

< Original Article >

## 육안 판독 등온증폭법을 이용한 돼지 쉼코바이러스 2형 신속 진단법

공호철<sup>1</sup> · 김은미<sup>1</sup> · 전효성<sup>2</sup> · 김지정<sup>2</sup> · 김희정<sup>1</sup> · 박유리<sup>1</sup> · 강대영<sup>1</sup>  
김영화<sup>3</sup> · 박준철<sup>3</sup> · 이창희<sup>4</sup> · 여상진<sup>1</sup> · 박최규<sup>1\*</sup>

경북대학교 수의과대학 & 수의전염병제어센터<sup>1</sup>, 엠모니터<sup>2</sup>, 국립축산과학원<sup>3</sup>, 경북대학교 자연과학대학<sup>4</sup>

### Visual detection of porcine circovirus 2 by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with hydroxynaphthol blue dye

Ho-Chul Kong<sup>1</sup>, Eun-Mi Kim<sup>1</sup>, Hyo-Sung Jeon<sup>2</sup>, Ji-Jung Kim<sup>2</sup>, Hee-Jung Kim<sup>1</sup>,  
Yu-Ri Park<sup>1</sup>, Dae-Young Kang<sup>1</sup>, Young-Hwa Kim<sup>3</sup>, Jun-Cheol Park<sup>3</sup>,  
Chang-hee Lee<sup>4</sup>, Sang-Geon Yeo<sup>1</sup>, Choi-Kyu Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine & Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>M monitor Incorporation, Daegu 41914, Korea, <sup>3</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan 55365, Korea

<sup>4</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

(Received 5 August 2015; revised 25 August 2015; accepted 2 September 2015)

#### Abstract

In this study, we developed a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with hydroxynaphthol blue dye (HNB) for rapid and direct visual detection of porcine circovirus 2 DNA with high sensitivity and specificity. The LAMP was completed in 40 min at 63°C, and the results of the LAMP can be confirmed by naked eye without any detection process. The sensitivity of the LAMP was 10-fold higher than that of the commercial PCR (cPCR) and real time PCR (rPCR) previously reported. In clinical application, the PCV2 detection rate of the LAMP was the same on porcine tissue samples (75.0%, 36/48) between porcine blood samples (75.0%, 39/52). The PCV2 detection rate (75.0%) of LAMP was higher than those of the cPCR and rPCR (67.3%, 35/52) in blood samples. In conclusion, the LAMP developed in the study could be an useful alternative method for the detection of PCV2 in the swine disease diagnostic laboratories.

**Key words :** Porcine circovirus 2 (PCV2), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), polymerase chain reaction (PCR), real time-PCR (rPCR)

## 서 론

돼지 쉼코바이러스 2형(porcine circovirus 2; PCV2) 감염에 의한 돼지 쉼코바이러스병(porcine circovirus disease; PCVD)은 전 세계적으로 양돈업이 성행하는 거의 모든 국가에서 발생하고 있으며, 양돈산업에 가장 큰 피해를 주는 질병 중의 하나이다(Segalés 등, 2012). PCVD는 감염 돼지에서 다양한 임상증상을 유

발할 뿐만 아니라 PCVD의 특이 증상을 보이지 않는 돼지에서도 흔히 검출되기 때문에 돼지질병을 진단하는 실험실에서는 PCVD의 확진 및 유사 질병과의 감별진단을 위하여 PCV2에 대한 진단을 상시적으로 실시하고 있다(Brunborg 등, 2004, Chae, 2012; Opriessnig 등, 2007; Segalés 등, 2005). PCV2 감염의 진단에는 바이러스 분리동정, 면역조직화학염색법, *in situ* hybridization 등 다양한 방법이 이용될 수 있으나, 높은 특이도와 민감도를 가지는 polymerase chain reaction (PCR) 및 real time PCR (rPCR)이 국내·외에서 가장

\*Corresponding author: Choi-Kyu Park, Tel. +82-53-950-5973,  
Fax. +82-53-950-5973, E-mail. parkck@knu.ac.kr

많이 이용되고 있다(Kim 등, 2009; Kim 등, 2011; Larochelle 등, 1999; Lyoo 등, 2008; Tribble과 Rowland, 2012). 그러나 현재 상용되고 있는 PCR 기반 진단법들은 특수한 장비와 시약을 필요로 하며, 전문 검사 인력이 필요하기 때문에 전문 진단기관 이외 일선 임상진단실에서는 쉽게 적용하기 어려운 단점이 있다. 따라서 특이도와 민감도가 높으면서 일선 임상진단실에서도 신속, 간편하게 진단할 수 있는 진단법의 개발이 요구되고 있다.

등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 반응 온도에 변화를 주어야 하는 기존의 PCR 기반 진단법과 달리 일정한 온도 조건에서 유전자를 증폭할 수 있는 새로운 방식의 유전자 진단법으로써 고도의 특이도와 민감도를 가지면서도 신속하게 목표 유전자를 증폭할 수 있다(Notomi 등, 2000). 특히 등온조건에서 반응이 이루어지는 LAMP의 특성상 일정한 온도가 유지되는 항온장비만 있어도 검사가 가능하기 때문에 고가의 특수 장비나 전문인력이 없는 일선 임상 진단실이나 임상 현장에서도 용이하게 이용될 수 있다. 이러한 장점 때문에 최근 LAMP는 사람 및 동물의 다양한 감염증 진단에 널리 활용되고 있다(Dhama 등, 2014; Mori 등, 2009).

