

발 간 등 록 번 호

11-15410000-001037-01

**소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증에 대한
역학조사 및 진단키트의 산업화
(Epidemiological survey and industrialization of
diagnostic kits of bovine and porcine group C
rotavirus)**

소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증 진단키트 산업화
(Industrialization of diagnostic kits of bovine and porcine
group C rotavirus)

국내 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증 역학조사
(Epidemiological survey of diagnostic kits of bovine
and porcine group C rotavirus)

소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 생산
(Production of specific antibody against bovine and porcine group
C rotavirus)

(주)중앙백신연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증에 대한 역학조사 및 진단키트의 산업화 ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 05 일

주관연구기관명 : (주)중앙백신연구소

주관연구책임자 : 윤 인 중

세부연구책임자 : 윤 인 중

연 구 원 : 우 상 규

연 구 원 : 이 승 철

연 구 원 : 한 미 정

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 조 경 오

협동연구기관명 : 충북대학교

협동연구책임자 : 강 신 영

요 약 문

I. 제 목

소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증에 대한 역학조사 및 진단키트의 산업화
(Industrialization of diagnostic kits of bovine and porcine group C rotavirus)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인간과 가축에서 혈청형 C 로타바이러스 감염증이 막대한 피해를 유발함에도 불구하고 예방이 어려운 것은 혈청형 C 로타바이러스가 분리가 어렵고, 이 바이러스가 11개의 분절화 된 이중쇄 RNA 지놈을 가지고 있기 때문이다. 즉, 지놈의 핵산이 RNA로 되어 있어서 돌연변이가 자주 발생하며, 또한 지놈이 분절화 된 11개로 구성되어 있어서 마치 인플루엔자 바이러스와 유사하게 reassortment가 발생할 가능성이 높기 때문이다. 이러한 혈청형 C 로타바이러스 지놈 특성상 축종간 혹은 인수공통간 전파가 이루어지고 있다고 추정된다. 이와 같이 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스는 국내에서 다발하고 있는 것으로 추정되고 있다. 하지만 지역별, 사양조건별, 계절별, 연령별 발생역학상황이나 진단법이 부재한 것이 현실이며 따라서 국내에서도 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스에 대한 자세한 역학조사와 진단키트를 산업화 시켜서, 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스의 발생을 억제함으로써, 양돈농가의 소득증대 및 진단산업의 활성화를 도모 하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 야외 소, 돼지 설사분변의 채취 및 RT-PCR, nested PCR, PAGE법에 의한 혈청형 C 로타바이러스 검출
2. 돼지 혈청형 C 로타바이러스 야외 감염증례에 대한 병리학적 및 면역조직화학적 연구
3. 국내 발생주에 대한 단클론 및 다클론 항체 생산
4. 소, 돼지 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One step/Rapid 진단키트 제작

IV. 연구개발결과에 대한 요약

1. 야외 소, 돼지 설사분변의 채취 및 RT-PCR, nested PCR, PAGE법에 의한 혈청형 C 로타 바이러스 검출

돼지 혈청형 C 로타바이러스는 국내 양돈장 자돈설사의 26.3%에서 검출되어 지역 유행으로 문제되고 있음을 알 수 있었다. 이 중에서 단독감염은 오직 12.4%이었으며, 나머지 13.9%은 혈청형 A 로타바이러스, 돼지 사포바이러스, 대장균, 살모넬라균들과 혼합감염되어 있었다. 돼지 혈청형 A 로타바이러스는 추운 계절인 봄과 겨울에 다발하는 경향을 보였다. 즉 봄에는 41개 설사분변 중에서 16개 (44.0%), 여름에는 25개 설사분변 중에서 6개 (17.0%), 가을에는 22개 설사분변 중에서 한 개 (3.0%), 겨울에는 49개 설사분변 중에서 13개 (36.0%)가 양성이었다. RT-PCR을 통해 증폭되어 sequencing 된 국내 돼지 혈청형 C 로타바이러스 24개 중에서 23개는 돼지 혈청형 C 로타바이러스 표준주인 Cowden 및 WD534tc strains과 높은 유전자 상동성 및 계통학적으로 같은 lineage에 속해있었다. 하지만 나머지 한 개의 것은 소 혈청형 C 로타바이러스인 Shitoku 주와 Yamagata strains와 높은 유전자 상동성 및 계통학적으로 같은 lineage에 속해 있었다. 소 혈청형 C 로타바이러스는 국내 송아지 설사의 5.51%에서 검출되어, 국내 송아지 설사에 산발성으로 문제되고 있음을 알 수 있었다. 이 중에서 단독감염은 오직 2.23%이었으며, 나머지 2.17%은 혈청형 A 로타바이러스, 소 바이러스성 점막병 바이러스, 소 노로바이러스, 소 네브래스카 양 칼리시바이러스와 혼합 감염되어 있었다. Nested-PCR을 통해 증폭되어 sequencing 된 국내 소 혈청형 C 로타바이러스 7개 중에서 2개는 소 혈청형 C 로타바이러스인 Shitoku 주와 Yamagata strains와 높은 유전자 상동성 및 계통학적으로 같은 lineage에 속해 있었다. 하지만 나머지 5개는 돼지 혈청형 C 로타바이러스 표준주인 Cowden 및 WD534tc strains과 높은 유전자 상동성 및 계통학적으로 같은 lineage에 속해있었다.

