

## 이유자돈 전신소모성증후군 이환 자돈에서의 바이러스성 원인체 검색 및 porcine circovirus 2 분리동정

박최규\* · 김현수<sup>1</sup>

국립수의과학검역원

<sup>1</sup>충남대학교 수의과대학

(게재승인: 2004년 9월 15일)

## Detection of viral pathogens and isolation of porcine circovirus 2 from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected piglets

Choi-Kyu Park\* and Hyun-Soo Kim<sup>1</sup>

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: September 15, 2004)

**Abstract :** To detect viral agents and isolate porcine circovirus 2 (PCV2), 60 samples of lung and lymph node were collected from 5 to 12 week-old pigs that had showed clinical signs of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). Polymerase chain reactions (PCRs) were conducted to identify the viral pathogens including PCV1, PCV2, porcine parvovirus (PPV) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) that have been considered to be the causal agents of PMWS. Among 60 samples, PCV 2 was detected from 57 samples but no PCV 1 was detected. PRRSV and/or PPV were also detected from 27 (47.4%) samples and 1 (1.8%) sample of these 57 PCV 2-positive samples, respectively. Tissue homogenates were inoculated onto PCV-free PK-15 cell monolayers. Seven isolates were confirmed as PCV 2 by multiplex PCR, indirect immunofluorescence assay, and transmissible electron microscopy. These data suggest that PRRSV is a major cofactors causing PMWS in pigs that were infected with PCV2 in Korea.

**Key words :** postweaning multisystemic wasting syndrome(PMWS), porcine circovirus(PCV), porcine parvovirus(PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV), polymerase chain reaction(PCR)

### 서 론

Porcine circovirus(PCV)는 *Circoviridae*에 속하는 single-stranded, circular DNA 바이러스로서 [20], Tischer 등 [40]이 돼지 신장세포주(PK-15, ATCC-CCL 33)에 오염되어 있는 것을 발견하여 최초로 보고한 이래 여러 연구자들이 혈청학적 검사에서 PCV가 돼지에 광범위하게 감염되어 있음을 확인하였다 [9, 16, 38]. 이후 여러 연구자들이 돼지 신장세포주 유래 PCV를 돼지에 인공감염을 시켰던 바, 돼지의 장기에서 증식은 하나 임상증상은 발현되지 않는다는 사실이 밝혀졌으며 [3, 39], 이는

이 바이러스가 배양세포에서 오랫동안 계대되면서 자연적으로 약독화된 것으로 추정하였다 [21].

1990년대 후반에 이유자돈의 위축 등을 소견으로 하는 전신소모성증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)이 PCV의 감염과 연관이 있다고 보고된 이래 [8], 여러 연구자들에 의해 PMWS 증상을 보이는 자돈에 공통적으로 PCV가 감염되어 있음이 밝혀졌다 [4, 11, 29]. 그러나 PMWS 증상을 보이는 돼지에서 분리된 PCV는 돼지신장세포주에서 분리된 PCV와는 유전적, 항원적 특성이 상이함이 밝혀졌기 때문에 [4, 13, 28, 30] 기존의 돼지 신장세포주에서 분리된 PCV와

\*Corresponding author: Choi-Kyu Park

National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang 430-824, Korea  
[Tel: +82-31-467-1818, Fax: +82-31-467-1739, E-mail: parkck@nvrqs.go.kr]

PMWS 증상을 보이는 돼지에서 분리한 PCV를 구별하여 각각 PCV1과 PCV2로 명명하게 되었다 [28].

PCV2는 PMWS 증상을 나타내는 돼지의 병변에서 공통적으로 증명되어 왔기 때문에 PMWS의 1차적인 원인으로 지목되어 왔다 [21]. 그러나 인공감염시험에서 PCV2의 단독감염 시에는 경미한 PMWS 증상을 나타내었으나 돼지 파코바이러스(porcine parvovirus, PPV)나 돼지생식기호흡기증후군 바이러스(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)를 PCV2와 동시감염시켰을 때에는 PMWS와 거의 유사한 증상을 재현시킬 수 있음을 보고하였다 [12, 17]. 이와 같이 PCV2가 감염되어 PMWS의 임상증상을 유발하기 위해서는 돼지의 면역체계를 자극하는 환경적 요인이나 다른 병인체에 대한 노출이 필요한 것으로 인정되고 있다 [2, 17].

한편, PCV2는 PMWS 외에도 증식성 괴사성 폐렴 (proliferating and necrotizing pneumonia), 모돈의 유산 및 폐사증후군(sow abortion and mortality syndrome), 돼지 피부염 및 신증 증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome) 등 다양한 질병과의 연관성이 제기되고 있어 [1], PCV2의 병원성이나 발병기전을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

우리나라에서도 야외 양돈장에서 PMWS의 발생이 확인되고 있을 뿐만 아니라 PMWS 증상을 보이는 돼지로부터 PCV2의 감염이 확인된 바 있다 [6, 7, 23]. 이러한 PMWS 증례를 대상으로 복합감염 양상을 구명하고 원 인체인 PCV2를 분리하여 그 특성을 구명한다면 질병의 진단, 예방 등의 연구 추진에 도움이 될 수 있다.