LAMP의 결과는 증폭산물을 전기영동하여 특징적인 사다리꼴 모양의 증폭산물을 확인하거나 증폭산물의 탁도를 측정하여 판독할 수 있으며, SYBR green과 같은 DNA 염색액을 이용하여 반응이 끝난 증폭산물을 염색하여 판독할 수도 있다(Mori 등, 2009; Notomi 등, 2000). 그러나 전기영동이나 DNA 염색액을 이용한 판독방법은 반응 튜브를 개봉하여 증폭산물을 취급해야 하기 때문에 실험실내 핵산 오염의 문제가 발생할 수 있으며, 탁도 측정에 의한 판독은 실험자에 따른 판독의 오류가 발생할 가능성이 있어 문제점으로 지적되어 왔다(Zhang 등, 2014). 최근 이러한 문제점을 해결하기 위하여 금속지시제인 hydroxynaphthol blue dye (HNB)를 이용하여 LAMP 결과를 판독하는 방법이 개발되었다(Goto 등, 2009). 이 방법은 HNB를 증폭이전의 반응액에 혼합하며, 반응튜브를 개봉하지 않고도 반응결과의 확인이 가능하기 때문에 반응 후에 염색액을 첨가해주어야 하는 다른 색깔 분석법에 비해 교차오염을 방지할 수 있는 장점이 있다.

이 연구에서는 PCVD의 원인체인 PCV2를 신속하게 진단할 수 있으며, HNB를 적용하여 별도의 판독기 없이도 반응 결과를 육안으로 바로 확인할 수 있는 LAMP 진단법을 개발하여 기존의 PCR 및 real

time PCR과 진단효율을 비교하였기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

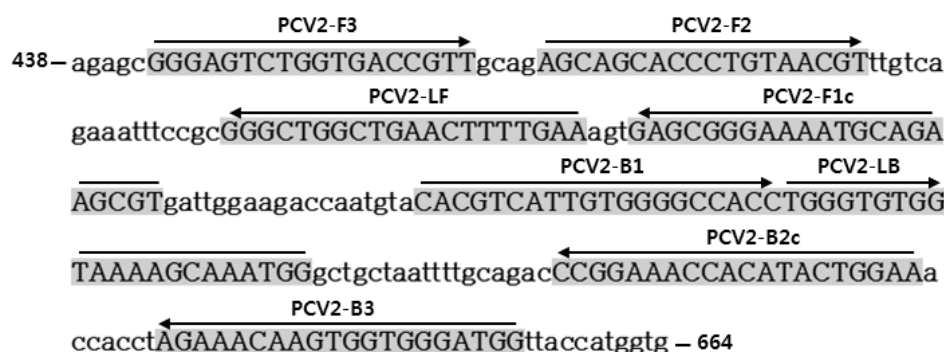
표준 양성 바이러스는 PCV2 국내 분리주(PCK0201)를 돼지 신장세포(PK-15)에 배양하여 사용하였으며(Park 등, 2004), 음성 대조군은 PCV2 음성이 확인된 돼지 신장세포(PK-15)를 사용하였다. 야외 시료는 PCVD가 문제되는 양돈장의 돼지들로부터 조직(림프절) 48점 및 혈액(혈청) 52점을 채취하여 시험에 제공하였다. 혈청시료는 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 채취한 다음,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였고, 조직시료는 세절하여 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2)로 10% 유제액을 만든 다음, 조직균질기(Bertin technologies, France)을 사용하여 파쇄하였고, 3,000 x g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 채취한 다음,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였다. LAMP 및 PCR을 위한 핵산 추출은 시험 당일 보관 혈청 및 조직시료로부터 시판 핵산 추출키트(Inclone biotech, Korea)를 이용하여 DNA를 추출한 후 즉시 시험에 제공하였다.

### LAMP용 프라이머 설계

LAMP를 위한 primer은 PCV2b 유전형에 해당하는 MN-NP162 바이러스주의 유전자 염기서열(GenBank accession number EF452353)을 표준으로 하여 2005~2014년 사이에 GenBank에 등록된 모든 PCV1과 PCV2 open reading frame (ORF) 1 및 2 유전자 염기서열 정보를 확보하여 DNASTAR<sup>®</sup>Lasergene (DNASTAR Inc., USA) 프로그램으로 비교분석하여 가장 안정적인 부위를 선별한 다음, LAMP용 primer 설계 프로그램인 Primer-Explorer V3 software (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>; Eiken Chemical Co. Ltd, Japan)를 이용하여 2종의 내부 primer [forward inner primer (FIP)와 backward inner primer(BIP)], 2종의 외부 primer (F3와 B3) 및 2종의 loop primer [F loop primer (LF)와 B loop primer (LB)]를 설계하였다(Table 1, Fig. 1). 설계한 primer set는 primer 제조업체 (Bioneer Co, Korea)에 의뢰하여 합성하였다.

