

## 돼지 쉼코바이러스 2형의 진단을 위한 PCR법 적용

박효선<sup>1</sup>, 이효상, 나기복, 이관복, 강수정, 문순화

충청남도 축산위생연구소 당진지소  
(접수 2005. 9. 13, 게재승인 2006. 1. 11.)

### Application of PCR for diagnosis of porcine circovirus type 2

Hyo-Sun Park<sup>1</sup>, Hyo-Sang Lee, Ki-Bok Na,  
Kwan-Bok Lee, Su-Jung Kang, Sun-Hwa Moon

*Dangjin branch of the Chungnam Livestock & Veterinary Research Institute, Dangjin,  
343-803, Korea*

(Received 13 September 2005, accepted in revised form 11 January 2006)

#### Abstract

Porcine circovirus (PCV) is a small, nonenveloped virus that contains a single-stranded circular DNA genome of about 1.76 kb and belongs to the family *circoviridae*. The PCV-2 has been incriminated as the cause of post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), an emerging disease in pigs. In the present study, a PCR assay was applied to detect PCV-2 in tissue samples.

The presence of PCV-2 antigen in the porcine tissues was confirmed by indirect immunofluorescence (IIF) with PCV-2 specific monoclonal antibodies. And then DNA extracted from PCV-2 positive tissues was used as a template. One oligonucleotide primer suitable for PCR was selected from a published PCV-2 sequence (Genbank). Amplified PCR product was detected the same fragment lengths of 416 bp as a control.

Based on these results, it was suggested that the PCR is a simple and sensitive method for support diagnostic purposes.

---

**Key words** : Porcine circovirus type-2, Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PCR

---

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : +82-41-352-4056, Fax : +82-41-357-5850

E-mail : nopi97@hanmir.com

## 서 론

돼지 썬코바이러스(porcine circovirus : PCV)는 돼지 신장세포주(porcine kidney cell line, PK-15)에서 세포변성효과 (cytopathic effect, CPE)를 나타내지 않는 오염된 물질로 처음 밝혀졌다<sup>1, 2)</sup>.

PCV는 형태학적으로 피막이 없는 icosahedral 형태를 가지는 single-stranded circular DNA로 되어있다. 바이러스의 유전자는 약 1.76 kb의 크기로 2개의 중요한 open reading frames (ORFs)으로 구성되어 있으며, ORF 1 (930 bp)은 바이러스 복제에 관여하는 replication protein을 encoding하고 ORF 2 (690 bp)는 면역학적으로 중요한 capsid protein을 encoding한다<sup>3, 4)</sup>.

PCV는 psittacine beak-and-feather disease virus, chicken anemia virus 및 columbid circovirus와 함께 새로운 동물 바이러스과인 Circoviridae로 분류되었으나 이들 바이러스 사이에는 염기서열 상동성 및 항원성에 있어서 서로 관련이 없는 것으로 보고되었다<sup>5, 6)</sup>.

PCV 항체는 사람을 비롯한 쥐, 소, 돼지 등의 여러 동물에서 확인되었으나 이 동물들에 대한 병원성기전에 대해서는 거의 알려져 있지 않다<sup>7)</sup>. 특히 PK-15 세포주에서 유래된 PCV를 실험적으로 돼지에 감염시켰을 때 임상증상이 유발되지 않으며 돼지에 병원성이 없는 것으로 추정되어 PCV-1이라고 명명되었다<sup>8)</sup>.

최근에 이유자돈 및 육성돈에서 소모성 증상을 특징으로 하는 전염성 질병인 이유자돈전신성소모성증후군(post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)이 1991년 캐나다에서 처음 확인된 이후<sup>9)</sup> 미국, 유럽국가 및 일부 아시아 국가 등 양돈산업이 성행하고 있는 나라에서 보고되고 있다<sup>10-12)</sup>. PMWS의 감염은 5 - 18주령의 돼지에서 다발하며 점진적인 체중감소, 호흡곤란, 빈맥, 빈혈, 설사 및 황달 등의 증상을 특징으로 한다<sup>1)</sup>. 폐사율은 1 - 2%이나 영국에서는 일부 다른 병원체와 복합적으로 감염되면 40%까지 이를 만큼 다양하다고 보고하였으며<sup>9)</sup> 육

안병변으로는 육아종성 간질성 폐렴, 림프절 종대, 간염 및 신장염이 관찰된다.