따라서 이 연구에서는 국내 양돈장에서 PMWS 임상 증상을 보이는 돼지로부터 PCV2를 분리동정하여 국내 분리주를 확보함과 동시에 PMWS 발병에 관여하는 것으로 알려져 있는 PPV 및 PRRSV의 복합감염실태를 조사하여 PMWS의 발병요인을 구명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

PMWS 병인체 분리 및 검색을 위하여 국립수의과학 검역원에서 1999년 10월부터 2002년 6월까지 국내 60개 양돈장에서 위축과 폐사 등 PMWS의 특이 임상증상을 보이는 이유자돈 60두의 림프절과 폐장을 채취하였고, -70°C에 보관하면서 PCV2 분리 및 PMWS에 관여하는 것으로 알려진 PCV, PPV 및 PRRSV 진단을 위한 PCR 검사재료로 공시하였다.

### 배양세포 및 양성혈청

PCV2를 분리하기 위한 배양세포는 PCR로 PCV가 오염되지 않은 것으로 확인된 돼지 신장세포주(nPK-15 cell)를 선발하여 사용하였으며, 세포배양배지는  $\alpha$ -minimum essential medium( $\alpha$ -MEM, Gibco BRL, USA)에 배지 1 ml 당 penicillin 100 IU, streptomycin 100  $\mu$ g 및 lactalbumin hydrolysate를 0.25% 되게 첨가한 다음, 56°C에서 30분간 비동화한 우태아혈청(fetal calf serum, FCS, Moregate, USA)을 10% 첨가하여 사용하였다. 간접형광 항체법(indirect immunofluorescence assay, IFA)를 위한 양성혈청은 PCR로 PCV1 음성 및 PCV2 양성으로 확인된 PMWS 이환돈의 혈청을 대상으로, PRRSV 및 PPV에 대한 항체가 없는 것을 확인 한 다음, -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)

PMWS 증상을 보이는 돼지의 병변조직에서 PCV, PRRSV 및 PPV의 유전자를 검출하기 위하여 각각의 특이 primer를 제작하여(Table 1) PCR 및 RT-PCR을 실시하였다. PCV를 검출하기 위한 primer는 기존 연구자들 [13, 28]이 발표한 PCV1과 PCV2의 유전자염기서열

**Table 1.** Oligonucleotide primer pairs for the detection of porcine viral pathogens

Pathogens <sup>a</sup>	Primers	Sequences (5'-3')	Sense <sup>b</sup>	Amplicon (bp)
PCV1	npPCKF3	GTGTGCTCGACATTGGTGTG	V	403 bp
	npPCKR3	ACTCGCAGCCATCTTGAAT	C	
PCV2	pPCKF2	CATGGTTACACGGATATTG	V	501 bp
	pPCKR2	CGCACCTTCGGATATACTG	C	
PPV	PPVP2F2	CCATACACACCAGCAGCACC	V	455 bp
	PPVP2R1	ACCTGAGCTGGCCTAATTGC	C	
PRRSV	PORF6F1	GGGGATCCAGAGTTTCAGCGG	V	617 bp
	PORF6R1	GGGAATTCTGGCACAGCTGATTGAC	C	

<sup>a</sup>PCV, porcine circovirus; PPV, porcine parvovirus; PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

<sup>b</sup>V, viral sense; C, complementary sense

(GenBank accession number AF027217 및 U49186)을 참조하여 두 바이러스간에 일치율이 낮은 ORF2 부위로부터 각각의 바이러스에 특이적으로 반응하는 primer pair 2종을 제작하였고, 이를 이용하여 multiplex PCR을 실시하였다. PPV의 경우, PPV의 VP2 유전자 염기서열로부터 제작되어 그 특이성이 확인된 PPVP2F2/R1 primer pair를 PCR에 이용하였고 [33], PRRSV는 ORF6 부위에서 제작되어 그 특이성이 확인된 PORF6F1/R1 primer pair를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다 [24].

PCR을 위한 DNA 또는 RNA 추출은 glass fiber filtered column(AccuPrep genomic DNA Extraction kit 및 Tissue RNA premate reagent(Bioneer, Korea)을 이용하여 조직 유제액에서 DNA 및 RNA를 추출하였다.

각 바이러스별 PCR 반응은 PCV의 경우 병변조직으로부터 추출한 DNA 10 µl와 각 primer 1 µl(100 pmol)를 PCR premix(AccuPower PCR Premix, Bioneer, Korea)에 첨가하고 94°C에서 5분 반응시켰고, 94°C에 1분, 55°C에 1분 및 72°C에 2분씩 30회 반복 반응시킨 다음, 최종 72°C에서 10분 반응시켰다. PPV는 PCV와 동일한 방법으로 추출한 DNA시료와 primer를 PCR premix에 첨가하여 94°C에서 5분 반응시켰고, 94°C에 30초, 53°C에 30초 및 72°C에 50초씩 30회 반복 반응시킨 다음, 최종 72°C에서 10분 반응시켰다. PRRSV의 경우, 추출한 RNA 시료와 primer를 RT-PCR mixture(OneStep RT-PCR kit, Qiagen, USA)에 첨가하여 57°C에서 10분 처리시킨 다음, cDNA의 합성을 위하여 42°C에서 60분 반응시켰다. 이후 94°C에서 5분 반응시킨 다음, 94°C에 30초, 53°C에 30초 및 72°C에 50초씩 30회 반복 반응시킨 후 최종 72°C에서 10분 반응시켰다.

