

돼지 썬코바이러스 2형 유전형 분류를 위한 nested-PCR 적용

추 금 숙*

전라북도축산위생연구소 정읍지소

(접수 2011. 2. 7, 게재승인 2011. 3. 26)

Application of a nested-polymerase chain reaction assay to differentiate the genotypes of porcine circovirus 2

Keum-Suk Chu*

Jeongeup-Branch, Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Jeongeup 580-814, Korea

(Received 7 February 2011, accepted in revised from 26 March 2011)

Abstract

The purpose of this study was to apply a nested-polymerase chain reaction (nPCR) assay to detect and differentiate PCV 2a and PCV 2b. The compared with nPCR and one-step PCR and nPCR showed more sensitive in the detection of PCV-2 from tissue and blood samples. The total of 52 tissue samples was collected from postweaning pigs from 2006 to 2010. All tissue samples showed positive for PCV-2 in one-step PCR and nPCR, followed by the nPCR in order to identify the genotypes of PCV-2. 2 samples (3.8%) showed positive for PCV 2a, and 35 samples were positive for PCV 2b (67.3%), 15 samples (28.9%) were positive the dual genotypes. In addition, 42 blood samples which were collected from the 5 different swine farms were compared figure out the detection rates of nPCR and one-step PCR. The PCV 2 was positive by one-step PCR in 21 samples (50.0%) and nPCR was positive in 37 samples (88.1%). The PCV 2 genotypes in blood samples and 32 samples (76.2%) were positive for PCV 2b and none were positive for PCV 2a, 5 samples (11.9%) were positive for dual genotypes. These results suggest that the nPCR is very efficient for genotyping blood samples and differentiating the genotypes of PCV-2 from field samples.

Key words : Porcine circovirus 2 (PCV-2), One-step polymerase chain reaction (PCR), Nested-polymerase chain reaction (nPCR)

서 론

Porcine circovirus (PCV)는 *Circoviridae*의 *Circovirus*로 envelope가 없는 single-stranded DNA 바이러스이다. PCV는 type 1과 2로 분류되며 PCV-1은 porcine kidney (PK)-15 cell에서 분리된 바 있으며 병원성은 없다. PCV-2는 porcine circovirus-associated disease에

서 검출되어 병원성과 관계되는 것으로 알려졌다 (Straw 등, 2006; Allan과 Ellis, 2000).

PCV-2는 postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS), porcine respiratory disease complex and reproductive disorders (PRDC)와 관계되며 PCV-2와 관계되는 질병을 porcine circovirus disease (PCVD)라고 표현하고 있다(Opriessing 등, 2004; 2006).

*Corresponding author: Keum-Suk Chu, Tel. +82-63-290-6540,
Fax. +82-63-290-6568, E-mail. chuks1103@korea.kr

PMWS는 1996년 캐나다에서 보고된 후 미국, 유럽, 아시아 등에서 발생되고 있으며 국내에서는 1998년도에 확인되었다. 초기 증상은 2~4개월령 자돈에서 체중감소, 호흡곤란, 설사 및 황달 등을 보이고 피하 림프절의 종대, 육아종성 간염, 신장염 및 간질성 폐렴 등의 육안적인 병변이 관찰되기도 한다(Ellis 등, 1998; Choi와 Chae, 1999). 이러한 PCVD는 양돈산업에서 경제적 손실을 일으키는 주요 질병의 하나로 세균 및 바이러스 질병과 복합감염 시 폐사율이 증가하며 농장 내 질병의 만성화 때문에 경제적 피해가 발생한다.

PCV-2는 1.767~1.768 nucleotides (nt)로 6개의 open reading frames (ORFs)로 구성되어 있으며 이중 PCV 감염세포는 ORF1, ORF2, ORF3과 관계된다. ORF1은 945 base로 2개의 replicase protein (Rep, Rep')으로 바이러스의 복제와 관계되며 ORF2는 702base로 capsid protein을 구성하고 세포의 heparin sulfate receptor와 반응하여 방어 항체를 유도하는 주요 물질로 간주되어 면역학적으로 중요하다. ORF3는 PK-15 cells 복제에 필수요소는 아니나 병원성과 관련되는 것으로 추정하고 있다(Hesse 등, 2008).

