

## Porcine circovirus에 대한 항체가 조사 및 바이러스 항원 확인

강신석, 박재명, 이종진, 류재윤\*, 최해연

충청북도축산위생연구소 북부지소, 충청북도축산위생연구소 제천지소\*  
(접수 2001. 5. 24, 게재승인 2001. 6. 4.)

### Porcine circovirus: detection of antibodies and virus antigen in Chungbuk area

Shin-Seok Kang, Jae-Myung Park, Jong-Jin Lee, Jae-Yun Ryu\*, Hae-Yeon Choi

Northern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungju, 380-230, Korea  
Caecheon Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute Checheon, 390-090, Korea\*  
(Received 24 May 2001, accepted in revised form 4 June 2001)

#### Abstract

Porcine circoviruses(PCV) are the smallest nonenveloped DNA viruses containing a unique single-stranded circular genome. No recognized link was found between PCV infection of pig and disease. But the PCV consistently identified from postweaning multisystemic wasting syndrome(PMWS) and researches indicate that there are strong relationships between PCV and PMWS. Clinical signs were emaciation, dyspnea, high fever with normal appetite. Necropsy findings showed respiratory disease complex lesion and lymph node anomalies.

An indirect-immunofluorescent antibody procedure was used to assay swine sera for the presence of PCV antibodies. Antibodies against PCV were found in an average of 20% of the samples tested. The PCV DNA was amplified from lymph nodes collected from pigs. PCV specific primers were successfully amplified PCV DNAs.

Further studies are needed to determine the possible role this virus might have in disease.

Key words : Porcine circovirus, Sera, IFA, Detection, PCR

---

Corresponding author : Shin-Seok Kang, Northern Branch, Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungju, 380-230, Korea. Tel) 043-220-5644, Fax) 043-220-5646

## 서 론

Porcine circovirus(PCV)는 Circoviridae과에 속하는 virus로 26년전 pig kidney cell culture (PK-15, ATCC-CCLL33)에 영구적으로 오염된 picornavirus와 같은 것으로 최초로 보고되었다. 그러나 그로부터 8년 후인 1982년 Tischer 등<sup>1)</sup>이 돼지 콩팥세포(PK-15, ATCC-CCLL)로부터 이 바이러스를 분리, 보고하였으며 이후 1995년 국제 바이러스 명명위원회에서 Circoviridae라는 새로운 family로 명명하였으며, 이후 이 바이러스는 PCV라고 불리어지고 있다.

PCV는 DNA 바이러스 중 가장 작은 것으로 직경이 17nm, CsCl 부유밀도가 1.33-1.34이며, 구조유전자는 단쇄의 원형 DNA 1,759 base pair이다<sup>2)</sup>. 또한 산성조건(pH 3.0)이나 chloroform 또는 고온(56°C 및 70°C)에서도 불활화되지 않는 저항성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>.

PCV는 세포증식환의 S phase 동안에 *d*-glucosamine을 처리함으로써 바이러스의 증식이 강화되었으며 PCV를 함유하는 세포의 수가 증가하였다고 보고하였다. PCV는 세포변성효과(CPE)를 일으키지 않기 때문에 배양세포에서 면역염색을 통하여 검출하여야 하며 PK-15에서는 PCV가 지속적으로 감염된다고 알려져 있으며<sup>4)</sup>, 실험적으로 PCV를 돼지에 인공적으로 감염시킨 후 폐포 macrophage의 면역반응에 미치는 영향에서 PCV는 Fc 및 보체 수용체나 탐식작용에는 영향을 미치지 않지만 mitogen-induced lymphocyte proliferation이 감소하는 것으로 보아 PCV감염이 정상적인 면역기능을 저해할 수 있는 것으로 보고하였다<sup>5)</sup>.

임상증상으로는 전염성 선천성 진전증(infectious congenital tremor)과 postweaning multisystemic wasting syndrom(PMWS) 2종의 질병이 PCV감염과 연관이 가장 깊은 것으로 알려져 있다. 선천성 진전증은 경미한 진전에서 심한 진전까지 임상증상이 다양하며 같은 복자일 경우도 증상을 발현하는 경우와 그렇지 않은 경우가 있으며 어떤 경우는 한 복자 전체

가 진전증을 일으키는 경우가 있으며 진전증의 경우는 임상증상으로 쉽게 알 수가 있다. 진전증은 주로 신규로 입식된 어린 번식돈에서 주로 발생하는 경우가 많은 관계로 이러한 번식돈이 임신기간에 PCV에 노출됨으로써 발병하는 것으로 추정된다. Hines 등<sup>6)</sup>은 진전증을 나타낸 돼지로부터 신장세포를 배양하여 PCV를 분리하였으며 분리주를 혈청검사 결과 PCV 음성인 돼지에 인공적으로 접종한 결과 진전증이 나타났으며 PCV를 임신중인 모돈에 접종한 결과 자돈의 대부분에서 진전증을 나타내었다.