**Table 1.** Primers and probe for the loop-mediated isothermal amplification (LAMP), polymerase chain reaction (PCR) and real time PCR (rPCR) in this study

Method	Name of primer	Sequence (5'-3')	Reference
LAMP	PCV2-F3	GGGAGTCTGGTGACCGTT	This study
	PCV2-B3	CCATCCCACCACTTGTTTCT	
	PCV2-LF	TTCAAAAAGTTCAGCCAGCCC	
	PCV2-LB	TGGGTGTGGTAAAAGCAAATGG	
	PCV2-FIP (F1c+F2)	ACGCTTCTGCATTTTCCCGCTC- AGCAGCACCCCTGTAACGT	
	PCV2-BIP (B1+B2c)	CACGTCATTGTGGGGCCACC- TTCCAGTATGTGGTTTCCGG	
PCR	Forward	CACGGATATTGTAGTCCTGGTTCG	Ouardani et al. (1999)
	Reverse	CGCACCTTCGGATAIACTG	
rPCR	PCV-tF	AGGAGGGCGTTCTGACTGTG	Kim et al. (2009)
	PCV-tR	ACCGCTACCGTTGGAGAAAG	
	PCV-tProbe	FAM-TCTTCAACACCCGCCTCTCCCGCAC-TAMRA	



**Fig. 1.** Location of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers. Locations of primer-binding sequences are indicated over the sequence of PCV2 (GenBank accession number: AF027217).

### Conventional PCR (cPCR)

cPCR은 농림축산검역본부와 시·도 가축방역기관에서 PCV2 진단용으로 주로 사용하고 있는 시판 PCV2 진단키트 (VDx PCV2 ORF2 PCR kit, Median diagnostics, Korea)를 이용하여 제조사의 추천방법에 따라 검사하였다. 시판키트에서 사용한 primer는 Ouardani 등(1999)이 보고한 primer의 염기서열을 일부 변형한 것으로 Table 1과 같다. 공시 재료로부터 추출한 DNA 5 µL를 PCR premix에 첨가한 다음, PCR 증폭기(Bio-metra, Germany)를 이용하여 95°C에서 5분간 처리하고, 35 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C, 20초; annealing 55°C, 20초; extension 72°C, 30초)를 수행하였고, 72°C에서 5분간 최종 반응하였다. PCR 증폭산물은 NEO green 염색액(NEO science, Korea)을 첨가하여 1.5% agarose gel에 전기 영동한 다음, 자외선판독기(Bio-Rad, USA)로 493 bp의 특이 밴드를 관찰하여 판독하였다.

### Real-time PCR (rPCR)

rPCR은 Kim 등(2009)의 방법에 따라 PCV2를 검출할 수 있는 primer 및 probe set를 이용하여 시판 Premix Ex Taq kit (TaKaRa, Japan)를 사용하여 수행하였다 (Table 1). 즉, 12.5 µL의 Premix Ex Taq, 0.4 µM의 각 primer 및 probe를 첨가한 반응액에 검사용 DNA template 5 µL를 첨가한 다음, 멸균증류수로 최종 용량을 25 µL로 조정하였다. rPCR 반응은 실시간핵산증폭기 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 95°C에서 30초간 처리하였고 40 회전의 PCR 과정(denaturation 95°C, 20초; annealing 56°C, 1분)을 거친 다음, CT값이 37이하일 경우 양성으로 판정하였다.

### LAMP의 반응조건 확립

LAMP를 위한 반응액의 조성은 Zhao 등(2011)이 보고한 반응액의 조성을 준용하였다. 즉, 8 unit의 Bst DNA polymerase (NEW England Biolabs, USA), 0.8 M betaine (Sigma-Aldrich, USA), 20 mM Tris-HCl (pH

8.8), 10 mM KCl, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 1.6 mM dNTPs, 3 mM HNB (Lemongreen, Shanghai, China), FIP와 BIP 각 40 pmol, LF와 LB 각 20 pmol, 그리고 F3와 B3 각 5 pmol를 첨가하여 반응액을 제조하였으며, 제조한 반응액에 검사 시료에서 추출한 DNA 시료 5 µL를 첨가한 다음, 멸균증류수로 최종 용량을 25 µL로 조정하였다. PCV2 검출에 적합한 최적 LAMP 조건을 확립하기 위하여 바이러스 배양액으로부터 추출한 DNA을 이용하여 반응온도(45~68°C)와 반응시간(10~40분)을 달리하여 LAMP를 실시한 다음, 80°C에서 5분간 처리하여 반응액 내의 효소 활성을 제거하였다. 반응이 끝난 튜브의 반응액을 육안으로 관찰하여 색깔 변화를 관찰하여 양성 여부를 판독하였으며, 동시에 2.0% agarose gel에 전기영동을 실시한 다음, 자외선판독기(Bio-Rad, USA)를 이용하여 LAMP 반응에서 특이적으로 나타나는 사다리 모양의 증폭 유전자 밴드를 확인하여 양성 여부를 판정하였다.