PCR 반응이 완료된 후, 각 반응액 10 µl를 취하여 1.5% agarose gel 전기영동을 실시한 다음, ethidium bromide 용액(0.5 µg/ml in DW)으로 염색하여 자외선 하에서 특이 band 유무를 관찰하였다 [34].

### 바이러스 분리동정

PCR 검사결과, PCV2의 단독감염이 확인된 시료를 바이러스 분리에 공시하였다. 시료의 전처리 및 분리과정은 이전 연구자들의 방법을 준용하였다 [4, 29, 40]. 폐 및 림프절 조직에 항생제 함유 α-MEM(Gibco BRL, USA)을 첨가하여 유제하고, 유제액을 초음파 파쇄기로 20 kHz에서 4초 처리한 다음, 저속원심분리(2,000×g, 10분)하여 얻어진 상층액을 다시 고속원심분리(8,000×g, 4°C, 20분)하여 상층액을 회수하였다. 이 상층액에 동량의 프레온을 첨가하여 1분 교반한 다음, 원심분리(3,000×g, 15분)하여 얻어진 상층액을 다시 원심분리(10,000×g, 3분)한 후에 0.2 µm filter로 여과하여 배양세

포 접종액으로 사용하였다. 세포단층이 50% 정도 형성된 nPK-15 cell에 위의 접종액 2 ml를 접종하고 37°C에서 90분간 흡착시킨 다음, 10% FCS 함유 α-MEM 20 ml를 첨가하여 37°C에서 18시간 배양하였다. 인산완충액(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 2회 세척한 다음, 300 mM D-glucosamine이 함유된 α-MEM을 세포단층이 적셔지도록 첨가하여 37°C에서 30분간 처리하였고, 처리 즉시 PBS로 세척한 다음, 10% FCS 함유 α-MEM 배지를 첨가한 후 2일 간 배양하였다. 동일한 방법으로 5대 맹목계대한 다음, IFA로 감염세포를 확인하고 PCR과 전자현미경으로 바이러스를 최종 확인하였다.

### 간접형광항체법

감염세포에서 바이러스 항원을 확인하기 위한 IFA는 Morozov 등 [29]의 방법을 준용하였다. nPK-15 cell에 5대 맹목계대한 바이러스 감염세포를 12-well 조직배양 플레이트에 옮겨 24시간 배양한 다음, PBS로 세척하고 냉장 메탄올을 첨가하여 10분 동안 세포를 고정하였다. 고정 세포에 PBS로 10배 희석한 양성혈청을 첨가하여 37°C의 습상에서 1시간 동안 반응시킨 다음, PBS로 200배 희석한 형광표지 2차항체(FITC-conjugated goat anti-swine IgG, Cappel, USA)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PBS로 3회 세척하고 용액을 완전히 제거한 다음, 형광현미경하에서 특이 형광세포의 존재를 확인하였다.

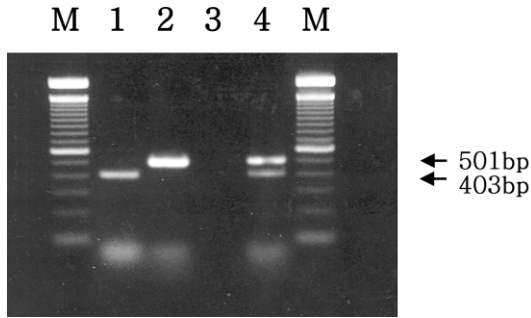
### 전자현미경 관찰

배양세포에 감염된 바이러스를 확인하기 위한 전자현미경 관찰은 Onuki 등 [31]와 Ellis 등 [10]의 방법을 준용하였다. 배양 플라스크로부터 회수한 감염세포를 원심분리(2,000×g, 10분)하여 수거한 다음, 최초용량 대비 1/5 용량의 증류수에 현탁하였다. 현탁액을 4초간 초음파 파쇄한 후 동량의 프레온을 첨가하여 추출하고, 원심분리(15,000×g, 10분)하여 상층액 100 µl를 취해 50 µl의 10%(w/v) sucrose cushion에 올려 초원심분리(90,700×g, 11분)하였다. 회수된 최종 펠렛을 1방울(약 50 µl)의 증류수에 현탁하여 carbon-coated formvar(0.3%) grid에 점적한 다음 30초간 정치하였다. Grid에서 과도한 용액을 제거하고 공기건조시킨 후 PBS(pH 7.4)로 희석한 0.5% phosphotungstic acid 용액으로 염색한 다음, 투과 전자현미경(H-7100FA, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

## 결 과

### PCR을 이용한 PCV, PPV 및 PRRSV 검색

Multiplex PCR로 PCV1 및 PCV2를 감별진단하기 위



**Fig. 1.** Electrophoretic profiles of DNA amplicons obtained by multiplex PCR for the differential diagnosis of porcine circovirus 1 (PCV1) and PCV2. The lanes M, 1, 2, 3 and 4 represent 100 base pair DNA ladder, PK-15 cells contaminated with PCV1, tissue of pig affected with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), PCV-free nPK-15 cells, and mixture of PCV1-contaminated PK-15 cells and tissue sample of pig with PMWS, respectively.