PMWS 증상을 나타내는 돼지의 조직에서 PK-15 세포주에서 유래한 PCV와 유사한 항원과 핵산이 발견됨으로써 새로운 PCV 혹은 PCV 변이종이 이 질병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다<sup>13)</sup>. PMWS 증상을 보이는 돼지로부터 분리된 PCV들 간에는 96% 이상의 염기서열 상동성을 보이는 하나의 genotype을 형성하는 반면, PK-15 세포주에서 유래한 PCV-1과는 80% 이하의 염기서열 상동성을 보여 서로 다른 바이러스임이 확인되었다. 이러한 유전자 구조와 항원성의 차이를 바탕으로 이 새로운 분리주는 PCV-2로 명명되었다<sup>14, 15)</sup>.

PCV-2 감염을 확인하기 위해서는 세포배양을 통한 바이러스 분리, 전자현미경을 통한 바이러스 입자 관찰 등이 있으며, 혈청학적 방법으로는 간접형광항체법 (indirect immunofluorescent antibody test, IIFA), 면역효소단층법 (immunoperoxidase monolayer assay : IPMA), 효소면역법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학법 (immunohistochemistry, IHC) 등이 있다. 이 외에도 바이러스 핵산의 분포상태를 조직에서 검출하는 방법인 조직내 교잡법 (*in situ* hybridization, ISH), 극미량의 PCV-2 유전자를 검출하는 방법인 중합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, PCR) 등 여러 가지 진단 방법이 개발되어 사용되고 있다<sup>10, 13, 16, 17)</sup>.

Kim 등<sup>16)</sup>의 보고에 따르면 국내에서 사육되고 있는 돼지를 대상으로 PMWS를 진단한 결과 8.1% (133두/1,634두)가 양성으로 확인되어 국내에서도 PMWS가 존재하고 있음이 입증되었고, 또한 PMWS 증상이 있는 모든 돼지에서 PCV-2는 지속적으로 관찰된 반면 다른 병원체들은 낮은 지속성을 보여 PCV-2가 PMWS의 병원성기전에 중요한 역할을 하고 있다는 것이 확인되었다. 따라서 PMWS를 진단하기 위해서는 PCV-2의 검출이 반드시

필요하며 선행되어야 한다.

현재 일부 양돈농가에서는 PMWS의 감염을 농장내 돈군의 임상증상과 부검소견 등을 통해 진단하고 있으나 일부 육안 소견만으로는 PMWS를 진단하기는 어려우며, 병리학적 소견 및 형광항체 검사, 면역조직화학적 검사와 더불어 PCR 등의 실험실적 검사방법으로 PCV-2의 항원 검출이 반드시 수반되어야 한다.

본 연구에서는 농장내 돈군의 PCV-2 감염을 확인하기 위한 항원 검출방법으로 신속하고 민감도가 높은 PCR법을 이용하여 이 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

PMWS가 의심되는 야외 농장으로부터 40, 60, 80일령의 돼지 3마리를 공시하였으며 돼지의 혈액, 림프절, 편도, 심장, 폐장, 비장 및 간 등의 조직을 채취하여 바이러스 검출 재료로 사용하였다. PCV-2 감염을 확인하기 위한 양성조직은 국립수의과학검역원에서 양성재료를 분양받아 대조로 활용하였다.