**개발 LAMP의 특이도**

개발 LAMP 진단법의 특이도를 확인하기 위하여 Table 2에 제시된 PCV2 배양액과 공시 돼지 바이러스 및 세균 배양액으로부터 시판 핵산 추출키트(Inclone biotech, Korea)를 이용하여 제조사의 방법대로 핵산을 추출한 다음, 개발된 LAMP를 이용하여 확립된 조건으로 반응을 실시하였고, 전술한 방법으로 PCV2 유전자의 증폭 여부를 확인하였다.

**진단법간 민감도 비교**

PCV2 배양액을 PBS (pH 7.2)로 10 배수 단계희석한 다음, 이를 대상으로 cPCR, rPCR 및 개발 LAMP를 실시하여 진단법간 민감도를 비교하였다. 민감도 측정에 사용된 유전자는 각 시료 희석액 200 µL를 덜어내어 시판 핵산 추출키트(Inclone biotech, Korea)를 이용하여 제조사의 방법대로 핵산을 추출하여 50 µL의 증류수에 용출한 후 그 중 5 µL를 채취하여 시험에 사용하였다.

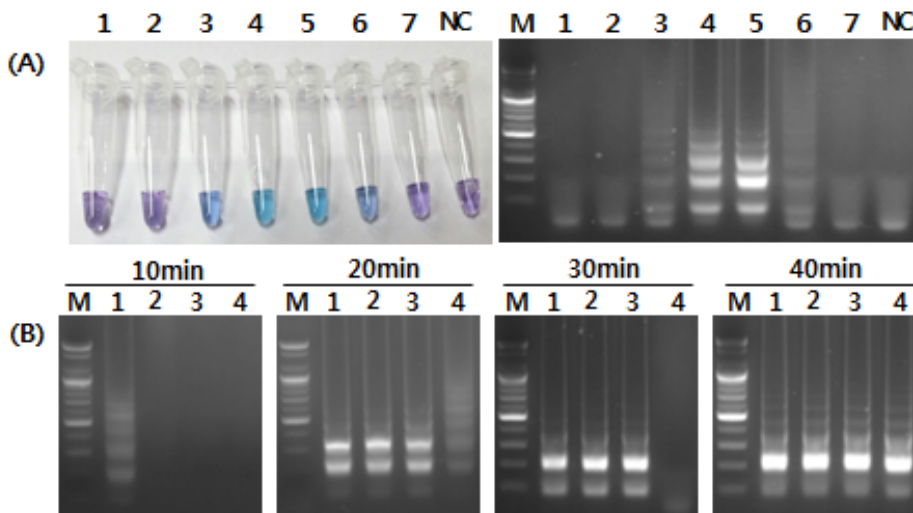
**야외시료에 대한 cPCR, rPCR 및 LAMP의 검출효율 비교**

야외 시료에 대한 개발 LAMP의 효용성을 평가하기 위하여 2015년 경북대학교 수의전염병제어센터에

**Table 2.** Virus and bacterial strains used in this study

Pathogen	Strain	Source*
Porcine circovirus 2	PCK0201	ADIC
Porcine circovirus 1	Field isolate	ADIC
PRRS virus, genotype 1	Lelystad virus	QIA
PRRS virus, genotype 2	LMY strain	QIA
Classical swine fever virus	LOM strain	Vaccine strain
Swine influenza virus	A/Korea/VD01/2009	QIA
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Field isolate	ADIC
<i>Pasteurella multocida</i>	Field isolate	ADIC
<i>Hemophilus parasuis</i>	Field isolate	ADIC
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Field isolate	ADIC

\*QIA, Animal and Plant Quarantine Agency; ADIC, Animal Disease Intervention Center, Kyungpook National University.



**Fig. 2.** Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) condition for amplification of the PCV2 DNA with different reaction temperatures (A) and reaction times (B). The best results of the LAMP were obtained at 63°C and 40 min. (A) Lane M; 100 bp DNA marker. Lane 1~7; different reaction temperature of 45, 50, 55, 60, 63, 65 and 68°C, respectively. (B) Lane M; 100 bp DNA marker, Lanes 1 to 4, 10-fold serial dilution of PCV2 DNA.

검사 의뢰되어 보관하고 있던 PCVD 이환농장의 돼지 조직시료 48점과 혈청시료 52점을 대상으로 전술한 방법으로 핵산을 추출한 다음, 개발 LAMP와 cPCR 및 rPCR을 실시하여 그 결과를 비교하였다.

## 결 과

### LAMP의 반응조건 확립

공시 PCV2에서 추출한 핵산을 이용하여 LAMP의 적정 반응온도를 탐색한 결과, 육안으로는 55, 60, 63 및 65°C에서 연청색(sky blue)의 HNB 특유 양성 색상이 관찰되었으며, 전기영동상으로는 63°C의 반응온도에서 특유의 사다리꼴 모양의 양성밴드가 가장 뚜렷하게 나타났다(Fig. 2A). 또한 반응온도를 63°C로 고정한 다음, 공시 PCV2에서 추출한 DNA를 10배수 단계희석한 다음, 각 희석액을 대상으로 LAMP 반응시간을 달리하여 증폭효율을 확인한 결과, 40 분간 반응시켰을 때 모든 희석배율에서 양성 밴드가 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2B). 따라서 이후의 모든 LAMP 실험은 반응온도와 시간을 63°C 및 40분으로 설정하여 진행하였다.