하여 두 바이러스 간 유전자염기서열의 상동성이 낮은 ORF2 유전자 부위로부터 각 바이러스 유전자를 특이적으로 증폭할 수 primer pair 2종을 선발, 제작하였다(Table 1). 제작된 primer의 특이성을 확인하기 위하여 PCV1의 오염이 확인된 PK-15 cell과 PCV-free nPK-15 cell 및 PMWS 감염자돈의 장기시료를 대상으로 multiplex PCR을 실시한 결과, 의도한 바와 같이 각각의 primer에 의해 PCV1(403 bp) 및 PCV2(501 bp)의 유전자가 특이적으로 증폭됨이 확인되었다(Fig. 1).

공시시료 60점을 대상으로 확립된 multiplex PCR을 실시한 결과, 57점의 시료에서 PCV2가 검출되었으나, PCV1은 60점의 시료 모두에서 검출이 되지 않았다(Table 2). PCV1 및 2가 검출되지 않은 나머지 3점의 시료에 대한 병성감정결과, 각각 부종병, 호흡기복합감염증 및 살모넬라감염증으로 확인되었다. PCV2가 확인된 시료에 대한 PPV 및 PRRSV의 복합감염 여부를 조사하기 위하여 PPV 및 PRRSV 특이 primer(Table 1)를 이용하여 PCR 및 RT-PCR을 실시한 후 그 결과를 확인하였다(Fig. 2). PCV2 양성인 57점의 시료 중 PPV 1점 및 PRRSV 27점(47.4%)이 양성으로 확인되었으며, PCV2와 PRRSV의 복합감염율은 연도별로 1999년 20.0%(1/5), 2000년 50.0%(3/6), 2001년 45.5%(10/22) 및 2002년 54.2%(13/24)로 증가하는 경향을 나타내었다(Table 2).

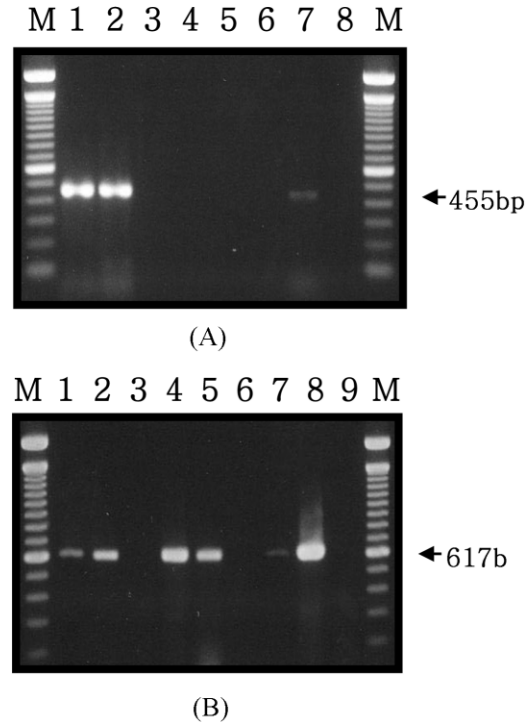
#### 바이러스 분리동정

PCR 검사를 통하여 PCV2 단독감염이 확인된 시료 29점을 공시하여 PCV2 분리동정을 실시한 결과, 7개 시

**Table 2.** Detection of viral pathogens from postweaning multisystemic wasting syndrome suspected pigs by PCR

Years	No. of pigs	Viral pathogens <sup>a</sup>			
		PCV1	PCV2	PCV2 +PPV	PCV2 +PRRSV
1999	5	0	4	0	1
2000	7	0	2	1	3
2001	23	0	12	0	10
2002	24	0	11	0	13
Total	60	0	29	1	27

<sup>a</sup>PCV, porcine circovirus; PPV, porcine parvovirus; PRRSV, porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

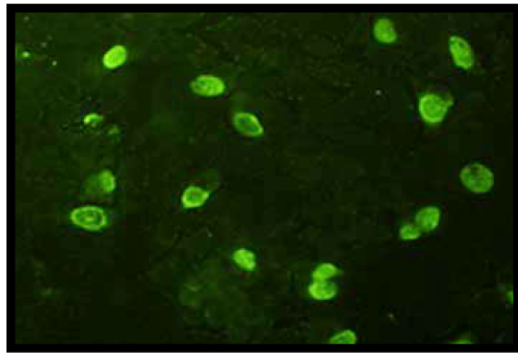


**Fig. 2.** (A) PCR for the detection of porcine parvovirus. The lanes M and 1, 2, 3, 4~8, indicate 100 bp DNA ladder, PPV NADL strain, PPV Korean isolate, mock-infected swine testicle cell and tissues from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs, respectively. (B) RT-PCR for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. The lanes M and 1, 2, 3, 4~9 represent 100 bp DNA ladder, PRRSV VR2332 strain, PRRSV PL96-1 Korean isolate, mock-infected MA-104 cell, tissues from postweaning multisystemic wasting syndrome-suspected pigs, respectively.