PMWS는 주로 6~8주령의 이유자돈에서 나타나지만 드물게는 포유자돈에서도 나타나는데 주요 증상으로는 체중감소로 인한 수척, 호흡축박, 호흡곤란, 황달 등이며, 가끔씩 설사, 기침을, 때로는 중추신경계 장애를 나타내기도 한다. 부검시 전신적인 림프절 종창, 림프절의 출혈 등의 소견들을 볼 수가 있다. 이러한 경우는 이유자돈에서 이환율은 낮은 편이지만 임상증상을 보인 경우에는 폐사율이 약 70%로 높은 편이다<sup>7)</sup>.

혈청학적 조사에서는 독일, 캐나다, 뉴질랜드, 영국, 북아일랜드, 미국 등에서 성돈에 PCV가 광범위하게 감염되어 있음이 확인되었으며 대부분의 돈군에서 20~80%의 항체양성을 보여 PCV가 전세계적으로 전파되어 있을 것으로 추정된다<sup>6,8-11)</sup>. 한국에서는 공식적인 보고는 없으나 약 25~40%가 PCV에 양성을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다.

Allan 등<sup>12)</sup>은 PCV에 감염된 자돈을 정기적으로 혈청을 채취하여 항체를 조사한 결과 모체이행항체는 생후 8~9주령에서 거의 소실되었으나 13~15주령에서 다시 혈중항체가 나타난 것으로 보아 이 시기에 돼지가 PCV에 다시 감염된 것으로 판단된다고 보고하였으며, 돼지 이외에서는 PCV항체를 검출할 수 없다고 하였으나 Tischer 등<sup>13)</sup>은 ELISA법으로 검사한 결과 사람에서 약 30%, 소에서 약 35%가 검출되었다고 보고하였으나 이것은 다른 동물에도 circovirus가 감염된다는 것을 의미하지만 확실하게 증명된 것은 아니다.

충북 충주지역에 구제역 발생 이후 강도 높

은 소독이 실시되고 있음에도 최근에 PMWS 을 동반한 이유자돈의 폐사가 높은 것을 계기로 이 지역에서의 PCV의 항체조사와 바이러스 분리를 통하여 급후 가축질병 관리의 기초자료로 삼고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 간접면역형광염색(Indirect Immunofluorescent staining)

IFA plate 제작 : PCV에 대한 항체검출을 위하여 근본적으로 PCV가 감염되어 있는 PK-15 세포주를 사용하였다. ① 96 well cell culture plates에 PK-15 세포주를 적당량을 분주하고 ② 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 동안 배양한 다음 ③ 세포들이 70% 수준으로 배양되면 Hank's buffer salt solution(HBSS)로 300mM glucosamine을 만들어 각 well당 50 $\mu$ l을 가한 후 30분간 처리하였고 ④ HBSS를 제거한 후 PBS로 2회 세척하였다. ⑤ Earle's MEM을 각 well에 다시 적당량 채워 24시간 이상 배양하였고 ⑥ 차가운 80% 아세톤을 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣어 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 고정시키고 아세톤을 제거한 후 ⑦ 호일에 감아 -20 $^{\circ}$ C 이하에서 보관하였다. 이렇게 제작한 plate는 혈청내의 항체유무 확인실험에 사용하였다.

IFA 검사 방법 : ① 가검혈청의 번호 및 위치를 정확히 기록한 다음 일반 혈청검사용 plate에 가검혈청 10 $\mu$ l와 멸균된 PBS 90 $\mu$ l를 넣어 10배 희석, 혼합하였고 ② 희석된 혈청 100 $\mu$ l를 IFA검사용 plate에 분주하였으며 ③ 양성 대조혈청 및 음성 대조혈청을 각각 100 $\mu$ l씩 접종하였다. ④ 37 $^{\circ}$ C 배양기에 1시간 동안

배양하였고 ⑤ 배양기에서 plate를 꺼낸 후 PBS를 각 well에 300 $\mu$ l씩 첨가하여 세척하였다. 이 과정을 3~5회 반복 실시한 후 세척용액을 완전히 제거한 후 ⑥ 200배로 희석한 anti-swine IgG(whole molecule) FITC conjugate (Sigma, F1638, Lot 68F4828) 용액을 각 well에 50 $\mu$ l씩 분주[접종]한 후 ⑦ 37 $^{\circ}$ C에서 30분-1시간 정치하였으며 ⑧ 배양기에서 꺼낸 후 PBS를 각 well에 300 $\mu$ l씩 첨가하여 3~5회 세척한 다음 용액을 완전히 제거한 후 형광항체 현미경을 이용하여 판독하였다.