### PCV-2 확인을 위한 간접형광항체법

채취한 조직에 PCV-2가 감염되었는지를 확인하기 위하여 간접형광항체법을 사용하였다. 즉, 동결 절편된 림프조직을 실온에서 5분 정도 두어 슬라이드 상에서 건조시키고, 아세톤으로 실온에서 10분 동안 고정 후 인산완충액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 5분간 3회 세척하였다. PCV-2에 특이적인 단클론 항체 (국립수의과학검역원 제공)를 1차 항체로 조직절편이 완전히 덮이도록 첨가하여 실온의 습상에서 1시간 반응한 후 PBS로 3회 세척하였다. 2차 항체로 FITC anti-mouse conjugate (Jeno Biotech)를 조직절편이 덮이도록 첨가하여 실온의 습상에서

1시간 반응 후 PBS로 3회 세척한 뒤 mounting buffer를 떨어뜨리고 커버글라스를 덮은 다음 형광현미경 하에서 관찰하였다.

### 바이러스 핵산 추출

PMWS 증상을 나타내는 돼지 조직으로부터 PCV-2의 핵산은 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 즉, PMWS가 의심되는 야외 돼지의 림프절, 폐장, 편도, 비장 및 간 등의 조직을 얼리고 녹이는 과정을 3회 실시한 후 멸균된 막자사발과 막자를 사용하여 유체로 만들었다. 유제한 조직은 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER)를 이용하여 제조사의 순서에 따라 핵산을 추출한 후 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 중합효소연쇄반응

#### (Polymerase chain reaction, PCR)

PMWS가 의심되는 돼지 조직으로부터 PCV-2의 존재여부를 확인하기 위하여 PCV-2에 특이적인 primer를 이용하여 PCR법으로 유전자를 증폭하였다. Primer는 Genbank의 data를 기초로 Table 1에서와 같이 제작하였다.

PCR은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 즉, 추출한 DNA 샘플 10 $\mu$ l에 10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l, forward primer 1.5 $\mu$ l, reverse primer 1.5 $\mu$ l, Taq DNA polymerase (5U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l를 넣어 전체 반응용량 50 $\mu$ l를 pre-PCR (95 $^{\circ}$ C, 12 min), PCR (denaturation 95 $^{\circ}$ C/20 sec, annealing 56 $^{\circ}$ C/20 sec, extension 72 $^{\circ}$ C/45 sec, 42 cycles), 그리고 post-PCR (72 $^{\circ}$ C, 10 min)을 핵산증폭기(MJ PTC-100 Thermal cycler, PharmaTech Inc.)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 유전자 크기는 100 bp ladder (JBI)를 같이 전기영동하여 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers for PCR

Genes	Sequences (5'→3')	positions	Fragment length (bp)
PCV-2	+sense: GGT TTGTAGCCTCAGCCAAAGC	172-193	416
	-sense: GCACCTTCGGATATACTGTCAAGG	587-564	

## 결 과

### 간접형광항체법에 의한 PCV-2 확인

PCV-2에 특이적인 단크론항체를 사용하여 간접형광항체법으로 확인한 결과 PMWS 증상이 의심된 돼지 조직에서만 강한 형광이 관찰되었다 (Fig 1B).

### PCV-2 검출을 위한 PCR법의 확립

IIFA를 통해 PCV-2의 감염유무가 확인된 야외 돼지 조직에서 PCV-2의 유전자를 검출

할 수 있는 PCR법을 확립하였다. PCV-2에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 PCV-2 양성조직 (국립수의과학검역원 제공)과 IIFA를 통해 PCV-2의 감염이 확인된 조직에서 416bp 크기의 band가 확인되었다 (Fig 2). 그러나 IIFA에서 PCV-2 음성으로 확인된 조직으로부터 추출한 DNA에서는 PCV-2 특이 band를 확인할 수 없었다 (Fig 2, lane 1).

또한 PCV-2 감염이 확인된 야외돼지로부터 혈액 및 각각의 실질장기에서 DNA를 추출하여 증폭한 결과 모든 시료에서 PCV-2 특이 band가 확인되었다 (Fig 3).