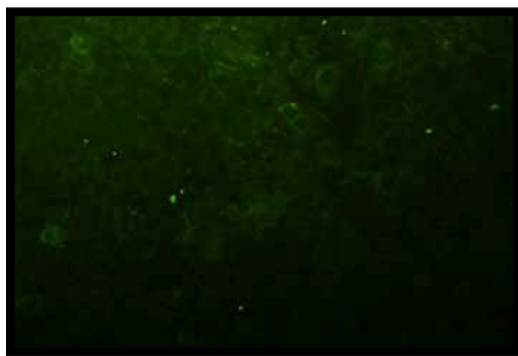
**Table 3.** Isolation of porcine circovirus 2 from tissue homogenates of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs

Year collected	No. of sample	No. <sup>a</sup> of isolate	Name of isolate
1999	4	1	PCK9901
2000	2	1	PCK2K01
2001	12	2	PCK0101, 2
2002	11	3	PCK0201, 2, 3
Total	29	7	

<sup>a</sup>The virus cultures were maintained up to 5th blind-passage on nPK-15 cell monolayers.



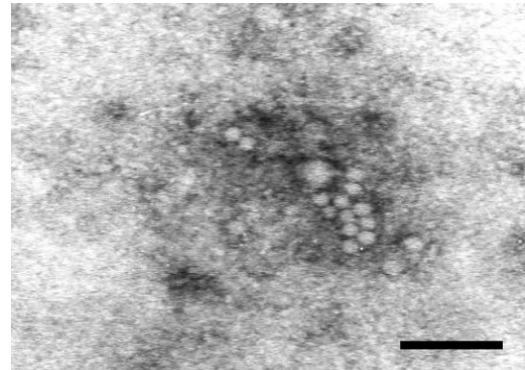
(A)



(B)

**Fig. 3.** Indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of porcine circovirus 2 (PCV2) antigen on PCV2-infected nPK-15 cell monolayers inoculated with tissue homogenate containing PCV2 (A) and mock infected nPK-15 cell control (B). The porcine serum containing PCV2 antibody was used as a primary antibody.

료 접종세포가 5대까지 양호하게 배양되었다(Table 3). 최종 5대 계대배양 후 감염세포를 수거하여 PCR 검사를 실시한 결과, 7개 세포에서 모두 PCV2가 확인되었



**Fig. 4.** Electron micrograph of porcine circovirus 2 (PCV2) field isolate. nPK-15 cell monolayers were infected with tissue homogenate of PMWS-affected pig. The cells were sonicated and the lysates were negatively stained with 0.5% phosphotungstic acid. Bar = 100 nm.

으며, 동 감염세포를 12-well 조직배양 plate에 배양, 고정하여 IFA를 실시한 결과에서도 7개 감염세포에서 모두 PCV2 특이항원을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 감염세포에서 바이러스를 정제하여 전자현미경으로 관찰한 결과, 직경 17 nm 정도의 원형의 PCV 바이러스 입자가 확인되었다(Fig. 4).

### 고 찰

PMWS는 1991년 캐나다에서 처음 보고된 이후 [8, 14], 현재 전 세계적으로 발병이 확인되고 있는 돼지의 새로운 질병증후군이다 [1]. PMWS의 발병기전은 아직 명확하지 않으나 PMWS 증상을 보이는 자돈에서 PCV2의 감염이 공통적으로 확인됨으로써 PCV2는 PMWS 발병의 1차적인 원인체로 지목되고 있다 [4, 11, 29].

국내 양돈장에서 PMWS 증상을 보이는 돼지를 대상으로 임상관찰 및 병리조직학적 검사를 실시한 결과, 위축, 호흡기증상 및 전신 림프절의 종대 등을 확인할 수 있었으며, 이는 이전의 연구자들이 보고한 PMWS의 전형적인 임상증상, 병리해부학적 및 병리조직학적 소견과 일치하였다 [8, 10, 29, 30].

발병돈의 병변조직에서 PCV1과 PCV2를 감별진단하기 위하여 multiplex PCR 진단법을 확립하였으며, 이 진단법을 이용하여 PCV1 오염 PK15-cell 및 PCV2 감염 시료를 대상으로 multiplex PCR을 실시한 결과, 단독 및 복합시료에서 PCV1(401 bp) 및 PCV2(503 bp)의 특이적인 PCR 증폭산물이 확인되어(Fig. 1), 감별진단이 가능함이 확인되었다.

이렇게 확립된 multiplex PCR을 이용하여 PWMS 발

병돈으로부터 채취한 60점의 시료에 대하여 PCV1 및 PCV2의 유전자를 검출한 결과, PCV1은 검출되지 않았으나 PCV2는 3두를 제외한 57두에서 검출되어 PCV2가 PMWS의 1차적인 원인체임을 재확인할 수 있었다 (Table 2).

