한국가축위생학회지 제32권 제3호(2009)
Korean J Vet Serv 32(3) : 177~187 (2009)

포유자돈에서 돼지써코바이러스 2형이 돼지유행성설사 바이러스 감염에 미치는 영향 I. 혈청학적 결과, 형광항체검사 및 RT-PCR 검사

김 문 · 김영훈 · 한정희*
강원대학교 수의학부(대학)

(접수 2009. 9. 1, 게재승인 2009. 9. 25)

Effects of porcine circovirus type 2 on the pathogenesis of porcine epidemic diarrhoea virus infection in piglets I. Serological result, FA test and RT-PCR

Wen Jin, Yeong-Hun Kim, Jeong-Hee Han*
School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received 1 September 2009, accepted in revised from 25 September 2009)

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of a subsequent infection of PCV2 on piglets with PEDV. The results obtained were as follows: Antibodies against PCV2 and PEDV were detected at 24, 36, 48, 60 and 72h postinfection. And the antibody titers of alone infections with PEDV were gradually reduced and increased from 60 hpi to 72 hpi. Whereas, the antibody titers of dual infections with PCV2 and PEDV were gradually reduced all the time. PEDV antigens were detected at 24, 36, 48, 60 and 72 hpi, being seen almost exclusively in feces and small intestines from PEDV-infected piglets and PCV2-coinfected piglets. The detection rate of PEDV in feces and jejunum tissues by RT-PCR were 94.9% and 91.1% in dual infections and 87.1% and 83.6% in alone infections with PEDV, respectively. In dual infected piglets, significantly more PEDV antigens were detected in the feces and small intestines tissues at 24 hpi ($P<0.05$) than in the same feces and tissues of the alone infected piglets. Thereafter, at 72 hpi significantly more PEDV antigens ($P<0.05$) was detected in the jejunal tissues of the dual infected piglets with than of alone PEDV-infected piglets. The detection rate of PEDV antigen in the duodenum, jejunum and ileum by IFA were 91.3%, 91.3% and 83.3% in dual infected piglets and 75.0%, 83% and 75% in alone infected piglets, respectively. Intense and specific fluorescence signals were more often seen within jejunal villous enterocytes in dual infected piglets than alone infected piglets.

Key words : PEDV, PCV2, Dual infected, Piglets

서 론

PED는 돼지 전염성위장염(TGE)의 병원체와 같은 *Coronaviridae*의 coronavirus에 속하지만 항원성이 상이한 돼지 유행성 설사바이러스(porcine epidemic diarrhea; PEDV)의 감염에 의해 발병하며 어린 자돈뿐만 아니라 육성돈, 비육돈에서도 심한 수양성 설사를 일으키는 급성 바이러스성 장염이다(Chasey와

*Corresponding author: Jeong-Hee Han, Tel. +82-33-250-8691, Fax. +82-33-256-3722, E-mail. hanjh@kangwon.ac.kr

Cartwright, 1978; Pensaert와 DeBouck, 1978; DeBouck과 Pensaert, 1980; Timoney 등, 1988; Pensaert, 1999).

PEDV는 single-stranded positive RNA genome으로 구성되어 직경이 95~190nm이며 표면에는 곤봉모양의 spike를 가지고 있고 다형태이나 주로 구형이다(Pensaert와 DeBouck, 1978). 바이러스 입자는 중앙부위에 불투명한 전자밀도를 보이며, 바이러스 내부구조는 잘 알려져 있지 않으나 아프리카 녹색 원숭이의 신장 세포(Vero cell)에서 증식이 가능하다(Hofmann과 Wyler, 1988; Hofmann과 Wyler, 1989)

돼지 써코바이러스 2형(pocine circovirus 2: PCV2)은 1990년 후반에 캐나다에서 처음으로 발견되어 이유자돈 전신성 소모성증후군(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)을 일으키는 1차적인 원인체로 인식되고 있다(Allan 등, 1998; Allan 등, 1999). PCV2는 돼지 피부염 및 신장증후군(porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS), 호흡기 질병 복합증후군(porcine respiratory disease complex, PRDC) 및 번식장애 등을 포함한 다양한 증후군이나 복합체 질환과 밀접한 관련을 갖고 있다(Rosell 등, 2000; Allan과 Ellis, 2000; West와 Bystrom, 1999). 최근에는 이들 대신으로 porcine circovirus disease (PCVD)를 사용하여 PCV2에 감염되어 질병을 일으킬 경우를 통칭하고 있다(Allan과 Krakowka, 2002). PCV2의 단독감염 시에는 전형적인 증상이 유발되지 않거나 경미한 PCVD 증상을 나타내었으나 PPV나 PRRS를 PCV2와 동시감염시켰 때에는 PCVD와 거의 유사한 증상을 재현시킬 수 있음을 보고하였다(Ellis 등, 2000; Krakowka 등, 2000).

PCV2는 *Circoviridae*로 분류되는 직경 17nm크기에 envelope이 없고 1.76kb의 genome를 보유하고 있는 single stranded DNA바이러스다(McNulty 등, 2000). PCV2는 포유류 바이러스 중 가장 작은 바이러스다(Mankertz 등 1997). PCV2는 2개 중요한 open reading frames (ORFs)으로 구성 되어 있으며 ORF1 (945 nucleotides)은 바이러스 복제에 관여하는 replicase protein을 encoding하고, ORF2 (702 nucleotides)는 면역학적으로 중요한 structural capsid protein을 encoding한다. PCV2의 ORF2 capsid protein은 항원성과 관련이외에 PCV2의 발병 및 병원성과도 관련있는 것으로 추정된다. 이 capsid protein은 면역을 자극하며 백신의 성분으로서 가장 중요하다(Cheung, 2003; Fenaux 등, 2000).

PCV2는 PDNS, PRDC, PNP등 복합증후군와 관련된 동시, perinatal myocarditis, congenital tremors, 육아종성 장염(granulomatous enteritis) 및 괴사성 림프선염(necrotizing lymphadenitis)등의 질환과도 연관 되어있다(Harding, 2004). 최근 포유자돈에서 PEDV와 PCV2의 복합감염이 보고되었고(Hirai와 Nunoya, 2006) 현장 관찰에 의하면 PCV2에 감염된 포유자돈에서 PEDV가 감염시 심각한 설사 양상을 나타내었다. 더불어 PCV2는 포유자돈이 PEDV 감염의 과정과 연관된 것으로 제기하였다(Jung 등. 2006).