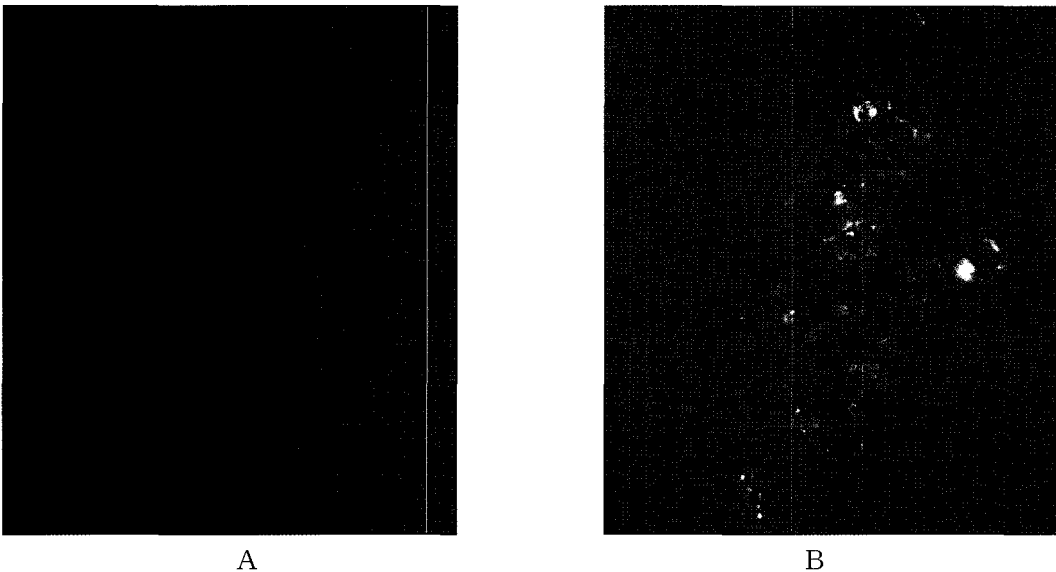


Fig 1. Confirmation of PCV-2 infection by indirect immunofluorescence (IIF) test using PCV-2 specific monoclonal antibodies. (× 400)  
Normal (A) and PMWS suspected (B) field samples were reacted with PCV-2 specific monoclonal antibody.

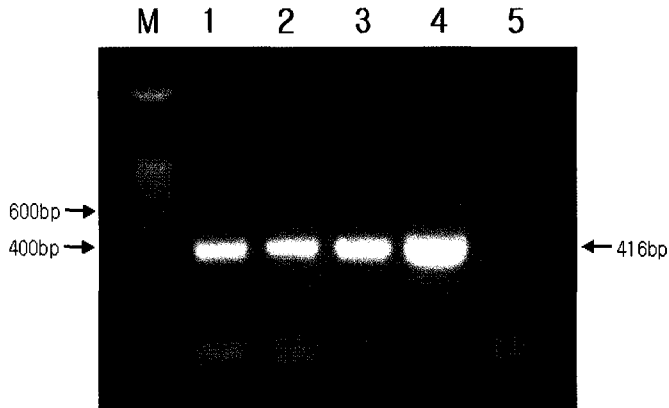


Fig 2. Detection of PCV-2 by PCR from lung tissues of pigs. Five samples have been amplified with PCV-2 specific primers.  
 Lane M : 100 bp DNA ladder, Lane 1-3 : PMWS suspected field samples  
 Lane 4 : PCV-2 positive sample, Lane 5 : PCV-2 free sample