Larochelle 등 [18]은 PCV 양성인 42개의 조직시료에 대해 multiplex PCR로 재검사한 결과, 40개 및 1개 시료에서 PCV2 및 PCV1이 각각 단독으로 검출되었고, 나머지 1개 시료에서는 PCV2와 PCV1이 동시에 검출되었으며, PCV2가 단독으로 검출된 시료는 모두 전형적인 PMWS 증상을 보인 경우였으나, PCV1이 단독 검출된 시료는 PMWS의 임상증상이나 조직학적 병변을 보이지 않은 경우였다고 보고한 바 있다. 이 연구에서 공시한 시료들은 PMWS로 의심되는 돼지로부터 채취한 것으로서 공시시료에서 PCV1이 검출되지 않고 PCV2만 검출된 것은 Larochelle 등 [18]의 보고와 일치하였다. 그러나 Ouardani 등 [32]은 5.7%의 낮은 비율이지만 PMWS 발병돈에서 PCV1이 검출된다고 보고하고 있어 국내에도 PCV1이 PMWS 발병돈에서 검출될 가능성을 배제할 수 없으므로 향후 더 많은 시료에 대한 검사가 필요할 것으로 생각된다.

공시한 60점의 시료중 PCV2가 검출되지 않은 3점의 시료는 병성감정 결과, 각각 대장균감염에 의한 부종병, 호흡기복합감염증 및 살모넬라감염증으로 진단되어 PMWS의 진단 시에 이들 질병과의 감별진단이 필요한 것으로 생각된다.

현재 PCV2가 PMWS의 1차적인 원인체로 보고되고 있으나 [1], PCV2를 단독감염시킬 경우에는 PMWS의 전형적인 증상이 재현되지 않았으며 [2], PCV2가 감염된 경우에도 PMWS 증상을 나타내지 않는 준임상형이 야외에서 증가하고 있어 [27, 42] PMWS의 발병기전에 있어 PCV2의 감염 이외에도 자돈의 면역체계를 자극하는 환경적 요인들이나 PPV나 PRRSV와 같은 다른 병원체에 대한 노출 등이 관여하고 있는 것으로 보고되고 있다 [2, 17].

따라서 본 논문에서는 PCV2 이외에 타 병원체가 PMWS 발병에 어느 정도 관여하는지를 알아보기 위하여 PCV2 감염이 확인된 PMWS 발병돈의 시료를 대상으로 PPV와 PRRSV의 중복감염상황을 PCR로 조사한 결과, PCV2 양성으로 확인된 57점의 시료 중 PPV가 1점, PRRSV가 27점 양성으로 확인되어 각각 1.8% 및 47.4%의 중복감염율을 나타내었다. 이는 미국에서 PMWS로 진단된 예의 60% 이상이 PCV2와 PRRSV의 중복감염이었다는 보고 [35]와 캐나다에서 PMWS 예의 약 20%에서 부검소견상 PCV2와 PRRSV가 중복 감염되었으며, 또한 PCV2 감염돈의 약 20%가 PPV와

중복감염되었다는 보고 [12]와 중복감염율에서는 차이가 있으나 중복감염 원인체에 있어서는 동일하였다. 이는 국내에서 이를 조사한 Lyoo 등 [22]의 보고와도 일치하는 것으로써 국내의 PMWS 발병예에서 PRRSV가 상당 수준 관여하고 있음을 확인할 수 있었다.

한편, 본 연구에서는 PCV2와 주된 중복감염 병원체인 PRRSV와의 연도별 중복감염추이를 조사한 결과, PCV2와 PRRSV의 중복감염은 2000년 45%(10/22), 2001년 54%(13/24)로 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 Lyoo 등 [22]이 1998년과 2000년 사이에 수집된 호흡기 증상을 나타내는 돼지 86두의 장기 유체액을 대상으로 PCV2, PRRSV 및 PPV의 감염상황을 조사한 결과, PCV2와 PRRSV의 중복감염이 98년에는 12%(3/25), 2000년에는 37%(10/27)이었다는 보고와 같이 최근 들어 이들 두 바이러스의 중복감염이 증가하는 경향을 나타내었다.

본 연구에서 PCV2와 PPV의 중복감염 예가 57건 중 1건으로써 Choi와 Chae [7]가 보고한 40%(4/10두)나 Ellis 등 [12]이 보고한 20%의 중복감염율에 비해서는 매우 낮은 수준이었다. 그러나 본 연구에서 조사한 결과와 Lyoo 등 [22]이 조사한 PCV2와 PPV의 중복감염이 3.5%(3/86)라는 보고와는 일치하고 있어 국내 PMWS 발생 예에서의 PCV2와 PPV의 중복감염은 미미한 것으로 판단된다.

PCV2 단독감염이 확인된 29개 시료를 공시하여 바이러스 분리동정을 실시한 결과, 7개의 시료에서 PCV2가 분리되어 분리율은 매우 저조하였다. 이는 PCV 배양 시에 세포에 감염되는 바이러스의 양을 증가시키기 위해 처리하는 D-glucosamine-HCl 용액이 배양세포에 독성을 가지기 때문에 세심한 주의가 필요하다고 한 Tischer 등 [40]의 보고로 보아 분리율의 저조는 배양세포에 대한 glucosamine 처리에 따른 세포독성의 영향 때문인 것으로 판단된다. 따라서 향후 분리율을 높이기 위한 대체방법의 개발 등이 필요한 것으로 생각된다.