2. 혈청형 C 로타바이러스 야외 감염증례에 대한 병리학적 및 면역조직화학적 연구

돼지 혈청형 C 로타바이러스 양성 자돈의 소장 병변을 조직학적으로 검사한 결과, 바이러스성 장염의 특징적인 소견인 융모의 위축 및 융합, 이로 인한 음와의 증식과 융모 고유층에는 림프구들이 침윤되어 있었다. 혈청형 C 로타바이러스 검출용 단클론 항체의 특이성을 검사하기 위해 돼지 혈청형 C 로타바이러스 표준주인 Cowden 및 국내 분리주에 대하여 IFA를 수행한 결과 모두 양성의 반응이 관찰되어, 단클론 항체의 특이성을 검증할 수 있었다. 이를 이용하여 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 감염된 자돈의 소장 병변에 대하여 면역조직화학적 검사를 수행한 결과, 양성의 반응을 융모상피 세포에서 검출할 수 있었다.

3. 국내 발생주에 대한 단클론 및 다클론 항체 생산

돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 대조군으로 사용한 돼지 C형 로타바이러스 표준주인 Cowden strain과 설사분변에서 모두 1,188bp 크기의 유전자를 증폭하여, Baculovirus expression system에서 발현한 VP6 단백을 면역원으로 하여 세포융합을 실시하여, 7개의 돼지 C형 로타바이러스 VP6 특이 단클론 항체를 생산 하였으며 4개의 단클론항체(2A4, 3F7, 5E4, 9B3)의 isotype은 IgG1, 2개의 단클론항체(4B5, 4B9)는 IgG2b, 그리고 7E7은 IgG2a로 확인되었으며, 이들 모두 A형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpAVP6와 IFA법으로 반응하지 않았으나 C형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC 6-2와 돼지 C형 로타바이러스 표준주인 Cowden strain과는 특이적으로 반응하였다. 소 C형 로타바이러스 역시 VP6 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행하고 Baculovirus expression system에서 발현한 VP6 단백을 면역원으로 하여 세포융합을 실시한 결과, 5개의 소 C형 로타바이러스 VP6 특이 단클론항체를 생산하였으며 3개의 단클론항체(5F6, 6A3, 6C9)의 isotype은 IgG1, 2개의 단클론항체(2A4, 6A12, 6B3)는 IgG2b 대부분의 단클론항체의 isotype은 IgG1과 IgG2b로 확인되었다. 생산된 단클론항체 모두 A형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpAVP6와 IFA법으로 반응하지 않았으나 본 연구에서 작성한 C형 소 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC136-1와 rGpC 6-2와 국내분리 돼지 C형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC6-2와는 특이적으로 반응하였다. 하지만 6개의 단클론항체(1G2, 2A4, 2B11, 2B12, 4D9, 5F3)는 돼지 C형 로타바이러스 표준주인 Cowden strain의 VP6 재조합바이러스인 rGpC Cowden과는 특이적으로 반응을 하지 않았다. 복합항체 생산에는 토끼를 사용하며 각각 baculovirus 발현 소/돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백질을 항원으로 사용하였다. 정제된 항원(100 μ g/ml)을 동량의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합한 뒤 토끼의 근육 및 피하로 1차 접종하고, 3주 후 같은 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 잘 혼합하여 같은 경로로 2차 접종하였다. 3주 후, 2차 접종과 같은 방법으로 3차 접종하고, 2주 후 채혈하여 소 C형 로타바이러스 VP6에 대한 항체역가를 IFA법으로 측정하였다. 소 C형 로타바이러스 VP6에 대한 항체역가가 충분히 높을 경우에는 채혈하여 혈청을 분리하여 -20 $^{\circ}$ C에 저장하고 항체역가가 낮을 경우에는 3차 접종과 같은 방법으로 추가 접종하였다. 생산된 복합항체의 역가 및 A형 로타바이러스와의 반응 여부는 IFA법으로 확인하였다. 두 마리의 토끼로부터 총 50ml 정도의 항혈청을 생산하였으며 VP6에 대한 반응성을 IFA법으로 확인한 결과, A형 로타바이러스와는 반응하지 않았으며 6,400배의 희석 에서 C형 로타바이러스 VP6에 대하여 양성으로 나타났다.

4. 소, 돼지 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One step/Rapid 진단키트 제작