국내에서 PCVD와 PED가 많은 피해를 일으키는 것으로 추정되나 이와 관련되어 국내에서 분리된 PEDV와 PCV2를 초유 섭취한 일반돼지에 복합감염시킨 연구는 이루어지지 않고 있다. 따라서 국내에서 분리된 PEDV와 PCV2를 초유를 섭취한 일반 포유자돈에 감염시킨 다음 미생물학적, 병리학적 검사를 통하여 PCV2가 PED에 미치는 영향을 구명하고자 실시하였다.

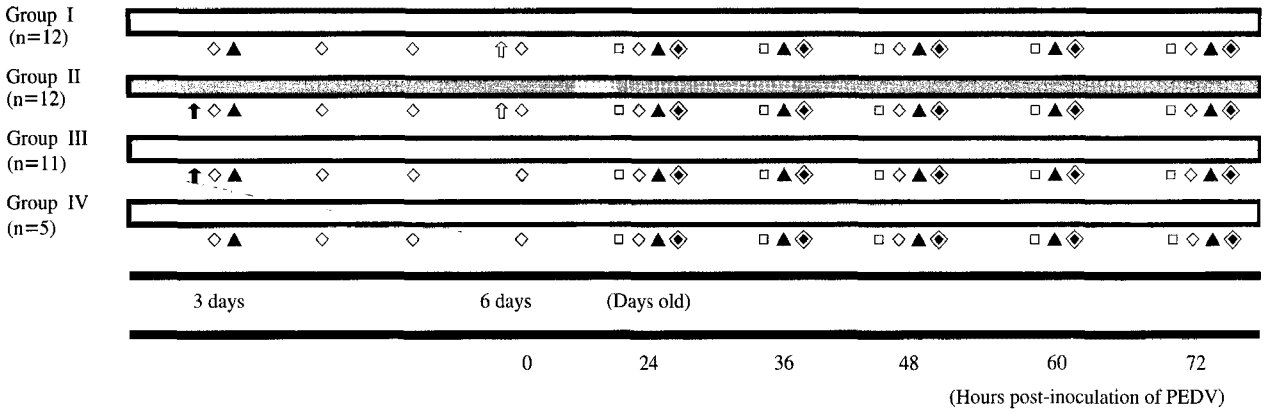
재료 및 방법

PEDV와 PCV2 공격접종

PEDV는 국내에서 분리된 바이러스를 녹십자수의약품주식회사 연구소에서 아프리카원숭이 콩팥세포(Vero cell)를 이용하여 배양한 DR13주(1.5×10^5 $TCID_{50}$/ml)를 분양받아 사용하였고 PCV2는 국내에서 분리된 바이러스를 서울대학교 수의과대학 미생물학교실에서 돼지 신장세포주(nPK-15 cell)를 이용하여 배양한 99R주(10^5 $TCID_{50}$/ml)를 사용하였다.

시험동물 및 시험설계

산차를 고려하여 초유를 섭취한 4복의 포유자돈 40두를 시험동물로 선발하였다. 실험군과 대조군의 포유자돈은 각각의 실험돈방에 넣어 24시간 동안 적응시킨 후 3일령에 공격접종을 실시하였다. 실험군은 4개군으로 구분하여 실험 I, II군은 12두씩, 실험 III와 대조군은 각각 11두, 5두씩 배치하였다. 실험 I군(group I)은 6일령때 PEDV를 2.5ml/두씩 구강 접종한 군, 실험 II군(group II)은 3일령때 PCV2를 2.5ml/두씩 각각 비강 및 근육 접종한 다음 6일령때 PEDV를 2.5ml/두씩 구강 접종한 군, 실험 III군(group III)은 3일령때 PCV2를



Group I : Piglets were challenged with PEDV in 6 days old
Group II : Piglets were challenged with PCV2 in 3 days old followed by PEDV in 6 days old
Group III : Piglets were challenged with PCV2 in 3 days old
Group IV : Piglets were adminstrated with sterile saline in 3 days old
◇ : Administration of dexamethasone from 3 days old every day
⇧ : PEDV challenge ⬆ : PCV2 challenge
▲ : Blood collection □ : Feces collection ◈ : Autopsy

Fig.-Text 1. Schematic draws of experimental design.

2.5ml/두씩 각각 비강 및 근육 접종한 군, 실험 IV군(group IV)은 대조군으로 멸균 생리식염수를 접종한 군으로 구분하였다(Fig.-Text 1). 각 실험군에 3일령때부터 덱사메타손을 3ml/두씩 매일 근육주사 실시하였다. 실험자돈은 PEDV를 공격접종 24시간 후부터 12시간 간격으로 경정맥에서 채혈하였고 항문에서 분변채취 하였다.

PEDV와 PCV2 대한 항체역가 검사

실험대상 자돈의 면역상태를 확인하기 위한 항체역가검사를 위하여 경정맥에서 혈액을 채취하여 응고시킨 후 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 eppendorf tube에 옮긴 다음 56℃에서 30분간 비동화시킨 뒤 사용하였다.

PEDV에 대한 혈청내 항체역가 측정(ELISA)은 각 혈청을 10% skim milk가 함유된 PBS-Tween 20 (0.05%)에 1 : 1,000으로 희석하여, 각각의 바이러스 항원이 코팅된 microwell에 100μl씩 분주한다. 37℃, 1시간 동안 microplate를 정치시킨 다음 각 well안의 혈청을 씻어낸다. HRP-conjugated anti-porcine IgG를 10% skim milk가 함유된 PBS에 1 : 3,000으로 희석하여 100μl씩 각 well에 분주한다. 37℃, 1시간 동안 microplate를 정치시킨 다음, microplate를 PBST로 3회, 5분 간격으로 씻어낸 다음 substrate solution (ABTS)을 100μl씩 각 well에 분주하였다. 상온에서 1시간 동안 microplate를 정치시키고 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution을 50μl씩 각 well에 분주하여 반응을 정지시킨 후 405nm흡광도를 측정하였다.