7개의 감염세포에서 PCV2의 감염을 확인하기 위하여 돼지 양성혈청을 이용하여 IFA를 실시한 결과, 주로 감염세포의 핵 및 세포질에서 특이 형광을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 3), 이는 Morozov 등 [29]이 감염세포에 대하여 검사한 결과와 일치하는 양상을 나타내었다 [27, 29]. 또한 감염세포로부터 정제한 PCV2를 투과전자현미경으로 관찰한 결과, Mankertz 등 [26]과 Stevenson 등 [36]이 보고한 바와 동일한 직경 17 nm인 원형의 PCV 바이러스 입자가 확인되었으며 (Fig. 4), 이 연구에서 개발한 multiplex PCR 방법으로 PCV2를 최종 확인하였다.

본 연구를 통하여 확보한 PCV2 국내 분리주는 향후 PCV2에 진단법 및 예방약 개발 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이며, 분리주에 대한 특성조사 등을 통하여

PMWS의 병원성 규명에 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서 개발, 이용한 multiplex PCR 진단법은 PMWS 감염증의 진단에 있어 PCV1과 2의 감별 진단에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 결 론

1999년 10월부터 2002년 5월까지 국내 60개 양돈장에서부터 이유자돈의 전신소모성증후군(PMWS) 증상을 나타내는 돼지의 장기시료 60점을 수집하였다. 이들 병변조직에 대하여 porcine circovirus 1(PCV1), PCV2, porcine parvovirus(PPV) 및 porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV)에 대한 PCR 검사 결과, 57점에서 PCV2가 확인되었으며, PCV1은 전혀 검출되지 않았다. PCV2가 확인된 57점의 시료 중에서 PPV 또는 PRRSV가 중복감염된 예가 각각 1점(1.8%) 및 27점(47.4%) 검출되었고, 이로 미루어 국내 PMWS 발병에는 PCV2와 PRRSV의 중복감염이 주로 관여하고 있는 것으로 판단된다.

PCV2 단독감염이 확인된 자돈 29두의 병변조직 유제액을 nPK-15 cell 배양 플라스크에 접종하여 분리동정을 시도한 결과, 7개의 접종세포 플라스크가 5대까지 성공적으로 계대되었다. 이들 7개 접종세포에 대하여 간접형광항체법, PCR 및 투과전자현미경으로 PCV2의 감염 및 증식 여부를 확인할 수 있었으며, 확보된 이 PCV2 국내 분리주는 향후 원인체 특성 구명, 진단법 개발 등의 연구에 유용할 것으로 생각된다.

### 참고문헌

1. Allan, G. M. and Ellis, J. A. Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000, **12**, 3-14.
2. Allan, G. M., Kennedy, S., McNeilly, F., Foster, J. C., Ellis, J. A., Krakowka, S. J., Meehan, B. M. and Adair, B. M. Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *J. Comp. Pathol.* 1999, **121**, 1-11.
3. Allan, G. M., McNeilly, F., Cassidy, J. P., Reilly, G. A., Adair, B., Ellis, W. A. and McNulty, M. S. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.* 1995, **44**, 49-64.
4. Allan, G. M., McNeilly, F., Kennedy, S., Daft, B., Clark, E. G., Ellis, J. A., Haines, D. M., Meehan, B. M. and Adair B. M. Isolation of porcine circovirus-

- like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998, **10**, 3-10.
5. Balasch, M., Segales, J., Rosell, C., Domingo, M., Mankertz, A., Urniza, A. and Plana-Duran, J. Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 1999, **121**, 139-148.
6. Choi, C. and Chae, C. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Comp. Pathol.* 1999, **21**, 65-270.
7. Choi, C., Chae, C. and Clark, E. G. Porcine postweaning multi-systemic 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.
8. Clark, E. G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 1997, **28**, 499-501.
9. Dulac, G. C. and Afshar, A. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Can. J. Vet. Res.* 1989, **53**, 431-433.
10. Ellis, J., Hassard, L., Clark, W., Harding, J., Allan, G., Willson, P., Strokappe, J., Martin, K., McNeilly, F., Meehan, B., Todd, D. and Haines, D. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can. Vet. J.* 1998, **39**, 41-51.
11. Ellis, J., Krakowka, S., Lairmore, M., Haines, D., Bratanich, A., Clark, E., Allan, G., Konoby, C., Hassard, L., Meehan, B., Martin, K., Harding, J., Kennedy, S. and McNeilly, F. Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999, **11**, 3-14.
12. Ellis, J. A., Bratanich, A., Clark, E. G., Allan, G., Meehan, B., Haines, D. M., Harding, J., West, K. H., Krakowka, S., Konoby, C., Hassard, L., Martin, K. and McNeilly, F. Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000, **12**, 21-27.
13. Hamel, A. L., Lin, L. L. and Nayar, G. P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J. Virol.* 1998, **72**, 5262-5267.