PCV-2의 유전자 분석을 통한 연구에서 genotypes은 subgroups과 subtypes로 구분되며, 주요 subtypes은 PCV 2a, PCV 2b이고 PCV-2 group 2와 PCV-2 group 1로도 알려져 있으며, 유전정보는 95% 동일성을 가지고 있다. 또한, ORF2의 2개의 genotypes 위치에 차이가 있으며 nucleotide와 peptide sequence는 대략 90%의 동일성을 가지고 있다(Cheung 등, 2007).

PCV-2의 genome은 지역적으로 차이가 있어 American-like strain (PCV 2a)와 European-like strain(PCV 2b)으로 구분되고 있다. 유럽은 PCV 2a와 PCV 2b가 동시에 존재하며 미국에서는 PCV 2a만이 관계되는 것으로 알려져 있었다. 그러나 2005년~2006년 미국과 캐나다에서 PCVD가 대량 발병하여 PCV 2b가 처음 분리되었다. PCV 2a와 PCV 2b의 동시 감염시 폐사율이 높고, 미국과 유럽의 PCV 2b의 핵산 동일성은 99.5%인 것으로 나타났다(Hamel 등 1998; Gagnon 등, 2007).

PCV-2 검출법으로는 간접형광항체법, 면역조직화학염색법, 전자현미경법 등이 이용되었으며, polymerase chain reaction(PCR)이 특이성과 민감도가 높은 검사방법으로 널리 사용되고 있다. PCR은 조직 시료에서는 충분한 민감도를 가지나 혈청 및 정액 시료에서

의 민감도는 부족하다. 최근 real-time PCR, nested PCR (nPCR) 및 genotype-specific PCR과 염기서열분석을 통한 유전자분석법 등이 이용되고 있다. 또한, genotypes 분석방법으로는 viral genomic sequence, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis 등이 있다.

이에 본 연구에서는 PCVD로 진단된 이유자돈 환축의 조직 및 혈액에서 one-step PCR과 nPCR의 검출률을 비교하고 genotypes을 조사하여 농가 예방접종과 방역지도의 기초 자료로 활용하고자 시험을 실시하였다.

재료 및 방법

공시 재료

전북지역 양돈장에서 2006년부터 2010년까지 질병검사 의뢰된 40~60일령의 자돈 가운데 위축 소견을 보인 48농가유래 52두의 폐 림프절 및 신장 조직과 2010년 의뢰된 관내 종돈장 2개소의 18두 및 양돈장 3개소의 24두의 혈액에서 백혈구를 분리하여 실험에 사용하였다.

DNA 추출

DNA 추출을 위해 냉동 조직은 세절하여 phosphate buffer saline (PBS)을 1 : 5로 균질화 후 원심 분리한 상층액을 실험에 사용하였다. 혈액 시료는 leucosep tube에 lymphocyte 용액을 분주하여 원심분리 후 혈액 3 ml을 넣어 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 백혈구층을 분리 후 냉동하여 실험에 사용하였다. DNA는 Bioneer ExiPrep 16 automated nucleic acid extraction system을 사용하여 Viral DNA/RNA kit (Bioneer, Korea)를 이용하였으며 추출 후 NanoQuant Infinite M 200 (Tecan, Switzerland)으로 농도를 확인하였다.

One-step PCR and nPCR 검사방법

One-step PCR 검사는 Kim 등(2009)과 동일한 PCV-2의 ORF 2 gene에서 디자인한 primer를 제작하여 사용하였다. Primer는 Cap1 5'-ATGACGTATCCA-AGGAGGCG-3' (1735~1716)와 Cap2 5'-GGGTTTAA-GTGGGGGTCT-3' (1037~1055)를 각 1 µl씩 PCR

premix (Maxime PCR Premix i-StarTaq, iNtRON)에 첨가하여 94°C에서 5분, 94°C에 1분 50°C에 1분 및 72°C에 2분씩 30회 반복 반응시킨 후 최종 72°C에서 7분 반응하여 PCV2 항원 양성을 확인하였다.