PCV2에 대한 혈청내 항체역가 측정(ELISA)은 PCV2 ORF2 Mab F을 coating buffer에 부유시켜 microplate에 100μl씩 각각의 well에 분주한 후, 4℃에 overnight하였다. Plate를 꺼내어 PBS~Tween (0.05%)로 5~6회 세척한 후 blocking buffer (1% gelatin)를 200μl를 가한 후에 실온에서 30분동안 정치시켰다. PBST로 5~6회 세척한 후 혈청은 1 : 200으로 희석하여 100μl씩 가한 후 37℃, 30분 동안 반응시켰다. 이후 PBST로 5~6회 다시 세척한 후 conjugate (anti-swine IgG-HRP)를 1:400 으로 희석한 후 100μl씩 분주하여 37℃, 30분 동안 반응시킨 후에 substrate solution (ABTS)를 100μl씩 가한 후 실온에서 30분 동안 반응시키고, stop solution (0.5M HCl)을 50μl씩 각 well에 분주하여 반응을 정지시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

RT-PCR, PCR에 의한 PEDV, PCV2 검출

PEDV 또는 PCV2를 단독 또는 복합감염시켰을 때의 분변, 뇨, 소장, 폐, 간, 비장, 편도 및 림프절 등의 배설물 및 조직을 균질화하여 멸균된 500μl PBS (pH 7.2)에 넣어 충분히 혼합시킨 다음 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하여 −70℃에 보존하여 RT-PCR을 실시하였다.

Primer 합성

PEDV에 대한 oligonucleotide primer는 PEDV의 nucleocapsid gene을 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 forward primer는 5′-ACAAGTCTCGTAACCAG-TCC-3′, reverse primer는 5′-GTATCACCACCATC-AACAGC-3′로 691bp 크기의 fragment가 증폭되도록 설계하였다(류 등, 1997). PCV2에 대한 oligonucleotide primer는 PCV2의 capsid gene을 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 forward primer는 5′-GCTCTCTA-TCGGAGGATTAC-3′, reverse primer는 5′-ACCAGC-GCACTTCGGCAG-3′로 540bp 크기의 fragment가 증폭되도록 설계하였다(Hamel 등, 1998).

RNA, DNA 추출

분변과 소장조직에서 RNA 추출은 RNeasy® Mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하였고 폐장, 간장, 비장, 편도 및 림프절 등의 조직에서 DNA 추출은 DNeasy® Mini kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 실시하였다.

PEDV의 역전사 반응(Reverse transcription; RT)

역전사 반응은 RNA template 5μl, 0.2μM의 1쌍의 reverse primer, diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수 31μl, 10×RT buffer (MBI, Lithuania), 0.2mM dNTPs (MBI), 40unit RNasin (Promega, USA), 2.5mM $MgCl_2$ (Promega)를 첨가하여 65℃에서 10분간 반응시킨 뒤 200unit Molony murine leukemia virus reverse transcriptase (MBI)를 첨가하여 50μl의 반응액으로 42℃에서 1시간, 94℃에서 5분으로 1cycle을 시행하여 cDNA를 합성하였다.

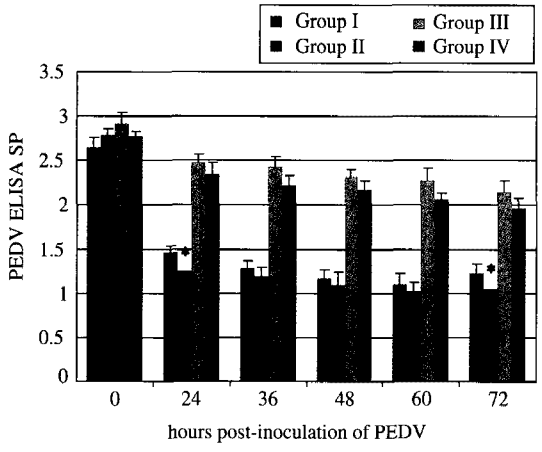
PEDV의 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)

역전사 반응에서 합성된 5μl cDNA에 0.2μM의 primer, 10×PCR buffer, 2.5 unit *Taq* DNA polymerase, 0.2mM dNTPs, 2.5mM $MgCl_2$, 멸균된 증류수 32μl를 첨가한 50μl의 반응액을 95℃ 5분, 52℃ 45초, 72℃ 1분의 반응조건에서 1회 시행한 다음 계속하여 95℃ 45초, 52℃ 45초, 72℃ 1분의 반응조건에서 30회 반복하였고 52℃ 45초, 72℃ 5분간 반응조건에서 1회 시행하였다.

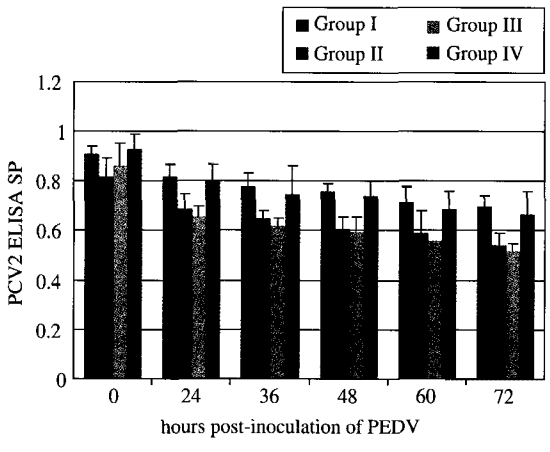
증폭된 PCR산물의 확인은 TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 40mM ehidium bromide용액에서 gel을 염색하여 UV transilluminator (Vilberlourmat, France)로 생성된 band를 확인하였으며, DNA marker로는 100bp DNA ladder (Promega, USA)를 사용하였다.