### PCR을 통한 바이러스 항원 확인

PCR을 진행하기 위한 재료는 주로 림프조직을 사용하였으며, 대조로는 PK-15를 각각 사용하였다. PCV의 DNA 증폭에는 DNAzol<sup>TM</sup> 방법을 적용하였고, primer는 한국바이오니아에 주문 제작하였다(Table 1).

DNAzol<sup>TM</sup>을 이용한 DNA 추출 : ① 림프조직이나 기타 조직을 eppendroff tube에 넣고 가위로 세절하거나 유발에 넣어 유제로 만들었으며 ② 조직이 전체량의 25~50%가 되도록 적당량 첨가한 후 ③ 9,000g에서 2분간 원심 분리하였다. ④ 상층액을 100 $\mu$ l를 취한 후 ⑤ DNAzol<sup>TM</sup> 1ml를 상층액 100 $\mu$ l에 첨가하였다 ⑥ tube를 반전시킨 후 9,000g에서 10분간 원심분리한 후 ⑦ 상층액 1ml당 100% ethanol 0.5 ml를 첨가하였다. ⑧ tube를 반전시켜 잘 혼합한 다음 실온에 1~3분간 정치하였으며 ⑨ 9,000g에서 10분간 원심분리 후 상층액은 제거하였다. ⑩ 95% ethanol 1ml를 tube에 첨가한 후 tube를 5~6회 반전시켜 현탁시킨 다음 1분 정도 정치시킨 후 1,400g에서 1~2분간 2회 반복 원심 분리하였다. ⑪ 상층액을 제거한 후

Table 1. Primers for detection of swine circovirus antigens from lymph nodes

Name of primer	5'-3' sequences	Reference
PCV com F1	ACCAGCGACCTTCGGCAG	Selection of sequence data
PMWS F2	TGAGTACCTTGTTGGAGAGC	
PCV com R1	GTAATCCTCCGATAGAGAGC	

5~6분 동안 공기 건조시킨 후 ⑫ 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC, Sigma, D5758, Lot 59H3420) 용액으로 8mM NaOH를 제조 (4M NaOH 10ml + DEPC 용액 5ml 첨가). ⑬ 8 mM NaOH 200 $\mu$ l를 tube에 첨가한 후 끓는 물에서 5분간 끓인 다음 ⑭ PCR tube에 옮긴 후 PCR 기기를 작동시켰다.

**PCR tube에 넣는 각 조건 :** PCR master 25  $\mu$ l, DW 18 $\mu$ l, F primer 1 $\mu$ l, R primer 1 $\mu$ l, 추출한 DNA 5 $\mu$ l로 하였다.

**PCR 조건 :** DNA 증폭을 위한 PCR조건은 denaturation 96 $^{\circ}$ C 30초, annealing 54 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 45초로 설정하였고 25회 반복하였다.

## 결 과

충주 및 음성지역 양돈농가에 대한 항체검사 결과는 Table 2에서 보는바와 같이 충주지역에서는 모든, 포유자돈, 이유자돈, 비육돈에서 각각 17.4%, 31.4%, 26.8%, 16%의 양성율을 나타냈으며, 음성지역에서는 15%, 43.6%, 11.6%, 0%로 각각 나타나 연령이 낮은 포유자돈에서 가장 높은 양성율을 나타냈다.

PK-15 세포주에서 PCV를 확인하기 위하여 IFA를 실시한 바 특이한 면역형광반응을 보였다 (Fig 1). PCV 양성반응은 핵 주변 가장자리에서 특이한 과립모양의 형광을 보였다.

PCR법으로 PK-15 세포주에서 primer 5' prime 886 bp가 증폭되었으며, 림프절에서도 886

Table 2. Distributions of antibodies to PCV using IFA

Area	Distribution of antibody	Sow	Suckling pig	Weanling pig	Fattening pig	Total
Chungju (41 farms)	No of examined	242	264	302	1,190	1,998
	No of positive	42	83	81	192	398
	(%)	(17.4)	(31.4)	(26.8)	(16)	(20)
Eumseong (3 farms)	No of examined	20	39	43	19	121
	No of positive	3	17	5	0	25
	(%)	(15)	(43.6)	(11.6)	(0)	(20.7)