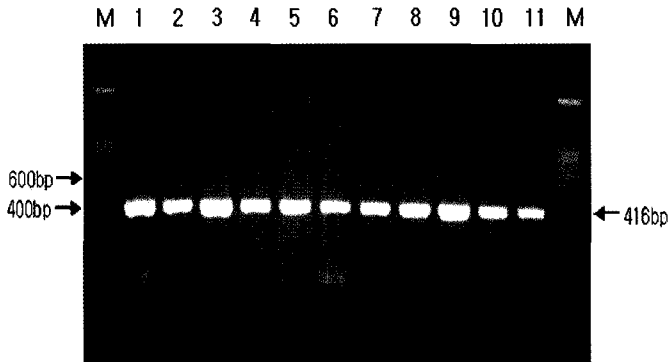


Fig 3. PCR products of PCV genomic DNA extracted from infected porcine tissues. The presence of PCV-2 antigen in the porcine lymph nodes was confirmed by IIF with PCV-2 specific monoclonal antibodies.  
 Lane M : 100 bp DNA ladder, Lane 1-11 represent blood, tonsil, lymph node, trachea, heart, lung, liver, spleen, intestine, kidney and WBC, respectively.

## 고 찰

최근에 발육불량 및 호흡곤란 등을 주요증상으로 하는 PMWS가 양돈산업에 있어 중요한 질병으로 알려져 오면서 이 질병의 원인에 대한 연구가 활발히 진행되어 온 가운데

PCV-2가 PMWS를 일으키는 주요 원인으로 밝혀졌다<sup>15, 18)</sup>.

Krakowka 등<sup>19)</sup>의 연구에 따르면 무균돼지에서 PCV-2만으로는 PMWS 증상을 발현시키지는 못하지만 PCV-2가 PMWS에 있어 필수적이고 일차적인 면역억제 요인으로 작

용하여 다른 바이러스나 세균 등의 이차적인 감염을 증강시키는 기전으로 작용할지 모른다고 보고하였다.

일반적으로 PCV-2에 감염될 경우 호흡기 질환이 심한 농장에서는 폐사를 증가시키는 경향을 보이며 농장의 잠재성 질병에 따라서 감염연령, 나타나는 증상, 이환율 및 폐사율이 다양하게 나타나고 있어 질병 진단에 있어서도 어려운 실정이다. 이처럼 다양하게 나타나는 PCV-2의 감염 피해를 최소화하기 위해서는 우선적으로 농장내 돈군에 대한 정확한 진단이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 PMWS 증상을 나타내는 야외 돼지 가검물에서 PCV-2를 검출해 낼 수 있는 방법으로 PCR법을 응용하고자 이 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 IIFA를 이용하여 PCV-2 감염 유무를 증명한 돼지 가검물에서 PCV-2에 특이적인 primer를 작성하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 IIFA에서 양성반응을 보인 PCV-2 양성조직과 야외가검물 3개에서 PCV-2 특이 밴드가 확인되었으며 IIFA에서 음성반응을 보인 야외가검물에서는 특이밴드를 확인할 수 없었다. 이 결과는 PMWS 증상을 나타내는 돼지에서 PCV-2가 분리되었다는 Allan과 Ellis<sup>1)</sup>의 연구와 일치한다. 또 본 실험에 사용된 primer는 PCV-2 ORF2 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있게 작성하였는데 이는 ORF2 유전자가 돈군에는 널리 퍼져 있으나 병원성이 없는 PCV-1과 돼지에 병원성을 나타내는 PCV-2에 있어서 65%의 낮은 염기 서열 상동성을 보여 두 바이러스를 구별하는데 중요한 요인으로 알려져 있기 때문이다 (20-22).

그러나 본 연구에서 이용된 PCR법에서 PCV-2가 확인될지라도 PMWS로 성급하게 진단을 내려서는 안된다. 그 이유는 이 바이러스가 건강한 돼지에서도 존재할 수 있기 때문이다. Allan과 Ellis<sup>1)</sup>에 따르면 PMWS를 진단하기 위해서는 위축과 같은 전형적인 임상증상 발현과 특징적인 현미경적 소견, 그 병변내에서 PCV-2를 확인하는 등 이 3가지

기준을 기초로 진단하여야 한다고 보고하였다.