PCV2의 중합효소 연쇄반응(PCR)

역전사 반응에서 추출된 5μl DNA에 0.2μM의 primer, 10×PCR buffer, 2.5unit *Taq* DNA polymerase, 0.2mM dNTPs, 2.5mM $MgCl_2$, 멸균된 증류수 32μl를 첨가한 50μl의 반응액을 94℃ 5분간 1차 반응시킨 다음, 94℃에 45초, 52℃ 45초, 72℃ 1분씩 30회 반응시킨 후 최종 72℃에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 PCR산물의 확인은 TAE buffer (40mM Tris acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, 40mM ehidium bromide 용액에서 gel을 염색하여 UV transilluminator (Vilberlourmat, France)로 생성된 band를 확인하였으며 DNA



Text-Fig. 2A. Antibody titers against PEDV detected by ELISA.



Text-Fig. 2B. Antibody titers against PCV2 detected by ELISA.

marker로는 100bp DNA ladder (Promega, USA)를 사용하였다.

형광항체검사

실험도중에 폐사하였거나 시간별로 안락사시킨 실험자돈은 부검을 실시하여 십이지장, 공장, 회장의 조직을 10μm 두께로 냉동절편하여 슬라이드에 부착시켜 실온에서 5분간 정치하여 건조시킨 후 냉동아세톤으로 4℃에서 10분 동안 냉장상태로 고정시켰다. PEDV monoclonal antibody (MAb) (국립수의과학검역원 분양)를 첨가하고 37℃의 습상에서 45분간 반응시켰다. 여분의 MAb를 제거하고 PBS (pH 7.2)로 5분간 3회 세척하였다. FITC conjugated anti-mouse IgG(국립수의과학검역원 분양)를 첨가한 다음 37℃의 습상에서 30분 동안 반응시킨 후 PBS (pH 7.2)로 5분간 3회 세척한 다음 mounting media로 처리하여 형광현미경 (Olympus BX50, Japan)으로 검경하였다. 형광반응에 대한 양성반응지수는 박 등(1994)의 방법에 따라 음성은 0, 1~29%의 상피세포에 나타난 것은 1, 30~59%의 상피세포에 나타난 것은 2, 60~100%의 상피세포에 나타난 것은 3으로 구분하여 판정하였으며, 소장의 부위별 평균 양성반응지수는 소장검사재료의 양성반응지수를 더하여 소장검사재료 수로 나누어 표시하였다.

통계학적 처리

실험을 통하여 얻은 결과를 통계학적 유의성 검사는 SAS package (Ver. 6.12, USA)를 이용한 Mann-Whitney U test를 실시하였다.

결 과

국내 양돈산업 뿐만 아니라 전 세계 양돈산업에 있어서 막대한 경제적 손실을 주고 있는 돼지 전신성 질병인 PCV2와 포유자돈 소화기질병인 PEDV과의 상관관계를 구명하고자 감염실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PEDV 및 PCV2에 대한 혈청내 항체역가검사

돼지 써코바이러스가 돼지 유행성 설사에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 PCV2를 공격접종하기전과 7일령에 PEDV를 공격접종 24시간, 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간에 실험군이 각각 2두 혹은 3두를, 대조군 각각 1두를, 시기별로 채혈하여 항체역가를 측정하였다(Text-Fig. 2A and B).

PEDV의 경우, 공격접종 전, PEDV를 공격접종 후 24시간, 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간 PEDV를 공격접종한 실험 I군과 PEDV와 PCV2 혼합 공격 접종한 실험 II군의 평균 혈청항체가는 각각, 공격접종 전에는 2.65±0.11, 2.79±0.07, 공격접종 24시간 후에는 1.47±0.07, 1.25±0.12, 공격접종 36시간 후에는 1.28±0.08, 1.19±0.10, 공격접종 48시간 후에는 1.17±0.09, 1.09±0.15, 공격접종 60시간 후에는 1.09±0.08, 1.03±0.13, 공격접종 72시간 후에는 1.23±0.11, 1.05±0.07이었다. PCV2를 공격접종한 실험 III군과 대조군의 평균 혈청항체가는 각각, 공격접종 전에는 2.92±0.13, 2.77±0.06, 공격접종 24시간 후에는 2.48±0.09, 2.35±0.12, 공격접종 36시간 후에는 2.43±0.11, 2.22±0.11, 공격접종 48시간 후에는 2.32±0.08, 2.18±0.10, 공격접종 60시간 후에는 2.27±0.15, 2.07±0.07, 공격접종 72시간 후에는 2.15±0.13, 1.97±0.11이었다($P<0.05$) (Text-Fig. 2A).

PCV2의 경우, 공격접종 전, PEDV를 공격접종 후 24시간, 36시간, 48시간, 60시간 및 72시간 PEDV와 PCV2 혼합 공격 접종한 실험 II과 PCV2를 공격접종한 실험 III군의 평균 혈청항체가는 각각, 공격접종 전에는 0.82±0.07, 0.86±0.09, 공격접종 24시간 후에는 0.69±0.06, 0.66±0.04, 공격접종 36시간 후에는 0.65±0.05, 0.62±0.06, 공격접종 48시간 후에는 0.61±0.09, 0.60±0.05, 공격접종 60시간 후에는 0.59±0.09, 0.56±0.07, 공격접종 72시간 후에는 0.54±0.05, 0.52±0.03이었다($P<0.05$) (Text-Fig. 2B).

PEDV를 공격접종한 실험 I군은 공격접종 후 24시간에서 PEDV의 항체가가 급격히 저하하였으며 공격접종 후 48시간에서는 공격접종 후 72시간과 비슷한 상태를 유지하였다. PEDV와 PCV2 혼합 공격 접종한 실험 II군은 공격접종 후 24시간에서 PEDV의 항체가가 PEDV를 단독 감염시킨 실험 I군과 비해 서서히 감소하였으며 공격접종 후 공격접종 48시간 후부터 공격접종 72시간 후까지 별다른 변화를 보이지 않았다. PCV2를 공격접종한 실험 III군 및 PEDV와 PCV2 혼합 공격 접종한 실험 II군은 실험시작부터 종료까지 PCV2 평균 혈청항체가 유사하였다.