제조된 단클론 항체의 소, 돼지 혈청형 C 로타바이러스의 검출을 위해 capture와 detector의 pairing 예비시험에서 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스와 교차반응을 보이며 그 외의 설사 유발 바이러스 등과는 교차반응을 보이지 않으면서 반응성이 우수한 항체로 capture는 7E7, detector는 5E4로 선별 하고 이를 각각 신속 면역크로마토그래피 검사(Rapid) 및 direct one-step ELISA 검사법에 이용 하였다. Rapid 검사법에는 7E7 항체를 희석용 완충액(10 mM 붕산염 완충액) 으로 2.5 mg/ml로 희석한 후 니트로 셀룰로즈 멤브레인용 분주기를 이용하여 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 비율로 니트로셀룰로즈 멤브레인에 분주하여 $1.6\pm 0.1\ \mu\text{g}/\text{Device}$ 로 제조하여 검사선으로 사용 하였다. 산양- 항 및 마우스 면역 글로불린을 완충액(10 mM 붕산염 완충액) 으로 농도가 2.5 mg/ml이 되도록 희석하여 만든 용액을 멤브레인용 분주기를 이용하여 $1\ \mu\text{l}/\text{cm}$ 비율로 니트로셀룰로즈 멤브레인에 분주하여 $1.0\pm 0.1\ \mu\text{g}/\text{Device}$ 로 제조하여 대조선으로 사용 하였다. Gold chloride solution에 Na-citrate를 첨가하여 gold chloride를 환원시켜 입자 크기가 약 40 nm인 Colloidal gold를 생성시킨 후 5E4 항체 및 마우스 면역글로불린 G를 각각 100ug/ml을 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 진탕 반응 시킨다. 반응이 완료된 금 입자를 세척하고 흡광도계를 이용하여 520nm에서 흡광도 값을 측정하여 정량한 후 각각의 항체 골드 콘주게이트를 혼합하여 유리섬유에 $0.4\text{cm}\pm 0.04\times 0.5\pm 0.05\text{cm}$ 당 $50\mu\text{l}$ 를 사용하여 균질하게 흡수시키고 습도 20% 이하 상태에서 4시간 이상 건조하여, 코팅한 멤브레인의 하단에 골드 콘주게이트 패드와 검체 패드를 순차적으로 중첩되도록 부착하고 상단 에는 흡수 패드를 부착한다. 이 시험지를 전용 절삭기를 사용하여 $4.0\pm 0.4\text{mm}\times 60\pm 6.0\text{mm}$ 규격으로 절단하고 시험에 사용 하였다. ELISA 검사법 에서도 선별된 7E7를 microplate에 1ug/ml농도를 100ul/well 를 흡착시키고 18시간 진공 건조 하였다. 5E4항체를 HRPO(Horse raddish peroxidase : Sigma)와 1:4의 접합 비율로 접합하여 conjugate로 사용 하였다. 전남대학교에서 PCR 및 nested PCR로 양성 판정한 20검체와, 음성 판정된 85검체의 분변검체를 이용하여 시험한 결과 Rapid에서는 민감도 57.8% 특이도 89.5% , ELISA에서는 민감도68.4% 특이도 94.1%를 보였다. 민감도를 높이기 위한 복합항체와 indirect 검사법은 검사효율면 에서 뚜렷한 개선 효과를 보이지 않았다. 이는 group C로타바이러스가 분변으로 shedding되는 농도가 낮은 것에 기인하는 것으로 사료된다. 그럼에도 금번 연구에서 도출된 kit는 차후 혈청형 A와 혈청형 C 로타바이러스의 감별 진단에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 본 연구결과는 향후 돼지 및 소 혈청형 C 로타바이러스 방역대책 확립에 활용할 수 있으며, 백신개발 및 치료제 개발에도 활용할 수 있을 것임
2. 본 연구를 통해 확립된 돼지 및 소 바이러스성 장염 진단용 RT-PCR 및 nested PCR은 국립수의과학검역원을 비롯하여 각 일선 방역기관에서 돼지 바이러스성 장염 진단법으로 활용할 수 있을 것임.
3. 본 연구를 통해 개발된 돼지 혈청형 C 로타바이러스 특이 단클론 항체는 향후 수의과학 검역원 및 일선 방역기관에서 혈청형 C 로타바이러스를 검출하기 위한 면역조직화학적 검사 방법에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대됨.
4. 본 연구를 통해 개발된 ELISA 법은 소, 돼지 C형 로타바이러스와 A형 로타바이러스의 감별 진단 Kit개발에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

SUMMARY

Viruses in the genus Rotavirus (family Reoviridae) are the major etiologic agents of severe, acute dehydrating diarrhea in humans and in a wide variety of domestic animals. The viral particles are triple-layered and contain a genome consisting of 11 double-stranded RNA segments. Therefore, rotaviruses can undergo genetic reassortment during mixed infections, leading to progeny viruses with novel or atypical phenotypes. A viral protein VP6 is located in the middle layer and exposes group specific antigens. Based on antigen characteristics of VP6, rotaviruses are classified into seven groups (A - G) with only groups A - C causing disease in both humans and animals. Group C rotavirus (GCRV) was first detected in pigs in 1980 and has been subsequently identified in humans, ferrets, and cattle. Since then, the global distribution of human GCRVs has been established; they are suspected of being an emerging pathogen. Fecal shedding of porcine GCRVs has been reported in nursing, weaning, and post weaning pigs with diarrhea either alone or in mixed infection with other enteric pathogens. Moreover, porcine GCRVs are wide spread in swine herds; in limited surveys, antibody prevalence against GCRVs in pigs is 28 - 70% by 8 weeks of age, increasing with age to reach 79 - 100% in adult pigs. However, the epidemiological significance of these observations is limited, given the limited number of studies and restricted geographical scope of such investigations. A possible explanation may be that sensitive tests for detection are not available. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using group C-specific primers is a sensitive and convenient option, however, it has not been widely used. Like group A rotaviruses (GARVs), sequence comparison suggests that genetic diversity exists among GCRVs . However, the molecular analysis of the porcine GCRVs has only been carried out in the United States . Therefore, it is unclear if the porcine GCRVs circulating in other countries have distinct genetic characteristics. In addition, a possible zoonotic role of animal GCRVs has been postulated based on increase sero-prevalence rates to GCRVs in human populations living in rural settings. Direct evidence for the zoonotic potential of porcine GCRVs has been gained by analyses of archival fecal samples of Brazilian children. Furthermore, GCRV surveillance has detected interspecies transmission by GCRVs between animal species; bovine strain WD534tc is actually a porcine strain. Therefore, the detection of animal-like GCRVs in