### LAMP의 특이도

개발 LAMP의 특이도를 확인하기 위하여 PCV2와 PCV1을 포함한 돼지 유래 병원체 10종 시료에서 추출한 핵산을 이용하여 개발된 RAMP를 실시한 결과, 공시 PCV2에서만 육안 및 전기영동으로 양성 증폭산물이 확인되어 개발된 LAMP가 PCV2의 ORF2 유전자

만을 특이적으로 증폭할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3).

### LAMP, PCR 및 rPCR의 민감도 비교

개발된 LAMP의 민감도를 측정하기 위하여 공시 PCV2 바이러스 배양액을 PBS로 10배수 단계 희석한 다음, 각 희석액에서 추출한 유전자를 대상으로 개발 LAMP와 cPCR 및 rPCR을 실시한 결과, 각각  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  및  $10^{-5}$  희석배수까지 검출되어 개발 LAMP가 기존의 cPCR 및 rPCR보다 10배 더 민감한 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이 연구에서 이용한 Kim 등(2009)의 개발 rPCR의 검출한계가 10 copy/ $\mu$ L로 보고되어 있음을 고려할 때 개발 LAMP의 민감도는 약 1 copy/ $\mu$ L인 것으로 추정된다.

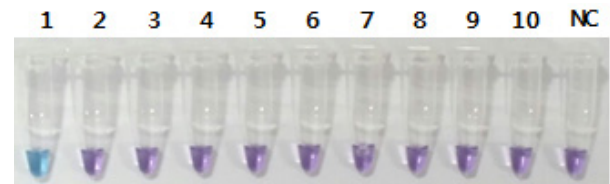


Fig. 3. Specificity of the loop-mediated isothermal amplification assay for porcine circovirus 2 DNA. Tube 1: porcine circovirus type 2, Tube 2: porcine circovirus type 1, Tube 3: porcine reproductive and respiratory syndrome virus, genotype 1, Tube 4: porcine reproductive and respiratory syndrome virus, genotype 2, Tube 5: classical swine fever virus, Tube 6: swine influenza virus, Tube 7: *Mycoplasma hyopneumoniae*, Tube 8: *Pasteurella multocida*, Tube 9: *Haemophilus parasuis*, Tube 10: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, NC: negative control.

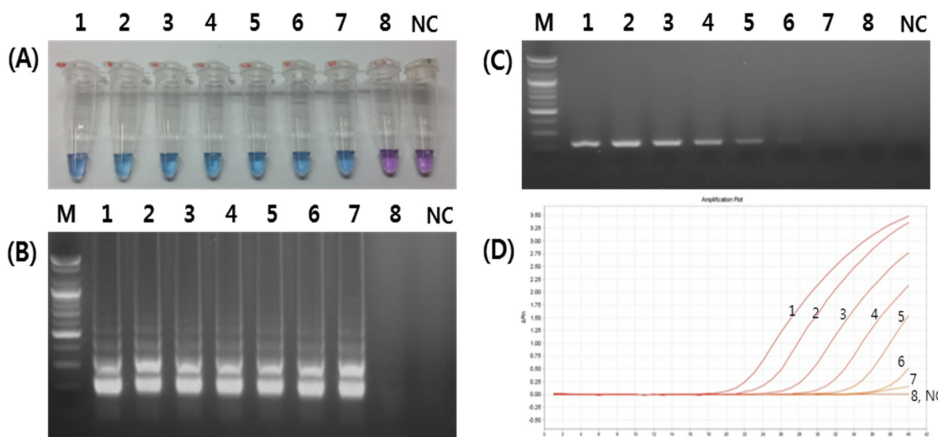


Fig. 4. Detection limit of the loop-mediated isothermal amplification (A and B), polymerase chain reaction (PCR) (C) and real time PCR (D) for amplification of the porcine circovirus 2 (PCV2) DNA. Lane M; 100 bp DNA marker, Lane 1~8; 10-fold serial dilution of PCV2 DNA.

**Table 3.** Porcine circovirus 2 DNA detection in clinical samples using the commercial PCR (cPCR) and real time PCR (rPCR) and LAMP assay

Sample	No. of sample	No. of PCV2 DNA positive (positive rate, %)		
		cPCR	rPCR	LAMP
Tissue	48	36 (75.0)	36 (75.0)	36 (75.0)
Blood	52	35 (67.3)	35 (67.3)	39 (75.0)
Total	100	71 (71.0)	71 (71.0)	75 (75.0)

### 야외시료에 대한 cPCR, rPCR 및 LAMP의 PCV2 검출효율 비교

야외 시료에 대하여 개발 LAMP와 기존 cPCR 및 rPCR을 실시하여 진단효율을 비교한 결과, 조직시료의 경우 48점 중에서 3종의 진단법에서 공히 동일 시료 36점이 양성으로 확인되어 진단효율에 차이가 없음이 확인되었다(Table 3). 그러나 혈액시료인 경우 기존의 cPCR 및 rPCR은 52점 중에서 35점이 양성으로 확인되었으나, 개발 LAMP로는 기존 cPCR 및 rPCR에서 음성인 시료 중 4점을 포함한 39점이 양성으로 확인되어 개발 LAMP의 검출효율이 더 우수한 것으로 나타났다(Table 3).