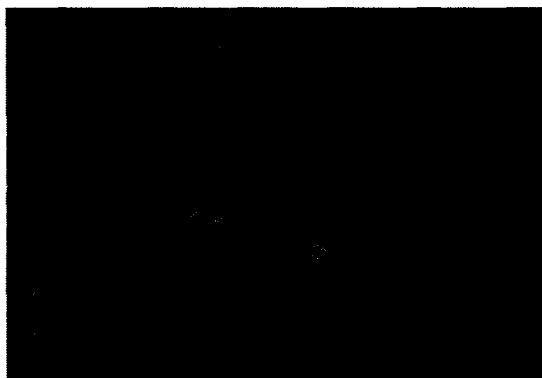


Fig 1. PCV viral antigen was detected by indirect immunofluorescent stain from PK-15 cells using polyclonal antibodies to PCV.

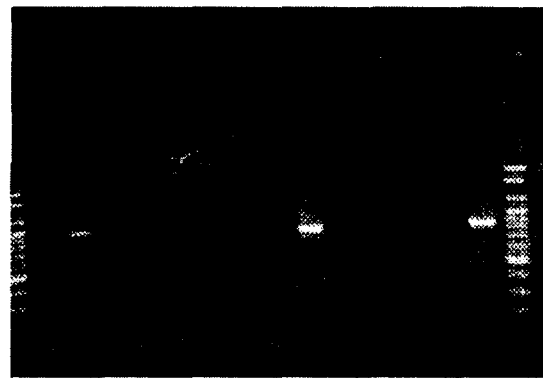


Fig 2. PCR product from PK-15 cells and lymph nodes collected from pig.

bp의 PCV 밴드가 확인되어 우리 나라에서도 circovirus가 존재함을 알 수 있었다(Fig 2).

## 고 찰

최근까지 우리나라에서는 PCV와 관련된 질병은 확인되지 않았으며, PMWS 및 선천성 진전증에서 지속적으로 분리되고 있는 PCV는 병인학적으로 논쟁의 대상이 되고 있지만 PCV가 이러한 질병의 원인체라고 확정할 만한 확증은 아직 없는 상태이다. 그러나 PCV가 PMWS와 선천성 진전증과의 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되어지고 있다<sup>14-16</sup>.

또한 PCV는 돼지 질병과의 관계를 확실하게 증명할 수 없기 때문에 PCV는 새롭게 발견된 바이러스로 취급되었다. 지금까지 PCV는 비병원성으로 알고 있었기 때문에 PCR기법을 사용하기 전에는 그 존재를 확인할 방법이 없었다. 비록 PCR 기법이 질병과의 상관관계를 확정적으로 증명할 수는 없지만, PCR기법으로 비병원성 바이러스를 검색할 수 있어 비로소 PCV와 다른 질병과의 관계를 확인할 수 있었다. 따라서 PCR기법을 통한 PCV의 항원 확인과 일련의 실험을 통하여 PMWS와 선천성 진전증과의 연관성을 어느 정도 확인할 수 있었다.

본 실험에서의 항체조사에서 PCV에 대한 혈청양성반응을 보인 것이 약 20%이었는데 이는 캐나다, 영국, 미국 등 다른 나라의 조사 결과<sup>9-11,14</sup>) 보다는 다소 낮은 비율이지만 우리나라에도 PCV에 안전하지 않다는 것을 보여주고 있다. 특히 음성지역에서는 포유자돈에서 양성비율이 43.6%로 비교적 높은 수준으로 나타났는데, 이는 조사대상 농장 3곳이 모두 임상증상을 보이는 농장이었으며 이유자돈 뿐만 아니라 포유자돈에서도 임상증상을 보임으로써 PCV가 주로 이유자돈에서 PCV serotype 2로 인하여 PMWS가 발생한다는 주장과는 약간 상이한 것으로 보이며 따라서 PCV는 PMWS 외의 다른 질병을 유발하는 것으로 추정된다. 항체조사에서 비육돈과 모돈에서 보다 포유자돈과 이유자돈에서 양성반응 비율이 높은 편인데 포유자돈의 경우는 모돈의 이행항체 때문에

양성비율이 높아진 것으로 사료되나 이유자돈의 경우는 이행항체가 소실된 시점에서 양성반응이 나타나 이는 이유자돈이 PCV에 감염되어 새로운 항체가 형성된 것으로 추정된다. 이는 곧 면역기능이 제대로 형성되지 않은 시점에 PCV가 감염되었을 경우 혈청형에 관계없이 질병을 야기하는 것으로 추정되며, 농가별 검사에서는 44농가 모두가 낮은 비율이었지만 양성반응을 보였다.