humans has highlighted the potential zoonotic impact of animal GCRVs for humans, stressing the need for a more in-depth study of the epidemiology of animal GCRVs, particularly in developing countries where humans and animals, or animals and animals often live in close physical contact, making mixed infections more common. To date, no GCRV infection either in animals or in humans has been reported from South Korea. Molecular characterization of porcine GCRVs in South Korea is needed for vaccine development efforts and evaluation, as well as for clarification of the ecology and evolution of GCRVs. Sequence data of the genes from many different countries would provide the fundamental data necessary for the development of more sensitive and specific diagnostic tools that could be used to determine the worldwide distribution of the virus. This study reports the prevalence of porcine GCRVs in diarrheic piglets using RT-PCR, along with the genetic diversity of the porcine/bovine GCRV strains based on a partial porcine/bovine GCRV VP6 gene. In order to determine the molecular epidemiology of porcine/bovine group C rotaviruses circulating in Korea, over 100 diarrheic fecal samples were collected throughout the Korean pig farms. RT-PCR utilizing primer pairs specific for the GCRV VP6 gene detected GCRV-positive reactions in 36 (26.2%) diarrheic fecal samples. Of these, 17 samples (12.4%) tested positive for porcine GCRVs alone and 19 samples (13.8%) were also positive for other pathogens. Other enteric pathogens except for GCRV were detected in 64 feces samples (46.7%) and no enteric pathogens were evident in 37 feces samples (27.0%). Phylogenetic and sequence homology analyses of GCRV partial VP6 gene between 23 Korean and other known porcine GCRVs demonstrated that Korean strains belonged to the porcine lineage. Furthermore, one Korean porcine strain shared the highest nucleotide (89.7–89.0%) and deduced amino acid sequence (92.9–93.9%) identities with bovine GCRV strains and was placed in the bovine GCRV lineage indicative of bovine origin. In conclusion, porcine GCRV infections are widespread in piglets with diarrhea in South Korea. The infecting porcine GCRVs mostly belong to the porcine lineage with the exception of one bovine-like GCRV, which possibly originated from bovine GCRV due to interspecies transmission. Seven of the 127 fecal samples (5.5%) from seven of the 52 herds (13.5%) tested positive for bovine GCRVs only by nested PCR. Sequence and phylogenetic analyses showed that Korean bovine GCRVs had marked genetic diversity; two Korean strains belonged to the bovine lineage, whereas five Korean strains belonged to the porcine lineage. These results suggest that the bovine GCRVs cause sporadic infections in diarrheic calves in South Korea, and have genetic diversity. Future studies should

address whether interspecies transmissions are caused by totally homologous GCRV strains to those of the porcine or reassortant GCRV strains between bovine and porcine GCRVs.

Histopathological examination showed that piglets infected with group C rotaviruses had intestinal lesions including the villi atrophy and fusion, crypt hyperplasia, and lymphoid cell infiltration in the lamina propria, characteristics of viral enteritis. Monoclonal antibody against group C rotavirus VP6 protein identified specific antigen in the cytoplasm of cells infected with both a reference Cowden and Korean strains, indicating its specificity to group C rotavirus. Immunohistochemical staining with above monoclonal antibody detected group C rotavirus antigen in the epithelial cells of villi from the piglets infected with group C rotavirus, indicating its high practical use to diagnosis of group C rotavirus.

For the purpose of developing an one-step Rapid and direct ELISA kit using group C porcine/bovine rotavirus VP6 -specific monoclonal antibodies(Mab), 7 mAbs for porcine and 5 mAbs for bovine were produced by fusion of SP2/0 myeloma cells with spleen cells from mouse immunized with group C porcine/bovine rotavirus VP6 protein respectively. Among these monoclonal antibodies , 7E7 mAb for capture and 5E4 mAb for detector were best pair for Rapid/ direct ELISA. As a result of preliminary test, these two mAb were group C porcine rotavirus VP6 -specific and had a common epitope with porcine/bovine group C VP-6 protein. In Rapid test, the test strip is composed of nitrocellulose membrane, dried gold particle pad, absorbent pad and sample pad. The nitrocellulose membrane is immobilized with 7E7 mAb test line region, Goat anti mouse IgG on the control line region. During the assay, fecal sample flows laterally through a sample pad and a gold conjugate pad where it mixed with the color reagent. If the fecal contains porcine/bovine group C rotavirus antigen, 5E4 mAb - gold conjugate binds to the antigen , forming a complex of 5E4 mAb - gold conjugate and antigen. The complexes then migrate chromatographically through the nitrocellulose strip by the capillary action. The antigen and 5E4 mAb-gold complexes move through the immobilized 7E7 mAb on test line region and then on to control line region. In ELISA kit , also 7E7 mAb were immobilized on to the microtiter plate for the capture antibody. 5E4 mAb were conjugated with HRPO (horse-raddish -peroxidase) and TMB were used as a substrate. With 19 positive fecal samples and 86 negative fecal samples were confirmed by PCR and nested PCR at Chonnam university, the sensitivity were shown

57.8% and 68.4% to Rapid and ELISA respectively. And the specificity were shown 89.5% ,94.1% to Rapid and ELISA. In order to enhance the sensitivity, using polyclonal antibody and indirect methods were not effective to diagnostic efficacy.