## 고 찰

PCVD의 원인체인 PCV2는 돼지에서 다양한 임상형 및 준임상형의 감염증을 유발하기 때문에 돼지질병 진단 실험실에서 가장 많이 진단이 이루어지고 있는 병원체 중의 하나이며, 현재 PCR이나 rPCR과 같은 PCR 기반 진단법이 보편적으로 사용되고 있다(Kim 등, 2011; Larochelle 등, 1999; Triple과 Rowland, 2012). 그러나 PCR 기반 진단법은 고가의 전용 장비와 시약을 필요로 하며, 숙련된 인력이 갖추어진 전문 실험실에서만 활용이 가능하므로 일선 임상실험실이나 현장 진단용으로 사용하기에는 제한이 있어 왔다. 이러한 PCR 기반 진단법의 단점을 극복할 수 있는 방법 중의 하나로 Notomi 등(2000)은 높은 특이도와 민감도를 가지면서도 등온조건 하에서 신속하게 목표 유전자를 증폭할 수 있는 LAMP 기법을 개발하였다. LAMP는 기법은 기존의 PCR 기반 진단법에서 사용되는 Taq DNA polymerase와 달리 목표유전자를 strand displacement 방식에 의해 대량 증폭할 수 있는 Bst

DNA polymerase를 이용함으로써 유전자 증폭효율이 월등하게 높을 뿐만 아니라 기존의 PCR 기반 진단법과는 달리 온도 변화가 없는 등온조건에서 유전자 증폭이 이루어지기 때문에 검사시간이 단축될 뿐만 아니라 항온수조와 같은 저가의 장비로도 반응이 가능하다(Dhama, 2014; Notomi 등, 2000). 따라서 전문 진단실은 물론 고가의 장비와 시약 및 전문인력이 확보되지 않은 소규모의 진단실이나 현장 진단용 등으로 그 응용범위는 더욱 확대될 것으로 예측된다. 이러한 LAMP의 장점에 따라 현재 LAMP는 세계적으로 다양한 세균, 기생충 및 바이러스성 질병의 진단에 널리 이용되고 있으며(Dhama 등, 2014; Mori 등, 2009). 한국에서도 최근 수의학 분야의 여러 연구자들이 LAMP 기법을 병원체 진단에 응용한 보고가 있으나 주로 세균성 질병인 결핵(Hwang 등, 2011; Koh 등, 2013), 살모넬라증(Cho 등, 2013), 대장균증(Dong 등, 2014), 증식성회장염(Park 등, 2015)에 대하여 적용되어 왔다. 바이러스성 질병에 대해서는 개 홍역(Cho 등, 2005), 낭충봉아부패병(Yoo 등, 2012) 및 돼지 인플루엔자(Kim 등, 2015)에 적용된 바 있으나 아직 PCVD의 진단에는 응용된 바 없다. 따라서 이 연구에서는 PCVD 감염증을 신속하게 진단할 수 있는 LAMP를 개발하여 현재 한국에서 널리 사용되고 있는 cPCR 및 기보고된 rPCR과 진단효율을 비교함으로써 상용 진단법으로서의 활용 가능성을 평가하였다.

LAMP는 목표유전자 염기서열의 8개 부위를 인식하는 6종의 primer를 이용함으로써 고도의 특이도와 민감도를 가지면서 신속하게 증폭되는 장점이 있지만 오히려 한정된 목표 유전자의 염기서열 내에서 특이적으로 반응하는 여러 쌍의 primer를 설계하기가 곤란하다는 것이 LAMP의 응용 범위를 제한하는 단점으로 작용해왔다(Dhama, 2014; Gandelman 등, 2011). 이 연구에서는 최근 10년간(2005~2014) GenBank에 등록된 PCV1 및 PCV2의 유전자 대상으로 가장 안정적인 부위를 탐색하여 LAMP용 primer를 선별하여 제작하였고(Table 1), 이를 이용하여 Table 2에 제시된 돼지 호흡기 및 전신성 질병 원인체를 대상으로 LAMP를 실시한 결과, PCV2 이외에는 반응이 일어나지 않아 개발된 primer가 PCV2에만 특이적으로 작동함을 확인하였다(Fig. 3).

