 N			○
49	10 1-1 L	○		○	53	10 1-1 N			○
50	10 1-2 L	○	○	○	54	10 1-2 N			○
51	10 2-1 L	○		○	55	10 2-1 N	○	△	○
52	10 2-2 L			○	56	10 2-2 N			○
57	10 3-1 L	○		○	61	10 3-1 N			○
58	10 3-2 L			○	62	10 3-2 N			○
59	10 4-1 L				63	10 4-1 N			○
60	10 4-2 L			○	64	10 4-2 N			
65	11 1-1 L			○	69	11 1-1 N			○
66	11 1-2 L		△	○	70	11 1-2 N			○

구분	DNA sample	PCV3 PCR	PCV3 (mqPCR)	PCV2 (mqPCR)	구분	DNA sample	PCV3 PCR	PCV3 (mqPCR)	PCV2 (mqPCR)
67	11 2-1 L	○		○	71	11 2-1 N			○
68	11 2-2 L			○	72	11 2-2 N			○
73	11 3-1 L			○	77	11 3-1 N			○
74	11 3-2 L	○		○	78	11 3-2 N			○
75	11 4-1 L	○	△	○	79	11 4-1 N	△		○
76	11 4-2 L				80	11 4-2 N			○
81	12 1-1 L	○	△	○	85	12 1-1 N	○		○
82	12 1-2 L	○	○	○	86	12 1-2 N		○	○
83	12 2-1 L	○	△	○	87	12 2-1 N			○
84	12 2-2 L			○	88	12 2-2 N			○
89	12 3-1 L				93	12 3-1 N			○
90	12 3-2 L	○		○	94	12 3-2 N			○
91	12 4-1 L			○	95	12 4-1 N			○
92	12 4-2 L			○	96	12 4-2 N			○
97	1 1-1 L			○	101	1 1-1 N			○
98	1 1-2 L			○	102	1 1-2 N			
99	1 2-1 L	○		○	103	1 2-1 N			○
100	1 2-2 L	△		○	104	1 2-2 N			○
105	1 3-1 L	○	△	○	109	1 3-1 N			
106	1 3-2 L				110	1 3-2 N			
107	1 4-1 L	○	△	○	111	1 4-1 N	△	○	○
108	1 4-2 L	○	△	○	112	1 4-2 N	△	○	○
113	2 1-1 L			○	117	2 1-1 N			
114	2 1-2 L			○	118	2 1-2 N			○
115	2 2-1 L	○			119	2 2-1 N			○
116	2 2-2 L	△		○	120	2 2-2 N		○	○
121	2 3-1 L	△	○	○	125	2 3-1 N	○	○	○
122	2 3-2 L			○	126	2 3-2 N			○
123	2 4-1 L	○	○	○	127	2 4-1 N	○	○	○
124	2 4-2 L		△	○	128	2 4-2 N	△		○
129	3 1-1 L			○	133	3 1-1 N			○
130	3 1-2 L			○	134	3 1-2 N			○
131	3 2-1 L	○	△	○	135	3 2-1 N			○
132	3 2-2 L	○	○	○	136	3 2-2 N			○
137	3 3-1 L		△	○	141	3 3-1 N			○
138	3 3-2 L	○		○	142	3 3-2 N		△	○

구분	DNA sample	PCV3 PCR	PCV3 (mqPCR)	PCV2 (mqPCR)	구분	DNA sample	PCV3 PCR	PCV3 (mqPCR)	PCV2 (mqPCR)
139	3 4-1 L			○	143	3 4-1 N			○
140	3 4-2 L				144	3 4-2 N			○
145	4 1-1 L				149	4 1-1 N			○
146	4 1-2 L	○	○		150	4 1-2 N	○	○	○
147	4 2-1 L				151	4 2-1 N			○
148	4 2-2 L				152	4 2-2 N			
153	4 3-1 L			○	157	4 3-1 N			○
154	4 3-2 L				158	4 3-2 N			○
155	4 4-1 L				159	4 4-1 N			
156	4 4-2 L				160	4 4-2 N			
161	5 1-1 L			○	165	5 1-1 N			○
162	5 1-2 L			○	166	5 1-2 N			○
163	5 2-1 L			○	167	5 2-1 N			○
164	5 2-2 L			○	168	5 2-2 N			○
169	5 3-1 L				173	5 3-1 N			○
170	5 3-2 L			○	174	5 3-2 N			○
171	5 4-1 L				175	5 4-1 N			
172	5 4-2 L				176	5 4-2 N			○
177	6 1-1 L			○	181	6 1-1 N			○
178	6 1-2 L	○	△	○	182	6 1-2 N			○
179	6 2-1 L		○	○	183	6 2-1 N	△	△	○
180	6 2-2 L			○	184	6 2-2 N			○
185	6 3-1 L			○	189	6 3-1 N			○
186	6 3-2 L	○	○	○	190	6 3-2 N			○
187	6 4-1 L				191	6 4-1 N			○
188	6 4-2 L			○	192	6 4-2 N			○