In spite of low density of shedding group C rotavirus particles into stool, these Rapid and ELISA kit are useful for discriminating diagnosis for porcine/bovine Group A and C rotavirus.

CONTENTS

Application-----	1
Abstract-----	2
Summary-----	7
Contents(in English)-----	11
Contents(in Korean)-----	13
Chapter 1. Introduction-----	15
1. The necessity and Importance-----	15
Chapter 2. Present state in the techniques -----	23
1. Present state of Internatinal techniques -----	23
2. Present state of our related techniques-----	25
Chapter 3. Purpose and Methods -----	27
1. Purpose of research development -----	27
2. Detailed annual plan-----	27
1) First year development purpose and plan -----	27
2) Second year development purpose and plan -----	28
3) Third year development purpose and plan -----	29
3. Methods of research development -----	30
1) Epidemiology of group C porcine and bovine rotavirus-----	30
① Epidemiology of group C porcine rotavirus-----	30
② Epidemiology of group C bovine rotavirus-----	32
③ Study of pathology and immnology of field case-----	34
2) Production of specific mAb against porcine and bovine group C rotavirus-----	34
① Production of specific mAb against porcine group C rotavirus-----	34
② Production of specific mAb against bovine group C rotavirus-----	41
③ Production of specific polyantibody against porcine and	

bovine group C rotavirus -----	41
3) Poduction and industrization of Rapid and ELISA kit for the detection of porcine and bovine group C rotavirus antigen-----	42
① Production of Rapid kit-----	42
② Production of ELISA kit-----	44
③ Study for sensitivity and specificity of Kits-----	45
4. Results -----	47
1) Epidemiology of group C porcine and bovine rotavirus-----	47
① Epidemiology of group C porcine rotavirus-----	47
② Epidemiology of group C bovine rotavirus -----	50
③ Study of pathology and immnology of field case-----	55
2) Production of specific mAb against group C porcine and bovine rotavirus-----	60
① Production of specific mAb against porcine group C rotavirus-----	60
② Production of specific mAb against bovine group C rotavirus-----	68
③ Production of specific polyantibody against porcine and bovine group C rotavirus-----	71
3) Poduction and industrization of Rapid and ELISA kit for the detection of porcine and bovine group C rotavirus antigen-----	72
① Production of Rapid kit-----	72
② Production of ELISA kit-----	78
③ Study for sensitivity and specificity of Kits-----	83
④ Ficture of sample,specification of Rapid and ELISA Kit-----	87
Chapter 4. Evaluation and Contribution related fields -----	90
Chapter 5. Achievement and Plan of practical use-----	92
Chapter 6. Science and Technology Information -----	95
Chapter 7. References -----	96

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	7
CONTENTS(영문목차)	11
목차	13
제 1 장 연구개발의개요	15
제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 1 절 국내외 기술개발 현황	23
제 2 절 본 연구팀의 선행연구 수준	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	27
제 1 절 연구개발의 목표 및 내용	27
제 2 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용	27
1. 1차년도 개발목표 및 개발내용	27
2. 2차년도 개발목표 및 개발내용	28
3. 3차년도 개발목표 및 개발내용	29
제 3 절 연구개발 수행 방법	30
1. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사	30
가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사	30
나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사	32
다. 야외증례에 대한 병리 면역학적 연구	34
2. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 제작	34
가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이항체 제작	34
나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이항체 제작	41
다. 돼지,소 C형 로타바이러스 특이 복합항체 생산	41
3. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA	

및 One/step Rapid Kit 제조 및 산업화-----	42
가. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 Rapid Kit 제작-----	42
나. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA Kit 제작-----	44
다. 돼지,소혈청형 C로타바이러스 항원 검출용 Raipid, ELISA Kit의 민감도, 특이도 시험-----	45
제 4 절 연구개발 수행 결과 -----	47
1. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사-----	47
가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사-----	47
나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사-----	50
다. 야외증례에 대한 병리 면역학적 연구-----	55
2. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 제작-----	60
가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이 단클론항체 제작-----	60
나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이 단클론항체 제작-----	68
다. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 특이 복합항체 제작-----	71
3. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 Rapid, ELISA Kit 제조 및 산업화-----	72
가. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 Rapid Kit 제작-----	72
나. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA Kit 제작-----	78
다. 돼지,소혈청형 C로타바이러스 항원 검출용 Rapid, ELISA Kit의 민감도, 특이도 시험-----	83
라. Rapid 및 ELISA Kit의 시제품 견본사양 및 specification-----	87
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	90
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	92
1. 실용화산업화 계획(기술실시 등)-----	92
2. 교육지도홍보 등 기술확산 계획 등-----	92
3. 특허,품종,논문 등 지식재산권 확보계획 등 -----	92
4. 추가연구, 타연구에 활용 계획-----	92
5. 제품 상업화시 접근 가능한 시장에 대한 분석-----	93
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	95
제 7 장 참고문헌 -----	96