개발 LAMP의 민감도를 기존에 보고된 cPCR (Ouardani 등, 1999, Median diagnostic, Korea) 및 rPCR (Kim 등, 2009)과 비교한 결과, 개발 LAMP의 검출한계는 cPCR 및 rPCR보다 10배 더 민감한 것으로 확인되어

이전에 PCV2 진단용 LAMP 개발자들이 기존 PCR보다 우수하다는 보고와 일치하였으며(Fig. 2), 반응시간에 있어서는 기 보고된 LAMP가 55~60분에 완료되는 것에 비하여 개발 LAMP는 40분에 반응이 완료되었다(Chen 등, 2008, Zhao 등, 2011, Zhou 등, 2011). 이와 같이 개발 LAMP는 기 보고된 LAMP와 동일한 수준의 민감도를 가지면서도 반응시간이 단축되기 때문에 일선 진단실에서 더 효율적으로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

LAMP의 결과를 판정하는 방법에 있어 Chen 등(2008)과 Zhao 등(2011)은 전기영동 및 탁도 변화를 관찰하여 판독하였으며, Zhou 등(2011)은 DNA 염색액인 SYBR green dye를 반응튜브에 첨가하여 판독하였다. LAMP 반응산물을 아가로스 젤 전기영동이나 DNA 염색액 첨가를 통하여 확인하는 경우, 반응 튜브를 개봉하여 증폭산물을 처리하는 과정에서 대량으로 증폭된 DNA가 실험실 환경을 오염시켜 다음 LAMP 과정에서 핵산 오염에 의한 오증폭을 유발할 가능성이 높다. 또한 LAMP 반응산물의 탁도 변화를 육안으로 관찰하여 판독하는 방법은 실험자에 따라 판독결과가 달라져 오류를 유발할 가능성이 문제점으로 지적되어 왔다(Zhang 등, 2014). 따라서 이 연구에서는 Goto 등(2009)이 보고한 HNB를 사전에 반응액에 첨가하여 반응결과를 판독하는 방법을 이용하였으며, 그 결과, Fig. 2와 같이 음성의 보라색에 비하여 양성인 하늘색의 반응 변화가 명확하게 나타났으며, 동일 반응산물에 대한 전기영동 결과에 비해 더 낮은 농도에서도 명확하게 판독할 수 있었다. 특히 HNB는 LAMP 이전의 반응액에 혼합한 다음, LAMP 완료 이후에 반응튜브를 개봉하지 않고도 반응결과의 확인이 가능하기 때문에 반응튜브의 개봉 및 증폭산물의 취급에 따른 오염문제를 근원적으로 해결할 수 있어 이전의 PCVD 진단용 LAMP 방법과 비교할 때 더욱 활용도가 높을 것으로 생각된다.

야외 임상시료에 대한 개발 LAMP의 진단효율을 평가하기 위하여 PCVD가 문제되고 있는 양돈장으로부터 채취한 조직과 혈액시료를 대상으로 개발 LAMP와 cPCR 및 rPCR을 실시한 결과, 조직시료(48점)에서는 3종의 진단법간 양성 및 음성 검출률이 동일하였으나, 혈액시료(52점)에서는 cPCR 및 rPCR보다 개발 LAMP의 검출률이 더 우수한 것으로 나타났다(Table 3). 이는 1차적으로 개발 LAMP의 민감도가 기존 cPCR 및 rPCR보다 우수하기 때문으로 생각되지만 특히 혈액시료에서 양성 검출률이 높았던 것은 Francois 등

(2011) 및 Kaneko 등(2007)의 보고한 바와 같이 LAMP가 PCR이나 rPCR에 비해 훨씬 안정적으로 반응하며, PCR이나 rPCR과 달리 미량의 혈액성분이나 항응고제 등과 같은 PCR 저해물질이 포함되더라도 반응에 크게 영향을 받지 않았기 때문인 것으로 해석된다. 이와 같은 결과로 볼 때, LAMP에 적절한 시료 전처리 방법과 휴대용 등온장치가 접목된다면 임상 현장의 다양한 시료에 대한 병원체 신속진단용으로 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결론적으로 이 연구를 통하여 민감도와 특이도가 높으면서도 신속한 PCVD 진단용 LAMP가 개발되었으며, 개발진단법은 기존 보고된 LAMP에 비하여 반응튜브의 개봉에 따른 핵산오염의 위험성 없이 육안으로 바로 반응결과를 판독할 수 있었다. 따라서 개발된 LAMP는 향후 PCVD 진단에 있어서 기존의 PCR이나 rPCR을 대체할 수 있는 진단법으로 널리 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 결 론

이 연구를 통하여 민감도와 특이도가 높으면서도 신속하게 PCV2 DNA를 진단할 수 있는 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)을 개발하였다. 개발 LAMP는 63°C에서 40분간 반응으로 진단이 완료되며, hydroxynaphthol blue dye를 이용함으로써 반응결과를 별다른 처리 과정 없이 바로 육안으로 판독할 수 있었다. 개발 LAMP의 민감도는 기 보고된 시판 중합효소연쇄반응(commercial polymerase chain reaction; cPCR) 및 실시간 PCR (real time PCR; rPCR) 보다 10배 정도 높은 것으로 확인되었다. 야외 임상시료에 대하여 개발 LAMP와 cPCR 및 rPCR을 실시한 결과, 조직시료에서의 PCV2의 검출률(75%, 36/48)은 동일하였으나, 혈액시료에서는 개발 LAMP의 검출률(75.3%, 39/52)이 cPCR 및 rPCR의 검출률(67.3%, 35/52) 보다 더 우수한 것으로 나타났다. 따라서 이 연구에서 개발된 LAMP는 기존의 cPCR이나 rPCR을 대체할 수 있는 PCV2 진단법으로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ009410),