또한, nPCR의 적용은 Lyoo 등(2008)과 동일한 방법으로 primer를 제작하여 실험하였다. Primer는 VF-2 (forward) 5'-GAAGAATGGAAGAAGCGG-3'과 nest-R (reverse) 5'-ACAGTCAGAACGCCCTCCT-3'로 각 primer 1 µl를 PCR premix(Maxime PCR Premix i-StarTaq, iNtRON)에 첨가하여 94°C에서 5분, 94°C에 30초 54°C에 30초 및 72°C에 40초씩 30회 반복 반응시킨 후 최종 72°C에서 7분 반응하였다. 1차 PCR 산물을 primer 2a-F (forward) 5'-ACAATCCACGGAGGAAGG-3'와 2a-R (reverse) 5'-GGGACCAACAAAATCTCY-3', 2b-F (forward) 5'-CTGTTTTTCGAACGCAGTG-3'와 2b-R(reverse) 5'-CTCAAACCCCGCTCTG-3'로 제작하여 각 primer 1 µl를 PCR premix(Maxime PCR Premix i-StarTaq, iNtRON)에 첨가하여 94°C에서 5분, 94°C에 30초 57°C에 30초 및 72°C에 30초씩 30회 반복 반응시킨 후 최종 72°C에서 7분 반응하였다. PCR 반응 산물은 MuultiNA (SHIMADZU Bio, Japan) 자동전기영동 장치를 이용하여 증폭 band를 확인하였다.

결 과

조직에서 one-step PCR 검사결과 양성으로 확인된 52두의 동일 시료를 nPCR로 검사하여 모든 시료에서 양성을 확인하였으며 PCV-2 genotype을 검사한 결과 전체 52두 중 PCV 2a는 2건(3.8%), PCV 2b는 35건(67.3%), PCV 2a와 2b의 복합감염은 15건(28.9%)으로 확인되었다. 검사 결과를 년도별로 살펴보면 2010년 15개 시료 중 PCV 2a는 2건(13.3%), PCV 2b는 10건(66.7)이었고, PCV 2a와 2b의 복합감염은 3건(20.0%)으로 나타났다. 또한, 2009년에서 2006년의 시료에서 PCV 2a는 확인되지 않았으며 PCV 2b의 단독감염과 PCV 2a와 2b의 복합감염은 2009년 10건(71.4%)과 4건(28.6%), 2008년은 6건(75.0%)과 2건(25.0%), 2007년 4건(57.2%)와 3건(42.8%), 2006년은 5건(62.5%)와 3건(37.5%)으로 확인되었다(Table 1, Fig. 1). 또한, 조직에서 primer PCV 2a와 2b를 사용하여 직접 PCR을 사용하여 검사한 결과 52건 중 50건(96.1%)이 양성이었으며 이중 PCV 2a는 1건(1.9%), PCV 2b는 39건(75.0%), PCV 2a와 2b 복합감염은 10건(19.2%)으로 확인되었다.

PCV-2의 항원을 5개소의 농장 42건 혈액에서 검사

Table 1. Detection of PCV-2 genes in tissue samples

Years	No. of tested	nPCR	PCV2 genotypes (%)		
			PCV2a	PCV2b	PCV2a+PCV2b
2006	8	8	0	5 (62.5)	3 (37.5)
2007	7	7	0	4 (57.1)	3 (42.9)
2008	8	8	0	6 (75.0)	2 (25.0)
2009	14	14	0	10 (71.4)	4 (28.6)
2010	15	15	2 (13.3)	10 (66.7)	3 (20.0)
Total	52	52 (100)	2 (3.8)	35 (67.3)	15 (28.9)