PMWS는 국내에서 발생이 보고된 이후 지속적으로 전파되고 있고 지금도 계속 진행되고 있는 실정이다. 그리고 현재 일부 농장에서는 농장내 돈군의 임상증상과 부검소견만으로 PMWS를 진단하는 오류를 범하고 있다. 이에 본 연구에서 응용된 PCR법이 형광항체 검사, 면역조직화학적 검사와 더불어 PMWS를 정확하게 진단하는데 있어 PCV-2 항원을 검출하는 보조적인 방법으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

PCV-2가 중요한 원인체로 작용하는 PMWS는 최근에 국내는 물론 전세계적으로 양돈산업에 경제적 피해를 초래하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PCV-2를 검출할 수 있는 PCR법을 응용하여 다음의 결과를 얻었다.

PMWS가 의심이 되는 야외 돼지 가검물에서 간접형광항체법을 통해 PCV-2를 확인하였다. 간접형광항체법을 통해 PCV-2가 확인된 야외 돼지 가검물에서 PCV-2에 특이적인 primer를 이용한 PCR법으로 PCV-2를 검출할 수 있었다. 야외 돼지 가검물 중 혈액을 포함한 편도, 간, 심장, 비장 등 실질장기에서 PCV-2 특이밴드를 확인하였다.

## 참고 문헌

1. Allan GM, Ellis JA. 2000. Porcine circoviruses: A review. *J Vet Diagn Invest* 12:3-14.
2. Tischer I, Rasch R, Tochtermann G. 1974. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* 226(2):

- 153-167.
3. Cheung AK. 2003. Transcriptional analysis of porcine circovirus. *J Virol* 305 : 168-180.
  4. Fenaux M, Halbur PG, Gill M, et al. 2000. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38 : 2494-2503.
  5. Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, et al. 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anaemia virus. *Virology* 249(2) : 453-459.
  6. Todd D, Niagro FD, Ritchie BW, et al. 1991. Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes. *Arch. Virol* 117 : 129-135.
  7. Toischer I, Bode L, Apodaca J, et al. 1995. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch Virol* 140 : 1427-1439.
  8. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, et al. 2003. Immunogenicity and pathogenicity of chimeric infectious DNA clones of pathogenic porcine circovirus type 2 (PCV2) and nonpathogenic PCV 1 in weanling pigs. *J Virol* 77(20) : 11232-11243.
  9. Fenaux M, Halbur PG, Haqshenas, et al. 2002. Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: Characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions. *J Virol* 76(2) : 541-551.
  10. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, et al. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J Vet Diagn Invest* 10 : 3-10.
  11. Allan GM, Meehan B, Todd D, et al. 1998. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec* 142 : 467-468.
  12. Choi C, Chae C, Clark EG. 2000. Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: Detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 12 : 151-153.
  13. Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, et al. 1999. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66 : 115-123.
  14. Hamel AL, Lin LL, Sachvie C, et al. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 7 : 5262-5267.
  15. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, et al. 1998. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndrome in pigs. *J Gen Virol* 79 : 2171-2179.
  16. Kim JH, Chung HK, Jung TW, et al. 2002. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea : Prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms. *J Vet Med Sci* 64(1) :

- 57-62.
17. McNeilly F, Kennedy S, Moffett D, et al. 1999. A comparison of *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of a new porcine circovirus in formalin-fixed tissues from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *J Virol Methods* 80 : 2123-2128.
  18. Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, et al. 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Clin Microbiol* 36(9) : 2535-2541.
  19. Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, et al. 2000. Viral, wasting syndrome of swine : Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* 37 : 254-263.
  20. Mahe D, Blanchard P, Truong C, et al. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *J Gen Virol* 81 : 1815-1824.
  21. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, et al. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol* 81 : 2281-2287.
  22. Mager R, Larochelle R, Thibault S, et al. 2000. Experimental transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2) in weaning pigs : a sequential study. *J Comp Pathol* 123 : 258-269.