Table 1. Detection of PEDV from the feces and small intestine of piglets by RT-PCR

Groups	Rectal swabs						Duodenum						Jejunum						Ileum					
	24[b]	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulativ detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulativ detection (%)
Group I[a]	9/12[c]	9/10	7/8	6/6	3/3	34/39[d] (87.1)	1/2[e]	1/2	2/2	3/3	3/3	10/12 (83.3)	1/2	2/2	2/2	3/3	3/3	11/12 (91.6)	1/2	2/2	1/2	3/3	3/3	11/12 (91.6)
Group II	11/12	10/10	8/8	6/6	2/3	37/39 (94.9)	2/2	2/2	2/2	3/3	2/3	11/12 (91.6)	2/2	2/2	2/2	3/3	2/3	11/12 (91.6)	2/2	2/2	2/2	3/3	3/3	12/12 (100)
Group III	0/11	0/9	0/7	0/5	0/3	0/35 (0)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/11 (0)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/11 (0)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/11 (0)
Group IV	0/5	0/4	0/3	0/2	0/1	0/15 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)

[a]Group I: Piglets were challenged with PEDV
Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV
Group III: Piglets were challenged with PCV2
Group IV: Piglets were adminstrated with sterile saline
[b]Hours post-inoculation
[c]No. of feces of piglets detected /No. of total feces of piglets tested
[d]No. of small intestine of piglets detected /No. of total feces of piglets tested
[e]No. of piglets positive/No. of piglets tested

Table 2. Detection of PCV2 from the nasal, rectal, serum and urine of piglets by PCR

Groups	Nasal swabs						Rectal swabs						Serum						Urine					
	24[b]	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulativ detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)
Group I[a]	0/12[d]	0/10	0/8	0/6	0/3	0/12[c] (0)	0/12	0/10	0/8	0/6	0/3	0/12 (0)	0/12	0/10	0/8	0/6	0/3	0/12 (0)	0/12	0/10	0/8	0/6	0/3	0/12 (0)
Group II	3/12	2/10	2/8	1/6	1/3	9/39 (23.0)	2/12	1/10	2/8	1/6	0/3	6/39 (15.3)	1/12	0/10	2/8	0/6	0/3	3/39 (7.6)	0/12	0/10	0/8	0/6	0/3	0/39 (0)
Group III	4/11	2/9	1/7	2/5	1/3	10/35 (28.5)	1/11	2/9	1/7	0/5	1/3	5/35 (14.2)	0/12	0/9	1/7	1/5	0/3	3/35 (8.5)	1/11	0/9	0/7	0/5	0/3	0/35 (0)
Group IV	0/5	0/4	0/3	0/2	0/1	1/5 (0)	0/5	0/4	0/3	0/2	0/1	0/5 (0)	0/5	0/4	0/3	0/2	0/1	0/5 (0)	0/5	0/4	0/3	0/2	0/1	0/5 (0)

[a]Group I: Piglets were challenged with PEDV, Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV, Group III: Piglets were challenged with PCV2, Group IV: Piglets were adminstrated with sterile saline [b]Hours post-inoculation
[c]No. of feces of piglets detected / No. of total feces of piglets tested
[d]No. of pigs positive/No. of piglets tested

RT-PCR 또는 PCR에 의한 PEDV, PCV2 검출

PEDV 또는 PCV2를 단독 또는 복합감염시켰을 때의 분변과 소장에서 PEDV를 검출한 결과는 Table 1과 같다. PEDV를 공격 접종한 실험 I군에서 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 1두의 십이지장, 공장, 회장에서 양성 반응을 보였고 1두는 PEDV가 검출되지 않았다. 36시간 후 2두를 부검시 1두의 십이지장에서 음성 반응 보였고 공장, 회장에서 모두 양성을 보였으며 48시간 후 2두를 부검시 십이지장, 공장 및 회장에서 모두 양성 반응을 보였으며 60시간 후 3두를 부검시 모든 십이지장, 공장 및 회장에서 양성 반응을 보였고, 72시간 후 3두를 부검시 모든 십이지장, 공장 및 회장에서 양성 반응을 보였다. PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군에서 공격접종 24시간, 36시간, 48시간 및 60시간 후 각각 2두, 2두, 2두, 3두를 부검시 모든 십이지장, 공장 및 회장에서 양성 반응을 보였고 72시간 후 3두를 부검시 3두중 1두가 십이지장, 공장에서 음성 반응을 보였고, 회장에서 모두 양성 반응을 보였다.

PEDV를 공격 접종한 실험 I군에서는 총 39예의 분변재료 중 34예에서 PEDV가 검출되어 87.1%의 검출률을 보였으나 PEDV와 PCV2 혼합 공격 접종한 실험 II군에서는 총 39예의 분변재료 중 37예에서 PEDV가 검출되어 94.9%의 검출률을 보였다. PEDV를 공격접종한 실험 I군의 12두 자돈의 십이지장, 공장, 회장조직에서 PEDV에 대한 RT-PCR검사시에 양성율은 각각 83.3%, 91.6%, 91.6%인데 비해 PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군에서는 십이지장, 공장, 회장조직에서 PEDV에 대한 형광항체검사시에 양성율은 각각 91.6%, 91.6%, 100%의 더 높은 것으로 보였다. PCV2를 공격 접종한 실험 III군와 대조군의 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 PEDV가 검출되지 않았다.

PEDV 또는 PCV2를 단독 또는 복합 감염시켰을 때의 비강, 직장, 혈액 및 뇨에서 PCV2를 검출한 결과는 Table 2과 같다. PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군에서는 각각 39 샘플의 비강, 직장 및 혈액재료 중 각각 9예가 검출되어 23%의 검출률을 보였고, 6예가 검출되어 15.3%의 검출률을 보였고, 3예가 검출되어 7.6%의 검출률을 보였다. PCV2 단독 접종한 실험 III군에서는 각각 35예의 비강, 직장 및 혈액재료 중 각각 10예 검출되어 28.5%의 검출률을 보였고, 5에가 검출되어 14.2%의 검출률을 보였고, 3예가 검출되어 8.5%의 검출률을 보였다. 두 실험군의 뇨에서 PCV2는 검출되지 않았다. PEDV, PCV2를 단독 또는 복합감염시켰을 때의 조직에서 PCV2를 검출한 결과는 Table 3과 같다. PEDV와 PCV2 복합 접종군에서는 12예 폐재료 중 4예 검출되어 33.3%의 검출률을 보였고, 12예 소장재료 중 2예 검출되어 16.6%의 검출률을 보였으며 PCV2 단독 접종군에서는 11예 폐재료 중 4예 검출되어 36.3%의 검출률을 보였고 11예 소장재료 중 1예 검출되어 9%의 검출률을 보였으며 편도에서도 1예 검출되어 9%의 검출률을 보였다. 또한 PEDV 단독 접종군과 대조군에서는 모두 PCV2가 검출되지 않았다.