질병과 관련하여 PCV에 대한 효과적인 대책은 아직까지 명확하게 알려져 있지 않다. PCV는 일반적인 소독제, 살균제 등에 불활화되지 않으며 아직까지 효과적인 백신은 개발되지 않은 실정이다. 그렇지만 PCV 감염을 예방하는 것이 불가능한 것만은 아니다. PCV 감염을 방지하려면 첫째 철저한 방역을 통한 위생적인 관리이며, 둘째는 정확하고 신속한 진단으로 감염동물들을 도태시켜 PCV감염으로부터 청정화를 유지하는 것이다. 그러나 동물 수송차량과 외지 농장으로부터의 유입 돼지를 관리하지 못한다면 PCV에 노출 될 것이다. 또한 초기 PCV에 감염된 농장은 비 전형적인 PRRS 증상 및 심한 호흡기 증상을 동반하는 관계로 오진을 할 확률이 상당히 높게 나타날 수도 있다. 실제로 농장조사 예에서도 PCV가 검출되었음에도 불구하고 글래서씨병 및 호흡기 질병으로 오진된 사례가 있었다.

향후 양돈산업의 생산성 향상과 국내 축산업의 경쟁력 확보를 위하여 PCV에 대한 기초조사와 연구가 지속적으로 이루어져야 하며, 이에 대한 투자가 이행되지 않을 경우 3~4년 내에 우리나라 양돈산업에 심각한 영향을 줄뿐만 아니라 양돈농가의 지속적인 소득감소로 연결될 것으로 예상되어 금후 보다 체계적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

충북지역 양돈농가에 대하여 IFA법을 이용한 혈청검사 및 PCR법을 이용한 항원검사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈청검사 결과 총 2,119두 중 423두(20%)

- 에서 양성으로 나타났다.
2. 연령별 항체양성율은 포유자돈에서 33%, 이유자돈에서 24.9%, 모돈에서 17.2%, 비육돈에서 15.9%로 연령이 낮을수록 양성율이 높았다.
  3. 림프절에서 886 bp의 증폭된 항원이 확인됨으로써 porcine circovirus가 관내 양돈 농가에 존재함을 알 수 있었다.

### 참고문헌

1. Allan GM, Ellis JA. 2000. Porcine circoviruses : a review. *J Vet Diagn Invest* 12 : 3~14.
2. Meehan BM, Creelan JL, McNulty MS, et al. 1997. Sequence of porcine circovirus DNA : affinities with plant circoviruses. *J Gen Virol* 78 : 221~227.
3. Allan GM, Phenix KV, Todd D, et al. 1994. Some biological and physico-chemical properties from different species with pig circovirus. *Vet Microbiol* 41 : 267~279.
4. Tischer I, Peters D, Rasch R, et al. 1987. Replication of porcine circovirus-induction by glucosamine and cell-cycle dependence. *Arch Virol* 96 : 39~57.
5. McNeilly F, Allan GM, Foster JC. 1996. Effect of porcine circovirus infection on porcine alveolar macrophage function. *Vet Immunol Immunopathol* 49 : 295~326.
6. Hines RK, Lukert PD. 1994. Porcine circovirus as a cause of congenital tremor in newborn pigs. *Proc Am Assoc Swine Pract* 25 : 344~345.
7. Harding JC. 1996. Post-weaning multisystemic wasting syndrome(PMWS) : preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc West Can Assoc Swine Pract* 58 : 503~504.
8. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W. 1982. A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature* 295 : 64~66.
9. Dulac GC, Afshar A. 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can J Vet Res* 53 : 431~433.
10. Horner G. 1991. Pig circovirus antibodies present in New Zealand pigs. *Surveill Wellington* 54 : 255~258.
11. Edward S, Sands JJ. 1994. Evidence of circovirus infection in British pigs. *Vet Rec* 134 : 680~681.
12. Allan GM, Mackie DP, McNair J, et al. 1994. Production, preliminary characterization and application monoclonal antibodies to porcine circovirus. *Vet Immunol Immunopathol* 43 : 357~371.
13. Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, et al. 1995. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine population of different breeding farms. *Arch Virol* 91 : 271~276.
14. Kennedy S, Allan GM, McNeilly, et al. 1998. Porcine circovirus infection in Northern Ireland. *Vet Rec* 142 : 495~496.
15. Allan GM, Meehan B, Todd D, et al. 1998. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Res* 142 : 467~468.
16. Segales J, Domingo M, Balasch M, et al. 1988. Lesions and distribution of porcine circovirus genome in the liver from post-weaning multisystemic wasting syndrome(PMWS) affected pigs. *Proc 15th IPVS Congress, Birmingham England* : 209.