제 1 장 연구개발의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성

1. 기술적 측면

진단키트는 개체의 병원균 감염, 신체변화 또는 건강상태 등을 검사하기 위해서, 개체로부터 채취한 혈액, 분변, 소변, 분비물 등을 이용하여, 체외에서 손쉽고 간편하게 체크할 수 있도록 개발한 의약품의 일종이다. 최근 조류독감, SARS, 광견병, 노로바이러스, 부르셀라증 등 기존 혹은 새로운 질병이 부각됨으로써 시장 확대가 예상된다. 따라서 정부에서도 “진단키트” 등의 10개 산업을 신성장 동력산업으로 선정하여(2003.7) 추진하는 등 진단키트 산업이 주목을 받고 있으며 2005년 한국과학기술정보연구원 보고에 의하면, 키워드 및 동시발생 분석에서 추출된 28개의 후보 아이템 군에 대해 시장규모, 시장성숙단계, 혁신성 및 메가트랜드 부합도에 따라 평점을 부여한 결과, 상위 10대 아이템은 모두 바이오산업 내 아이템에 해당되며, 진단키트의 경우 평가결과 13위에 랭크될 정도로 중요산업임을 알 수 있다. 이러한 진단키트에 사용되는 기술에는 면역분석기술, 분자생물학적 기술, 바이오칩 등이 있으며(2005년 한국과학기술정보연구원) 진단키트 기술 중에서 현재 가장 많이 사용되고 있는 것이 면역분석기술을 이용한 것이다. 면역기술을 이용한 진단키트 중에서 가장 많이 사용되고 있는 기술은 다수의 시료를 한꺼번에 검사할 수 있는 ELISA 진단키트, 일반적으로 소변검사 등의 개별시료 형태로 검사할 수 있는 Immunoblot 진단키트, 병원체나 혈당 등 일반인인 손쉽게 사용할 수 있도록 제작된 One Step/Rapid 진단키트가 있다. 이러한 면역분석 기술은 단일클론항체 개발로 더욱 발전하게 되었음. 즉 기존 면역분석 진단키트의 민감도, 특이도, 재현도, 신속성, 간편성, 경제성을 한 차원 높이는데 크게 기여하였을 뿐 아니라 면역분석 기술은 선진국은 물론 국내에서도 보편화된 기술이며, 국내에서 전염성 질환, 암, 임신진단, 혈당검사 등 다방면에서 사용되고 있다. 따라서 관건은 국내는 물론 전 세계적으로 연구·개발되어 있지 않는 중요한 아이템에 대해 집중적으로 연구·개발하여 해당 아이템에 대해 특허를 취득하고 상품화 및 산업화 시켜야 한다는 것이다. 국내는 물론 전 세계적으로 바이러스 자체뿐만 아니라 진단키트에 대해서 연구·개발되어 있지 않는 가축의 전염성 질병 중 하나가 바로 “혈청형 C 로타바이러스”이기 때문에 개발의 필요성이 있다. 동물과 사람에서 설사를 유발하는 로타바이러스는 바이러스 VP6 항원에 대한 반응성 및 polyacrylmade electrophoresis pattern에 의하여 A부터 G까지 총 7개의 group으로 분류되고 있다(그림1-1).

List of Rotavirus Species in the Genus

- The rotaviruses are currently divided into five species (RV-A to RV-E) with two possible additional species (RV-F and RV-G).

Species in the Genus

- *Rotavirus A* (RV-A) { Human & Animal }
- *Rotavirus B* (RV-B) { Human & Animal }
- *Rotavirus C* (RV-C) { Human & Animal }
- *Rotavirus D* (RV-D) { Chicken }

- *Rotavirus E* (RV-E) { Porcine }

Tentative Species in the Genus

- *Rotavirus F* (RV-F) { Chicken }
- *Rotavirus G* (RV-G) { Chicken }

• Estes, 2001. *Fields Virology* p. 1747–1785.

Fig1-1. 로타바이러스 혈청형 분류.