형광항체검사

PEDV 또는 PCV2를 단독 감염 또는 복합 감염시켰을 때의 PEDV에 대한 형광항체법에 의한 결과는 Table 4과 같다. PEDV를 공격 접종한 실험 I군은 공격접종 24시간 후 2두를 부검시 1두의 공장, 회장에서 뚜렷한 양성반응을 보였고 1두는 PEDV가 검출되지 않았다. 36시간 후 2두를 부검시에도 유사한 양상을 보였고, 48시간 후 2두를 부검시 십이지장, 공장, 회장에서 모두 강한 양성 반응을 보였으며 60시간 후 3두를 부검시 3두중 2두는 십이지장 및 회장에서 비교적 강한 반응을, 3두 모두 공장에서 강한 반응을 보였으며, 72시간 후 3두를 부검시 3두중 2두는 십이지장에서 비교적 강한 반응을 보였고 3두 모두 공장 및 회장에서 강한 반응을 보였다.

PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 III군에서 공격접종 24시간 및 36시간 후 각 2두를 부검시 모두의 십이지장, 공장, 회장에서 강한 반응을 보였고 48시간 후 2두를 부검시 모두 십이지장, 공장, 회장에서 모두 비교적 강한 반응을 보였으며 60시간 및 72시간 후 3두를 부검시 3두 모두 십이지장, 공장에서 약한 반응을 보였고 3두중 2두는 회장에서 약한 반응을 보였다.

PEDV를 공격 접종한 실험 I군의 12두 자돈의 십이지장, 공장, 회장조직에서 PEDV에 대한 형광항체검사시에 양성율은 각각 75%, 83%, 75%인데 비해 PEDV와 PCV2 복합 공격 접종한 실험 II군에서는 십이지장, 공장, 회장조직에서 PEDV에 대한 형광항체검사 시에 양성율은 각각 91.3%, 91.3%, 83.3%의 더 높은 것으로 보였다. PCV2를 공격 접종한 실험 III군와 대조군의 포유자돈은 십이지장, 공장, 회장에서 PEDV가 검출되지 않았다.

Table 3. Detection of PCV2 from the tissue of piglets by PCR

Groups	Lung						Spleen						Intestine						Lymph nodes						Tonsil					
	24[b]	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)
Group I[a]	0/2[d]	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12[c] (0)	0/2	0/2	0/20	/3	0/3	0/12 (0)	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12 (0)	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12 (0)	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12 (0)
Group II	2/2	0/2	1/2	0/3	1/3	4/12 (33.3)	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12 (0)	1/2	0/2	1/2	0/3	0/3	2/12 (16.6)	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12 (0)	0/2	0/2	0/2	0/3	0/3	0/12 (0)
Group III	1/2	1/2	0/2	0/2	2/3	4/11 (36.3)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/11 (0)	0/2	1/2	0/2	0/2	0/3	1/11 (9.0)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/3	0/11 (0)	0/2	0/2	0/2	1/2	0/3	1/11 (9.0)
Group IV	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/5 (0)

[a]Group I: Piglets were challenged with PEDV
Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV
Group III: Piglets were challenged with PCV2
Group IV: Piglets were adminstrated with sterile saline
[b]Hours post-inoculation
[c]No. of feces of piglets detected / No. of total feces of piglets tested
[d]No. of pigs positive/No. of piglets tested

Table 4. Detection of PEDV from the small intestine of piglets by FA

Groups	Duodenum						Jejunum						Ileum					
	24[b]	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)	24	36	48	60	72	Cumulative detection (%)
Group I[a]	1/2[c] i	1/2 i	2/2 ii	2/3 ii	2/3 ii	8/12[d] (75)	1/2 i	1/2 ii	2/2 iii	3/3 iii	3/3 i	10/12 (83.3)	1/2 i	1/2 ii	2/2 iii	3/3 ii	3/3 ii	10/12 (83.3)
Group II	2/2 ii[e]	2/2 iii	2/2 iii	2/2 ii	1/3 i	10/12 (83.3)	2/2 ii	2/2 iii	2/2 iii	3/3 ii	2/3 0-i	11/12 (91.3)	2/2 ii	2/2 iii	2/2 ii	2/3 iii	2/3 i	11/12 (91.3)
Group III	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/3 0	0/11(0)	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/3 0	0/11(0)	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/2 0	0/3 0	0/11(0)
Group IV	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/5(0)	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/5(0)	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/1 0	0/5(0)

[a]Group I: Piglets were challenged with PEDV
Group II: Piglets were challenged with PCV2 followed PEDV
Group III: Piglets were challenged with PCV2
Group IV: Piglets were adminstrated with sterile saline
[b]Grade of PEDV~positive reaction
0: Negative
i: 1～29% of epithelial cells which were positive reaction
ii: 30～59% of epithelial cells which were positive reaction
iii: 60～100% of epithelial cells which were positive reaction
[c]No. of small intestine of piglets detected/No. of total small intestine of piglets tested
[d]HPC=hours postchallenge. *No. of pigs positive/No. of piglets tested

고 찰

돼지 유행성 설사는 PCVD, 모돈의 유사산 질병과 더불어 양돈 생산성에 가장 큰 피해를 입히는 질병이다. 특히 국내에서는 PEDV 인한 피해가 심각하여 매년 상당수의 자돈이 폐사되는 것으로 추정된다. 본 연구에서는 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 문제를 일으키는 PCVD인 PCV2와 돼지 유행성 설사병인 PEDV의 복합감염에 대한 병인을 구명하기 위하여 포유자돈에 PEDV와 PCV2를 단독 또는 복합으로 접종하여 경시적으로 혈청학적 검사, RT-PCR 검사 및 형광항체검사를 실시하였다.