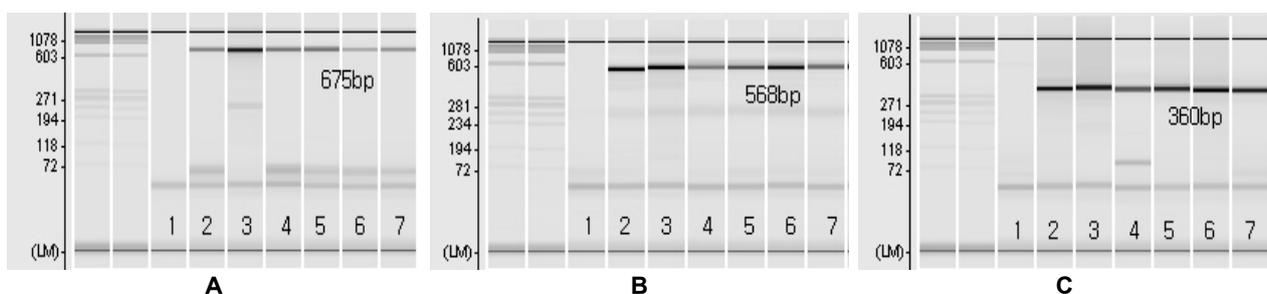


Fig. 1. Detection of PCV-2 by Automatic Microchip Electrophoresis System. (A) One-step polymerase chain reaction (PCR). (B) Nested PCR of PCV 2a. (C) Nested PCR of PCV 2b. M: 1000-DNA marker, lane 1: negative, lane 2~7: positive samples in tissue.

Table 2. Detection of PCV-2 genes in blood samples

Farms	No. of tested	PCR (%)	nPCR (%)	PCV2 genotypes (%)		
				PCV2a	PCV2b	PCV2a+PCV2b
A	10	5 (50.0)	8 (80.0)	0	8 (100)	0
B	8	5 (62.5)	5 (62.5)	0	3 (37.5)	2 (25.0)
C	8	3 (37.5)	8 (100)	0	7 (87.5)	1 (12.5)
D	8	2 (25.0)	8 (100)	0	8 (100)	0
E	8	6 (75.0)	8 (100)	0	6 (75.0)	2 (25.0)
Total	42	21 (50.0)	37 (88.1)	0	32 (76.2)	5 (11.9)

한 결과 one-step PCR에서 21건(50.0%), nPCR에서 37건(88.1%)건이 양성이었으며 이중 종돈장(A, B) 2개소의 혈액 18건 중 one-step PCR에서 10건(55.6%), nPCR에서 13건(72.2%)건이 양성으로 16.6% 더 양성 이 검출되었다. 또한, genotype 검사에서 A종돈장은 nPCR 양성 8건 중 PCV 2b만이 확인되었고 B종돈장은 PCV 2b가 3건(37.5%), PCV 2a와 2b의 복합감염은 2건(25.0%)이었다. 양돈장(C-E) 혈액 24두의 PCV-2 항원 검사에서는 one-step PCR은 11건(45.8%)이, nPCR에서 24건(100%)이 양성으로 확인되어 54.2% 더 양성 이 검출되었다. 또한, genotype 검사에서 PCV 2a는 검출되지 않았고 PCV 2b가 21건(87.5%), PCV 2a와 2b 복합감염은 3건(12.5%)이었다. 농장별로 검사결과를 살펴보면 C양돈장은 PCV 2b는 7건(87.5%), PCV2a와 2b의 복합감염이 1건(12.5%), D양돈장은 PCV 2b만이 8건(100%), E양돈장은 PCV 2b는 6건 (75.0%), PCV 2a와 2b의 복합감염이 2건(25.0%)이었다. 즉 혈액에서의 검사결과를 보면 PCV-2 항원은 one-step PCR보다 nPCR에서 38.1% 양성이 더 검출되는 것을 확인하였다(Table 2).

고 찰

국내에서 돼지 썬코바이러스의 관련 PMWS가 1998년 처음 보고된 이후 현재까지 이유자돈의 주요 질병으로 주목받고 있다. PCV-2는 PMWS의 주요 원 인체로 단독감염 보다 돼지 파보바이러스(porcine parvovirus, PPV), 돼지 생식기호흡기증후군(porcine reproductive and respiratory virus, PRRS), 유행성폐렴 (enzootic pneumonia-mycoplasmal), 살모넬라감염증(salmonellosis) 및 면역체계를 자극하는 환경요인이나 다른 병원체의 노출과 관련성이 있는 것으로 보고되어

질병의 관리가 어려운 실정이다(Rovira 등, 2002).