14. **Harding, J.** Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS): preliminary epidemiology and clinical presentation. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 1997, **28**, 503.
15. **Hines, R. K. and Lukert, D.** Porcine circovirus as a cause of congenital tremors in newborn pigs. *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 1994, **25**, 344-345.
16. **Hines, R. K. and Lukert, D.** Porcine circovirus: A serological survey of swine in the United States. *Swine Health Prod.* 1995, **3**, 71-73.
17. **Krakowka, S., Ellis, J. A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F. and Allan, G.** 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.* 2000, **37**, 254-263.
18. **Larochelle, R., Antaya, M., Morin, M. and Magar, R.** Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol. Methods.* 1999, **80**, 69-75.
19. **LeCann, P., Albina, E., Madec, F., Cariolet, R. and Jestin, A.** Piglet wasting disease. *Vet. Rec.* 1997, **141**, 660.
20. **Lukert, P., de Boer, G. F., Dale, J. L.** The Circoviridae. *In: Murphy, F. A., Fauquet, C. M. and Bishop, D. H. L. Virus Taxonomy. 6th Rep. Int. Committee Taxon. viruses.* pp. 166-168, Vienna: Springer-Verlag, 1995.
21. **Lukert, P. D.** Disease of swine. pp. 119-131, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1999.
22. **Lyoo, K. S., Park, Y. H. and Park, B. K.** 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.
23. **Lyoo, Y. S., Kim, J. H. and Park, C. K.** Identification of porcine circoviruses with genetic variation from lymph nodes collected in pigs with PMWS. *Korean J. Vet. Res.* 1999, **39**, 353-358.
24. **Lyoo, Y. S., Park, C. K. and Lee, C. H.** RT-PCR and nested PCR amplification of the PRRSV genes from boar semen for the rapid and sensitive differential diagnosis. *Korean J. Vet. Res.* 1998, **38**, 77-83.
25. **Madec, F., Eveno, E., Morvan, P., Hamon, L., Blanchard, P., Cariolet, R., Amenna, N., Morvan, H., Truong, C., Mahe, D., Albina, E. and Jestin, A.** Post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms. *Livest. Prod. Sci.* 2000, **63**, 223-233.
26. **Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J. M., LeCann, P., Jestin, A., Segales, J., Chmielewicz, B., Planaduran, J. and Soike, D.** Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 2000, **66**, 65-77.
27. **McNeilly, F., McNair, I., Mackie, D. P., Meehan, B. M., Kennedy, S., Moffett, D., Ellis, J., Krakowka, S. and Allan, G. M.** Production, characterisation and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2. *Arch. Virol.* 2001, **146**, 909-922.
28. **Meehan, B. M., Creelan, J. L., McNulty, M. S. and Todd, D.** Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. *J. Gen. Virol.* 1997, **78**, 221-227.
29. **Morozov, I., Sirinarumit, T., Sorden, S. D., Halbur, P. G., Morgan, M. K., Yoon, K. J. and Paul, P. S.** Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1998, **36**, 2535-2541.
30. **Nayar, G. P., Hamel, A. and Lin, L.** Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can. Vet. J.* 1997, **38**, 385-386.
31. **Onuki, A., Abe, K., Togashi, K., Kawashima, K., Taneichi, A. and Tsunemitsu, H.** Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 1999, **61**, 1119-1123.
32. **Ouardani, M., Wilson, L., Jette, R., Montpetit, C. and Dea, S.** Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1999, **37**, 3917-3924.
33. **Park, C. K., Joo, H. D., Shin, J. H., Kim, J. H., Sohn, H. J., Kim, K. S. and Kang, Y. B.** Annual research report of National Veterinary Research and Quarantine Service (NVRQS) in 1999. NVRQS, Korea. 2000.
34. **Sambrook, J. F., Russell, D. W. and Irwin, N.** *Molecular Cloning: A laboratory Manual.* 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000.
35. **Sorden, S. D., Harms, P. A., Nawagitgul, P., Cavanaugh, D. and Paul, P. S.** 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.



36. **Stevenson, G. W., Kiupel, M., Mittal, S. K. and Kanitz, C. L.** Ultrastructure of porcine circovirus in persistently infected PK-15 cells. *Vet. Pathol.* 1999, **36**, 368-378.
37. **Tischer, I., Bode, L., Apodaca, J., Timm, H., Peters, D., Rasch, R., Pociuli, S. and Gerike, E.** Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle. *Arch. Virol.* 1995, **140**, 1427-1439.
38. **Tischer, I., Bode, L., Peters, D., Pociuli, S. and Germann B.** Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms. *Arch. Virol.* 1995, **140**, 737-743.
39. **Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M. and Griem, W.** Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Arch. Virol.* 1986, **91**, 271-276.
40. **Tischer, I., Peters, D., Rasch, R. and Pociuli, S.** Replication of porcine circovirus: induction by glucosamine and cell cycle dependence. *Arch. Virol.* 1987, **96**, 39-57.
41. **Tischer, I., Rasch, R. and Tochtermann, G.** Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent piglet kidney cell lines. *Zentralbl. Bakteriol. Orig. A.* 1974, **226**, 153-167.
42. **Walker, I. W., Konoby, C. A., Jewhurst, V. A., McNair, I., McNeilly, F., Meehan, B. M., Cottrell, T. S., Ellis, J. A. and Allan, G. M.** 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.