농림축산식품부 · 해양수산부 · 농촌진흥청 · 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(과제번호 PJ009921), 농림축산식품부 가축질병대응기술개발사업(과제번호: 313-060-03-1-HD020) 및 농림축산검역본부 학술연구용역과제(과제번호 Z-1543069-2014-14-02)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

- Brunborg IM, Moldal T, Jonassen CM. 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *J Virol Meth* 122: 171-178.
- Chae C. 2012. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in Korea. *Virus Res* 164: 107-113.
- Chen HT, Zhang J, Suna DH, Chua YF, Cai XP, Liu XT, Luo XN, Liu Q, Liu YS. 2008. Rapid detection of porcine circovirus type 2 by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 149: 264-268.
- Cho AR, Dong HJ, Cho SB. 2013. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. by using a loop-mediated isothermal amplification assay in duck carcass sample. *Korean J Food Sci An* 33: 655-663.
- Cho HS and Park NY. 2005. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Med B* 52: 410-413.
- Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, Thomas P. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak J Biol Sci* 17: 151-166.
- Dong HJ, Cho AR, Hahn TW. 2014. Seongbeom Cho. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle. *J Vet Sci* 15: 317-325.
- Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenze IJ. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 41-48.
- Gandelman O, Jackson R, Kiddle G, Tisi L. 2011. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *Int J Mol Sci* 12: 9108-9124.
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* 46: 167-172.
- Hwang ES, Lee TU, Jung EY, Cho HS. 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification method for the rapid and sensitive detection of bovine tuberculosis in Korea native cattle. *Korean J Vet Serv* 34: 333-339.
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods* 70: 499-501.
- Kim EG, Hwang BW, Lee JM, Son BG, Park HJ, Kim TK. 2009. Rapid detection and quantification of porcine circovirus type 2 (PCV 2) DNA in real-time PCR. *Korean J Vet Serv* 32: 299-306.
- Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Kim HJ, Shin YK, Song JY, Yeo SG, Park CK. 2015. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of swine influenza virus. *Korean J Vet Serv* 38: 107-116.
- Kim HK, Luo Y, Moon HJ, Park SJ, Rho SM, Han JY, Nguyen VG, Park BK. 2011. Quantification and genotyping of PCV2 DNA in the tissues of PCV2-infected conventional pigs with different clinical signs. *Korean J Vet Res* 51: 7-14.
- Koh BRD, Kim JM, Sung CM, Ji TK, Na HM, Park SD, Kim YH, Kim ES. 2013. Loop-mediated isothermal amplification assay for differentiation of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis*. *Korean J Vet Serv* 36: 79-86.
- Larochelle R, Antaya M, Morin M, Magar R. 1999. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J Virol Methods* 80: 69-75.
- Lyo KS, Kim HB, Joo HS. 2008. Evaluation of a nested polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of porcine circovirus 2. *J Vet Diagn Invest* 20: 283-288.
- Mori Y, Notomi T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 15: 62-69.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: 63-69.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J Vet Diagn Invest* 19: 591-615.
- Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea S. 1999. Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses. *J Clin Microbiol* 37: 3917-3924.
- Park BY, Shim KS, Kim WI, Hossain Md M, Kwon JK, Park CK, Cho SJ, Jo IH, Cho HS. 2015. Rapid and sensitive detection of *Lawsonia intracellularis* in pigs by loop-mediated isothermal amplification. *Acta Vet Beo* 65: 20-29.
- Park CK, Kim HS. 2004. Detection of pathogens and isolation of porcine circovirus 2 from postweaning multisystemic wasting syndrome-affected piglets. *Korean J Vet Res* 44: 561-569.
- Segalés J, Allan GM, Domingo M. 2012. Porcine circoviruses. pp. 405-417. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ and Stevenson GW. *Diseases of Swine*, 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.



- Segalés J, Calsamiglia M, Olvera A, Sibila M, Badiella L, Domingo M. 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Microbiol* 111: 223-229.
- Trible BR, Rowland RRR. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res* 164: 68-77.
- Yoo MS, Noh JH, Yoon BS, Reddy KE, Kweon CH, Jung SC, Kang SW. 2012. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *J Virol Methods* 186: 147-151.
- Zhang XZ, Lowe SB, Gooding JJ. 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics* 61: 491-499.
- Zhao K, Shi W, Han F, Xu Y, Zhu L, Zou Y, Wu X, Zhu H, Tan F, Tao S, Tang X. 2011. Specific, simple and rapid detection of porcine circovirus type 2 using the loop-mediated isothermal amplification method. *Virology J* 8: 126.
- Zhou S, Han S, Shi J, Wu J, Yuan X, Cong X, Xu S, Wu X, Li J, Wang J. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for detection of porcine circovirus type 2. *Virology J* 8: 497.