이유자돈 PMWS 의심축에서 PCV-2를 조사하여 박 과 김(2004)은 95.0%로 높은 양성률을 확인하였고, 김 등(2004)은 68.1%의 양성률을 보였으며 사육단계 별로 보면 4주령 미만은 28.6%로 12~18주령 88.1%로 조사하였고 추 등(2008)은 위축 이유자돈 98.3%로 도축 폐병변 비육돈에서 98.3%, 도태 모돈에서 89.2%로 높은 양성률을 보고하였다. 또한, 최 등(2006)은 도축장 출하돈 림프절에서 55%로 조사하여 국내 양돈장에서는 이유자돈 뿐만 아니라 모돈 및 비육돈에서 높은 항원 양성률이 확인되어 농장 내 바이러스의 순환 및 상재 질병으로 추정할 수 있었다.

박 등(2004) 및 김 등(2003)은 PCR을 이용하여 이 환 자돈에서 PCV-2를 분리하였고, 김 등(2009)이 PCR과 real-time PCR에서 PCV2의 항원 검출률을 비교하여 PCR 47.2%, TaqMan probe real-time PCR은 68.8%의 양성을 확인하였으며 PCR 검사 음성인 시료에서 real-time PCR로 검사하여 40.8%가 양성으로 조사되어 검사방법에 따른 검출한계의 차이를 확인 하였다. Real-time PCR은 PCR보다 검사 시간이 짧게 소요되고 증폭과정을 실시간으로 확인할 수 있는 장 점이 있으나 장비와 시약이 고가이고 매우 민감하여 검사방법 및 결과에 대한 많은 조사가 필요할 것으로 사료된다.

최근 PCV-2에 대한 염기서열 분석을 통한 유전학적 연구로 김과 한(2009)은 PCVD로 진단된 이유자돈에서 PCV 2a와 2b genotype을 분류하였고 주로 dominant genotype은 PCV 2b이며 일부 PCV 2a도 존재한다고 보고하였다. 최근 국내에서 문제가 되는 PCV-2는 북미와 유럽에서 발생하는 분리주와 밀접한 관련성이 있다고 추정되며 국내에서도 genotype에 대한 활발한 연구가 이루어지고 있다(An 등, 2007; Kim 등 2009; Chae와 Choi: 2008, 2010). 또한, Hesse 등(2008)

은 PCV의 genotype을 검사하여 PCV 2a는 43.4%로, PCV 2b는 31.9%로, PCV 2a와 2b 복합감염은 24.7%로 보고하여 두 가지 genotype의 복합감염을 증명하였고, Cortey 등(2010)은 스페인의 PCV-2 genotype을 분석한 결과 1990년대에는 PCV 2a의 발생이 많았고 PMWS 발생이 증가하는 2000년대에 PCV 2b 발생이 증가한다고 보고했다. 본 조사에서도 nPCR법을 적용하여 2006년에서 2010년까지 의뢰된 이유자돈 검사 대상물에서 PCV 2a와 2b의 복합감염을 확인하였고, PCV 2b의 감염률이 조직에서 67.3%와 혈액에서 76.2%로 주 원인체임을 확인할 수 있었다. 이것은 Kim 등(2010)이 국내 PMWS 감염축에서 2000년 이후 PCV 2a에서 PCV 2b로의 감염의 이동을 확인한 결과와 일치하였다. 그리고 PCV-2 항원의 검출률 비교에서 조직은 one-step PCR과 nPCR에서 100%로 양성률의 차이는 없었으며 genotype도 PCV 2a와 PCV 2b의 감염 확인이 가능하였다. 그러나 혈액에서는 one-step PCR은 50.0%, nPCR은 88.1%의 양성률을 보여 검사법에 따른 검출률의 차이를 확인하였고, one-step PCR에서 음성축인 16두가 nPCR에서 양성으로 확인되었고 검출률도 nPCR에서 38.1% 높게 나타나 시료에 따른 검사법의 검토가 필요할 것으로 확인되었다.