이 중에서 사람과 동물에 모두 설사를 유발하는 것은 혈청형 A, B, C 로타바이러스가 있다. 그 외 혈청형 D-G는 지금까지 돼지와 닭에 설사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 로타바이러스 중에서 사람과 동물에 가장 피해를 입히는 것은 혈청형 A 로타바이러스이며, 원인으로서는 혈청형 A 로타바이러스가 사람과 동물에 병원성이 높기 때문이며, 혈청형 A 로타바이러스가 세포배양으로 쉽게 분리되어, 이에 대한 진단법, 기병론, 백신개발 등에 대해서 많은 연구가 되었기 때문으로 사료된다. 이에 반해 혈청형 C 로타바이러스는 돼지, 소, 사람 등에 설사를 유발하는 것으로 알려져 있지만 이에 대한 경제적 피해 상황이 잘 알려져 있지 않은 이유로는, 배양이 까다로워 세포배양을 통한 바이러스 분리가 어렵고, 이로 인하여 이 바이러스에 대한 진단법, 기병론, 백신개발 등에 대한 연구가 미진하기 때문이다. 현재까지 분리된 혈청형 C 로타바이러스로는 돼지에서는 Cowden strain, 소에서는 Shintoku strain 및 돼지 유형의 WD534tc strain, 그리고 사람에서는 Ehime 9301 strain 등 소수에 그치고 있다. 하지만 돼지와 소의 혈청형 C 로타바이러스 감염증은 전 세계적으로 걸쳐 돼지와 소에 심각한 피해를 유발하고 있는 것으로 추정되고 있다. 기존의 보고에 의하면 혈청형 C 로타바이러스에 대한 항체가가 8주령의 돼지에서 28-70%에 달한다고 하며, 이러한 항체가가 연령이 증가함에 따라 급속히 증가하여 성돈에서는 79-100%에 이른다. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 항체는 돼지보다는 낮지만 24-56%에 달하며 혈청형 C 로타바이러스는 특히 포유자돈, 이유자돈 및 육성돈에 심한 설사와 구토를 유발하여 막대한 경제적 피해를 유발시킨다. 혈청형 C 로타바이러스는 단독감염뿐만 아니라 혼합감염 형태로 발생하여,

혼합감염인 경우에는 더욱 더 심각한 경제적 피해를 유발한다. 최근 이탈리아 양돈장에서 발생하고 있는 혈청형 C 로타바이러스에 대한 연구에서, 혈청형 C 로타바이러스(전체 가검물 중에서 28.7% 발생률)는 혈청형 A 로타바이러스 다음으로 가장 많이 발생하고 있으며, 하지만 혈청형 A 로타바이러스와 달리 혈청형 C 로타바이러스는 검사한 모든 농가에서 검출되었다. 국내에서는 새끼 돼지와 송아지 설사가 크게 문제되고 있어서 막대한 경제적 피해를 유발하고 있다고 보고 되었다. 국내 양돈농가에서 한번 발생하면 막대한 경제적 피해를 유발하는 돼지 유행성 설사(PED)와 돼지 전염성 위장염(TGE)이 크게 부각되고 있다. 하지만 이 질병들은 국내에서 매우 드물게 발생하고 있는 것이 현실이다. 이에 반해 복단위로 발생하고 있는 포유자돈, 이유자돈, 육성전기 자돈의 설사가 양돈농가에서는 더욱 문제이다. 왜냐하면 이러한 산발성 설사는 모든 농가에서 발생하고 있어서, 양돈농가에 고질병으로 취급되고 있으며, 막대한 경제적 피해를 유발하고 있기 때문이고, 더욱이 이러한 자돈의 설사는 자돈의 폐사뿐만 아니라 증체율 및 면역기능을 저하시켜, 결국 자돈의 면역기능을 약화시켜, 돼지 2형 쉼코바이러스의 증식을 활성화 시켜, 이로 인한 PMWS 및 PRDC의 유발로 높은 폐사율이 발생하는 악순환이 반복되고 있다고 추정된다. 예비 연구에 의하면 국내에서 돼지 혈청형 C 로타바이러스는 농장별로는 포유자돈, 이유자돈, 육성돈 설사의 34.9%에서, 또한 돼지개체별로는 28.6%에 관여하고 있음을 알 수 있다(Table1-1). 즉, 국내 양돈농가에서도 돼지 혈청형 C 로타바이러스가 빈발하여, 막대한 경제적 피해를 유발하고 있음을 알 수 있다.

Table 1-1. Summary of the enteric pathogens present in the fecal samples obtained from pigs with diarrhea

Enteric pathogens present ^a	No. of farms (%) ^b	No. of pigs (%) ^c	Enteric pathogens present ^a	No. of farms (%) ^b	No. of pigs (%) ^c
PRV C alone	27 (11.3)	30 (8.7)	PRV C, PRV A, PCaV plus PEDV	1 (0.4)	1 (0.3)
PRV C plus PRV A	22 (9.2)	35 (10.2)	PRV C, PRV A, PCaV plus <i>Salmonella</i> . spp	2 (0.8)	2 (0.6)
PRV C plus PCaV	2 (0.8)	2 (0.6)	PRV C, PRV A, PEDV plus <i>Salmonella</i> . spp	1 (0.4)	1 (0.3)
PRV C plus <i>Salmonella</i> . spp	1 (0.4)	1 (0.3)	PRV C, PRV A, <i>Salmonella</i> . spp plus <i>P. multocida</i>	2 (0.8)	2 (0.6)
PRV C plus <i>P. multocida</i>	3 (1.3)	3 (0.9)	PRV C, PRV A, PCaV, <i>Salmonella</i> . spp plus <i>P. multocida</i>	1 (0.4)	1 (0.3)
PRV C, PRV A plus PCaV	9 (3.8)	10 (2.9)	Subtotal	83 (34.9%)	98 (28.6%)
PRV C, PRV A plus PEDV	2 (0.8)	3 (0.9)	Other enteric pathogen alone	67 (28.2)	98 (28.5)
PRV C, PRV A plus <i>Salmonella</i> . spp	3 (1.3)	3 (0.9)	Other enteric pathogens detected	26 (10.9)	29 (8.5)
PRV C, PRV A plus <i>P. multocida</i>	4 (1.9)	4 (1.2)	No enteric pathogens detected	62 (26.1)	115 (33.5)
PRV C, <i>Salmonella</i> . spp plus <i>P. multocida</i>	3 (1.3)	3 (0.9)	Total	238 (100)	343

^aPRV A-C: Porcine groups A, B, C rotaviruses; PCaV: Porcine enteric calicivirus (sapovirus); PEDV: Porcine epidemic diarrhea virus. ^bNumber of positive farms. ^cNumber of positive fecal samples.