Appendix 3. PRRS 검사 결과

VDC 순번	검체번호	결과(NA)	결과(EU)	CT(NA)	CT(EU)
1	병리학조직-1	양성	음성	33.67	>35
2	병리학조직-2	음성	음성	>35	>35
3	병리학조직-3	음성	음성	>35	>35
4	병리학조직-4	음성	양성	>35	34.19
5	병리학조직-5	음성	음성	>35	>35
6	병리학조직-6	음성	음성	>35	>35
7	병리학조직-7	음성	음성	>35	>35
8	병리학조직-8	음성	음성	>35	>35
9	병리학조직-9	음성	음성	>35	>35
10	병리학조직-10	음성	양성	>35	34.96
11	병리학조직-11	음성	양성	>35	28.06
12	병리학조직-12	음성	음성	>35	>35
13	병리학조직-13	음성	음성	>35	>35
14	병리학조직-14	음성	음성	>35	>35
15	병리학조직-15	양성	양성	33.33	34.39
16	병리학조직-16	음성	음성	>35	>35
17	병리학조직-17	양성	양성	33.24	31.47
18	병리학조직-18	양성	음성	34.62	>35
19	병리학조직-19	음성	음성	>35	>35
20	병리학조직-20	음성	음성	>35	>35
21	병리학조직-21	음성	음성	>35	>35
22	병리학조직-22	음성	음성	>35	>35
23	병리학조직-23	양성	음성	31.77	>35
24	병리학조직-24	음성	음성	>35	>35
25	병리학조직-25	음성	음성	>35	>35
26	병리학조직-26	음성	음성	>35	>35
27	병리학조직-27	음성	음성	>35	>35
28	병리학조직-28	음성	음성	>35	>35
29	병리학조직-29	음성	음성	>35	>35
30	병리학조직-30	음성	음성	>35	>35
31	병리학조직-31	음성	음성	>35	>35
32	병리학조직-32	음성	음성	>35	>35
33	병리학조직-33	음성	음성	>35	>35
34	병리학조직-34	음성	음성	>35	>35
35	병리학조직-35	음성	음성	>35	>35

36	병리학조직-36	음성	음성	>35	>35
37	병리학조직-37	음성	음성	>35	>35
38	병리학조직-38	음성	음성	>35	>35
39	병리학조직-39	음성	음성	>35	>35
40	병리학조직-40	음성	음성	>35	>35
41	병리학조직-41	음성	음성	>35	>35
42	병리학조직-42	음성	음성	>35	>35
43	병리학조직-43	양성	음성	34.41	>35
44	병리학조직-44	음성	음성	>35	>35
45	병리학조직-45	음성	음성	>35	>35
46	병리학조직-46	음성	음성	>35	>35
47	병리학조직-47	음성	음성	>35	>35
48	병리학조직-48	음성	음성	>35	>35
49	병리학조직-49	음성	음성	>35	>35
50	병리학조직-50	음성	음성	>35	>35
51	병리학조직-51	음성	음성	>35	>35
52	병리학조직-52	음성	음성	>35	>35
53	병리학조직-53	음성	음성	>35	>35
54	병리학조직-54	음성	음성	>35	>35
55	병리학조직-55	음성	음성	>35	>35
56	병리학조직-56	음성	음성	>35	>35
57	병리학조직-57	음성	음성	>35	>35
58	병리학조직-58	음성	음성	>35	>35
59	병리학조직-59	음성	음성	>35	>35
60	병리학조직-60	음성	음성	>35	>35
61	병리학조직-61	음성	음성	>35	>35
62	병리학조직-62	양성	음성	34.74	>35
63	병리학조직-63	음성	음성	>35	>35

Appendix 4. Comparison of Multiplex quantitative real-time PCR