PCV-2의 질병대책으로 2006년부터 미국 및 유럽에서는 백신이 개발되어 모돈 및 이유자돈에 접종하면서 폐사율이 감소하여 생산성을 향상하는데 도움이 되었으며 국내에서도 2007년부터 이유자돈을 대상으로 국가에서 지원하는 자가 및 수입백신이 보급되어 질병의 피해는 다소 감소하였으나 만성 소모성질환으로 인한 양돈장의 피해는 여전히 발생하고 있다. 또한, 백신 사용에 따른 농장별 체계적인 항체가 조사와 사육단계별 항원분석 등의 검사에 따른 대처가 미비한 실정이다. 이러한 검사의 적용은 일반 양돈장에서는 검사비용의 부담과 사육규모에 따라 적용의 한계가 있어 종돈장이나 AI 센터와 같이 철저한 방역이 요구되는 사업장은 검사항목 및 방법에 대한 양돈장과 다른 적용이 필요할 것으로 본다. 국내에서 실시되는 종돈장 방역실시요령에는 돼지 열병, 구제역, PRRS, 오제스키병, 브루셀라병이 의무 검사항목이며 우수 종돈장 인증 시 위축돈에 대한 돼지위축성 비염, 마이코플라스마페렴, 살모넬라병, 흉막페렴과 혈청에서 쉰코바이러스 항원검사를 추가하고 있다. 또한, PRRS는 항원 및 항체 검사를 병행하여 관리하고 있으나 PCV-2는 항원만 실시하고 있으며 우수종

돈장 검사항목 중 10종 이상 발생하지 않으면 최우수, 8종 이상 발생하지 않으면 우수종돈장으로 인증받을 수 있다. 그러나 이러한 검사체계는 PCV-2에 대한 종돈장에서의 철저한 관리가 우선시 되어야 양돈장의 질병을 관리할 수 있는 점을 고려할 때 더 철저한 규제가 필요하며 사육단계별 항원 검사는 혈액에서 이루어진다는 점을 감안할 때 PRRS뿐 아니라 PCV-2에 대한 항원 검사의무화 및 방법에 대한 검토가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 종돈장에서는 국가에서 규제를 위한 검사가 아닌 자율적인 검사와 방역이 이루어질 수 있도록 체계적인 질병 관리 시스템이 도입되어야 할 것이다.

결 론

돼지 쉰코바이러스의 진단법 확립과 유전자형을 조사하기 위하여 2006년에서 2010년까지 one-step PCR 검사 양성 52건을 대상으로 nPCR을 이용한 genotype 검사에서 PCV 2a는 2건(3.8%), PCV 2b는 35건(67.3%), PCV 2a와 2b 복합감염은 15건(28.9%)이었다. 또한, 조직에 대해 PCV 2a와 2b의 primer를 이용하여 직접 PCR 검사를 실시한 바, 52건 중 50건(96.1%)이 양성이었으며, 그 중 PCV 2a는 1건(1.9%), PCV 2b는 38건(75.0%), PCV 2a와 2b의 복합감염은 10건(19.2%)으로 확인되었다.

혈액에서 PCV-2 검출률을 비교하기 위해 5개소 42건을 검사한 결과 종돈장의 혈액 18건 중 one-step PCR에서 10건(55.6%)이, nPCR에서는 13건(72.2%)이 양성이었다. genotype은 PCV2b 11건(61.1%), PCV 2a와 2b의 복합감염은 2건(11.1%)이었다. 양돈장의 혈액 24건 중 one-step PCR에서 11건(50.0%)이, nPCR은 24건(100%)이 양성이었다. 이중 PCV 2b는 7건(87.5%)이, PCV 2a와 2b의 복합감염은 1건(12.5%)이 양성이었다. 즉 혈액 42건 중 one-step PCR에서 21건(50.0%)이, nPCR에서는 37건(88.1%)이 양성으로 조사되어 혈액에서 PCV-2 검출률은 nPCR이 38.1% 더 높은 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

김문, 한정희. 2009. 돼지 쉰코바이러스 2형 국내분리주의 유전학적 특성 규명. 한국가축위생학회지 32(1): 1-10.