ELISA 방법은 항체검출에 있어서 정확, 신속 및 경제적인 면에서 다른 검사법보다 우수하여 많이 이용하여 발병기와 회복기의 혈청항체가를 측정하여 회복기 항체가의 유의한 상승을 통하여 감염여부를 판정할 수 있다(Prager와 Witte, 1981; Carvajal 등 1995; Callebaut 등 1982; 津田, 1999). 본 연구에서 혈청학적 검사는 최근 가장 널리 이용되고 있는 ELISA를 이용하여 PEDV와 PCV2의 항체가를 PEDV와 PCV2를 단독접종 또는 복합접종 24시간 후 부터 12시간 간격으로 채혈하여 실시하였다. PEDV의 항체조사에서는 PEDV를 단독접종한 실험 I군에서 공격전의 혈청항체가는 2.65±0.11로 나타내었고 접종후 24시간에는 1.47±0.07로 급격히 항체가 저하를 보였다. 접종후 36시간, 48시간, 60시간에 소폭 감소를 보였고 접종후 72시간에는 접종후 60시간에 비해 항체가가 소폭 증가하였다. PEDV 공격접종후 24시간에는 혈중 모체이행항체가 침입된 바이러스를 중화시켜 항체가가 감소한 것으로 생각하며 접종후 72시간에 항체가가 다시 상승하였으며 이는 PEDV에 대한 능동면역에 의하여 항체형성된 것으로 사료된다. PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군에서 공격전 항체가는 2.79±0.07로 나타났으며 접종후 24시간에 1.25±0.12로 나타나 실험 I군과 비교하여 더 낮은 항체가를 나타내었다. 접종후 36시간, 48시간, 60시간에도 다소 감소된 항체가를 나타내었고 접종후 72시간에 1.05±0.07로 나타내어 실험 I군과 비하여 항체가 낮게 형성되었다. PEDV와 PCV2 복합 접종후 24시간에는 혈중 모체이행항체가 바이러스를 중화 시켜 항체가 감소된 것으로 생각되며 접종후 72시간에 혈중 항체가는 실험 I군에 비교하여 낮게 형성된 것은 능동면역이 지연 혹은 억제된 것으로 판단된다. PCV2를 공격접종한 실험 III군과 대조군의 항체가는 유사한 양상을 보였고 접종후 24시간에는 실험 I군과 실험 II군에 비하여 현저히 높은 역가를 보였으며 실험종료시까지 완만한 감소를 나타냈다. 이는 모체 이행항체가 바이러스를 중화하지 않고 자연적으로 감소된 것으로 사료된다. 또한 PCV2의 감염이 PED의 면역형성에 영향을 준 것으로 사료되었다. PCV2의 항체조사에서는 PEDV와 PCV2를 복합 접종한 실험 II군과 PCV2 단독접종한 실험 III군의 항체가가 실험전후에 유사하게 나타났고 PCV2의 항체역가는 PEDV 감염여부와 관계가 없은 것으로 생각된다.

Kim 등(2000)은 PEDV를 10두의 3일령 포유자돈에 공격 접종 후 12시간, 24시간, 48시간, 60시간, 72시간에 각각 2두씩 안락사시킨 뒤 분변과 소장에서 RT-PCR에 의한 검출결과는 9두의 분변과 10두의 소장에서 바이러스가 검출되었다고 보고하였다. 본 연구에서 RT-PCR을 이용한 분변과 소장에서 공격 접종한 PEDV의 검출결과는 PEDV를 단독 접종한 실험 I군의 포유자돈에서 접종 후 24시간에 2두를 부검 시 1두의 십이지장, 공장, 회장에서 양성 반응을 보였고 1두는 PEDV가 검출되지 않았다. 반면에 PEDV와 PCV2 복합접종한 실험 II군에서 접종후 24시간에 부검한 2두의 십이지장, 공장, 회장에서 모두 양성 반응을 보였다. 감염초기에 PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군은 PEDV 단독 접종한 실험 I군 비해 PEDV 높게 검출된 것으로 나타내어 더 신속한 감염을 일으키는 것으로 추정된다. 단독 접종군의 십이지장, 공장, 회장조직에서 PEDV 양성율은 각각 83.3%, 91.6%, 91.6%인데 비해 복합 접종군에서는 각각 91.6%, 91.6%, 100%로 더 높은 양성율을 보였다. 단독 접종군에서의 검출률은 Kim 등(2000)의 연구결과에 비해 유사하게 나타났었지만 복합 접종군에 비해서는 낮아 PEDV와 PCV2 복합 감염에 따른 바이러스가 더 많은 증식이 되었다고 사료된다.

DeBouck 등(1981)은 직접면역형광항체법이 가장 신속하고 특이성이 높은 유용한 진단법이라고 하였다. 설사가 시작된 뒤 6시간 이내에는 공장과 회장의 융모상피세포의 90~100%에서 형광항체에 대한 강한 양성반응이 나타나고 12~45시간에서는 반응이 급격히 떨어지며 24~45시간에서는 1~10%의 소장융모의 상피세포에서만 양성반응을 확인할 수 있었으나 재생된 상피세포에 재감염을 일으켰을 시 융모상피세포의 90~100%에서 양성반응이 나타난다고 보고하였다. 본

연구에서 PEDV를 공격 접종한 실험 I군은 공격 접종 24시간 후 2두를 부검 시 1두의 공장, 회장의 융모상피세포의 40%에서 양성반응을 보였고 1두는 PEDV가 검출되지 않았고 반면에 PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군에서 접종 후 24시간에 부검한 2두의 십이지장, 공장, 회장의 융모상피세포의 60~70%에서에서 강한 양성반응을 보였다. 감염초기에 복합 접종군은 단독 접종군 비해 더 강력한 PEDV의 감염을 일으킨 것으로 추정된다. 단독 접종군은 12두 자돈의 십이지장, 공장, 회장조직에서 PEDV에 대한 형광항체검사 시에 양성율은 각각 75%, 83%, 75%인데 비해 복합 접종군에서는 각각 91.3%, 91.3%, 83.3%의 더 높은 양성율 나타냈으며 RT-PCR검사와 유사한 결과를 나타내었다. 실험 후기에 검사시 복합 접종군과 단독 접종군 모두 검출율이 떨어지는 양상을 나타내었으며 이는 감염 후반에 바이러스에 의해 소장융모상피세포의 탈락이 심하기 때문에 검출율이 떨어지는 것으로 사료된다.