- 김영환, 조광현, 김성국, 김순태, 박인화, 손재권, 정종식. 2004. 경북지방 돼지에서 이유후전신소모성증후군 및 porcine circovirus type 2의 감염 양상. *한국가축위생학회지* 27(2): 139-146.
- 김은경, 황보원, 이종민, 손병국, 박호정, 김도경. 2009. Real-time PCR을 이용한 돼지썩코바이러스 감염증 진단법 연구. *한국가축위생학회지* 32(4): 299-306.
- 김재훈, 노인순, 손현주. 진영화, 황의경, 윤경진. 2003. 국내 이유후전신소모성증후군에 의한 이유후전신소모성 증후군. *대한수의학회지* 43(3): 463-469.
- 박최규, 김현수. 2004. 이유후전신소모성증후군 이환 자돈에서의 바이러스성 원인체 검색 및 porcine circovirus 2 분리 동정. *대한수의학회지* 44(4): 561-569.
- 박최규, 이경기, 김현수. 2004. Porcine circovirus 2 국내 분리 주의 유전적 특성. *대한수의학회지* 44(4): 571-579.
- 최원중, 홍경수, 정용호, 김남선, 김년수, 김기태, 김광재, 김문식. 2006. 강원도 영동지역의 도축돈에 대한 porcine circovirus type 2 감염률 조사. *한국가축위생학회지* 29(3): 249-256.
- 추금숙, 강미선, 조영숙, 이정원. 2008. 돼지 폐렴병변에서 PCR을 이용한 썩코바이러스 2, 돼지생식기호흡기증후군, 마이코플라스마 폐렴 감염실태 조사. *한국가축위생학회지* 31(1): 71-77.
- Allan GM, Ellis JA. 2000. Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest* 12(1): 3-14.
- An DJ, Roh IS, Song DS, Park CK, Park BK. 2007. Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korea pigs between 1999 and 2006. *Virus Res* 129(2): 115-122.
- Chae JS, Choi KS. 2008. Genetic characterization of porcine circovirus type 2 in Republic of Korea. *Res Vet Sci* 84(3): 497-501.
- Chae JS, Choi KS. 2010. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 from pigs in republic of Korea. *Res Vet Sci* 88(2): 333-338.
- Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, Rowland RR, Dunham AG. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch Virol* 152(5): 1035-1044.
- Choi C, Chae C. 1999. In-situ hybridization for the detection of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Comp Pathol* 121(3): 265-270.
- Cortey M, Pileri E, Sibilila M, Pujols J, Balasch M, Plana J, Segales J. 2010. Genotypic shift of porcine circovirus type 2 from PCV-2a to PCV-2b in Spain from 1985 to 2008. *Vet J*: 1-5.
- Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D. 1998. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Can Vet J* 39(1): 44-51.
- Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can Vet J* 48(8): 811-819.
- Hamel AL, Lin LL, Nayar GP. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pig. *J Virol* 72(6): 5262-5267.
- Hesse R, Kerrigan M, Raymond RR. 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res* 132(1-2): 201-207.
- Kim D, Ha Y, Oh Y, Chae C. 2010. Prevalence of porcine circovirus types 2a and b in pigs with and without post-weaning multi-systemic wasting syndrome. *Vet J*: 1-3.
- Kim HH, Park SI, Hyun BH, Park SJ, Jeong YJ, Shin DJ, Chun YH, Hosmillo M, Lee BJ, Kang MI, Cho KO. 2009. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 in Korea pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome during 2005-2007. *J Vet Med Sci* 71(3): 349-353.
- Lyou KS, Kim HB, JOO HS. 2008. Evaluation of nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of Porcine circovirus-2. *J Vet Diagn Invest* 20(3): 283-288.
- Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG. 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* 41(6): 624-640.
- Opriessnig T, Mckeown NE, Harmon KL, Meng XJ, Halbur PG. 2006. Porcine circovirus type 2 infection decreases the efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 13(8): 923-929.
- Rovira A, Balasch M, Segales J, Garcia L, Plana-Duran J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M. 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J Virol* 76(7): 3232-3239.
- Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. 2006. *Disease of swine* 9 eds. Iowa State Univ Press. Ames, Iowa: 299-307.