결 론

포유자돈에 PCVD 원인체의 PCV2와 포유자돈 바이러스 설사병인 PEDV를 자돈에 감염시켜 돼지써코바이러스 2형이 돼지유행성설사에 미치는 영향을 관찰하고자 ELISA 항체가 검사, RT-PCR검사 및 형광항체검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

PEDV의 항체조사에서는 PEDV와 PCV2를 복합 접종한 실험 II군은 PEDV 접종 후 24시간에 항체역가가 실험전에 비해 낮게 형성되었고 접종 후 72시간에 혈중 항체역가가 다소 상승하였지만 PEDV를 단독 접종한 실험 I군에 비해 낮게 형성되어 능동면역이 지연 혹은 억제된 것으로 판단된다. PCV2의 항체조사에서는 PEDV와 PCV2를 복합 접종한 실험 II군과 PCV2 단독 접종한 실험 III군의 항체가가 실험 전 과정에서 유사하게 나타났다.

RT-PCR에 의한 분변과 소장에서 감염초기에 PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군은 PEDV 단독 접종한 실험 I군에 비해 PEDV의 검출율이 높게 나타나 더 신속한 감염을 일으키는 것으로 추정된다.

형광항체법에 의한 소장에서 PEDV의 검출시에 PEDV와 PCV2 복합 접종한 실험 II군이 PEDV 단독 접종한 실험 I군에 비하여 높은 검출률을 보였고 특히 감염초기에 현저히 높게 검출되었다.

이상의 결과에서 PEDV와 PCV2를 복합 감염시킨 포유자돈은 단독 감염시킨 포유자돈에 비하여 심한 임상 및 병리조직학적 소견을 보여 돼지써코바이러스 2형이 돼지유행성설사를 더욱 심화시키는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

류영수, 박최규, 장정호. 1997. 가축질병진단. 초판. 이공월드, 서울 : 87-90.

Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Kennedy S, Clarke EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. 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.

Allan GM, McNeilly F, Meehan BM. 1999. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Vet Microbiol* 66: 115-123.

Allan GM, Ellis JA. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12(1): 3-14.

Allan G, Krakowka S. 2002. PCV2 : Ticking time bomb. *Pig Progress* 18: 14-15.

Chasey D, Cartwright SF. 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhea. *Res Vet Sci* 25: 255-256.

Carvajal A, Lanza I, Diego R, Rubio P, Cármenes P. 1995. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J Vet Diagn Invest* 7: 60-64.

Cheung AK. 2003. Transcriptional analysis of pocine circovirus. *J Virol* 305: 168-180.

Callebaut P, DeBouck P, Pensaert M. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the corona virus-like agent and its antibodies in pigs with porcine epidemic diarrhea. *Vet Microbiol* 7: 295-306.

DeBouck P, Pensaert M. 1980. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *Am J Vet Res* 41: 219-223.

DeBouck P, Pensaert M, Coussement W. 1981. The pathogenesis of an enteric infection in pigs experimentally induced by the coronavirus-like agent CV777. *Vet Microbiol* 6: 157-165.

Ellis JA, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM, Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Has-sard L, Martin K, McNeilly F. 2000. Coinfection by porcine acquired postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Vet Diagn Invest* 12: 21-27.

Fenaux M, Halbur PG, Gill M, Toth TE, Meng XJ. 2000. Genetic characterization of type 2 pocine 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.

Harding C. 2004. The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2. *Vet Microbiol* 98: 131-135.

Hirai T, Nunoya T. 2006. Infectivity of porcine circovirus 1 and circovirus 2 in primary porcine hepatocyte and kidney cell cultures. *J Vet Med Sci* 68(2): 179-182.

Hofmann M, Wyler R. 1988. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J Clin Microbiol* 26: 2235-2239.

Hofmann M, Wyler R. 1989. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet Microbiol* 20: 131-142.

Hamel AL, Lin LL, Nayar GP, et al. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol* 72(6): 5262-5267.

Jung K, Ha Y, Ha SK, Kim J, Choi C, Park HK, Kim SH, Chae C. 2006. Identification of porcine circovirus type 2 in retrospective cases of pigs naturally infected with porcine epidemic diarrhoea virus. *Vet J* 171(1): 166-168.

Kim O, Choi B, Kim B, Chae C. 2000. Detection an differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissble gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. *Vet Rec* 146: 637-640.

Krakowka S, Ellis JA, Meehan B, Kennedy S, McNeilly F, Allan G. 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.

McNulty M, Dale J, Lukert P. 2000 Circoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego : Academic Press: 299-303.

Mankertz A, Persson F, Mankertz J, Blaess G, Buhk HJ. 1997. Mapping and characterization of the origin of the replication of porcine circovirus. *J Virol* 71: 2562-2566.

Pensaert MB, DeBouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58: 243-247.

Pensaert MB. 1999. Porcine epidemic diarrhea. Disease of swine 8th ed. Iowa State Univ Press, Ames, Iowa, USA : 179-185.

Pensaert MB, DeBouck P. 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 58: 243-247.

Prager D, Witte KH. 1981. Die serologische Diagnose der Epizootischen virusdiarrhoe (EVD) des Schweines mit Hilfe der indirekten Immunofluores-zeztechnik (IIFT). II. Antikorper antwort nach experimenteller Infection. *Tierarztl Umschau* 36: 477-480.

Rosell C, Segalés J, Ramos-Vara JA, Folch JM, Rodríguez-Arrioja GM, Duran CO, Balasch M, Plana-Durán J, Domingo M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* 146: 40-43.

Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectiouts diseases of domestic animals. 8th ed. Comstock Publishing Associates, Ithaca, USA : 897-898.

West KH, Bystrom JM. 1999. Mycocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 11: 530-532.

津田知幸. 1999. 豚流行性下痢. 豚病學, 第四版, 近代出版, 東京: 260-266.