또한 국내 송아지 사육농가 대부분에서 송아지 장염이 발생하고 있으며, 더욱이 송아지 폐사의 70%가 장염에 의한다고 알려져 있다. 이러한 송아지 장염의 주요 원인체로 기존에는 세균성으로는 대장균증 및 살모넬라증, 원충성으로는 콕시듐증 및 크립토스포리디움증, 그리고 바이러스성으로는 소 코로나바이러스, 혈청형 A 로타바이러스 등이 거론 되었다. 하지만 전남대 연구팀의 예비결과에 의하면, 소 코로나바이러스, 혈청형 A 로타바이러스 외에도 혈청형 C 로타바이러스, 소 노로바이러스, 소 바이러스성 장염/점막병 바이러스, 소 네브라스카양 칼리시바이러스 외에도 혈청형 C 로타바이러스가 중요하게 관여하고 있음을 알 수 있다. 특히 국내 송아지 설사에서 혈청형 C 로타바이러스가 농장별로는 15.3%, 개체별로는 14.3%에서 검출된 것으로 보아 국내 송아지 설사에 혈청형 C 로타바이러스가 중요하게 관여하고 있음을 알 수 있다(Table1-2). 즉, 국내 양돈농가에서도 소 혈청형 C 로타바이러스가 빈발하여, 막대한 경제적 피해를 유발하고 있음을 알 수 있다.

Table 1-2. Summary of the enteric pathogens present in the fecal samples obtained from calves with diarrhea

Enteric pathogens present ^a	No. of farms (%) ^b	No. of calf (%) ^c	Enteric pathogens present ^a	No. of farms (%) ^b	No. of calf (%) ^c
BRV C alone	41 (6.8)	41 (6.4)	BRV C, BCoV plus BNoV	1 (0.2)	1 (0.2)
BRV C plus BRV A	18 (3.0)	18 (2.8)	BRV C, BCoV plus <i>E.Coli</i> (STX)	1 (0.2)	1 (0.2)
BRV C plus BRV B	2 (0.3)	2 (0.3)	BRV C, BEC-NBV plus BVDV	1 (0.2)	1 (0.2)
BRV C plus BNoV	3 (0.5)	3 (0.5)	BRV C, BNoV plus <i>E.Coli</i> (STX)	1 (0.2)	1 (0.2)
BRV C plus BVDV	3 (0.5)	3 (0.5)	BRV C, BCoV plus BVDV	1 (0.2)	1 (0.2)
BRV C plus BEC-NBV	5 (0.8)	5 (0.8)	BRV C, BRV A, BCoV plus BToV	2 (0.3)	2 (0.3)
BRV C plus BCoV	4 (0.7)	4 (0.6)	BRV C, BRV A, BRV B plus BCoV	1 (0.2)	1 (0.2)
BRV C plus <i>E.Coli</i> (STX)	2 (0.3)	2 (0.3)	Subtotal	92 (15.3%)	92 (14.3%)
BRV C, BRV A plus BEC-NBV	2 (0.3)	2 (0.3)	Other enteric pathogen alone	234 (38.8)	238 (37)
BRV C, BRV A plus BCoV	1 (0.2)	1 (0.2)	Other enteric pathogens detected	125 (20.7)	126 (19.5)
BRV C, BRV A plus BNoV	1 (0.2)	1 (0.2)	No enteric pathogens detected	151 (25)	187 (29)
BRV C, BRV A plus <i>E.Coli</i> (STX)	1 (0.2)	1 (0.2)	Total	602 (100)	643 (100)
BRV C, BCoV plus BEC-NBV	1 (0.2)	1 (0.2)			

^aBRV A-C: Bovine groups A, B, C rotaviruses; BCoV: Bovine coronavirus; BNoV: Bovine norovirus; BEC-NBV: Bovine Nebraska-like enteric calicivirus; BVDV: Bovine viral diarrhea virus. ^bNumber of positive farms. ^cNumber of positive fecal samples.

인간과 가축에서 혈청형 C 로타바이러스 감염증이 막대한 피해를 유발함에도 불구하고, 예방이 어려운 것은 혈청형 C 로타바이러스가 분리가 어렵고, 이 바이러스가 11개의 분절화된 이중쇄 RNA 지놈을 가지고 있어서 돌연변이가 자주 발생하며, 또한 지놈이 분절화 된 11개로 구성되어 있어서 마치 인플루엔자 바이러스와 유사하게 reassortment가 발생할 가능성이 높기 때문이다(그림1-2). 이러한 혈청형 C 로타바이러스 지놈 특성상 축종간 혹은 인수공통간 전파가 이루어지고 있다고 추정된다. 즉, 축종간 전파의 근거로 소에서 발생한 혈청형 C 로타바이러스가 소의 혈청형 C 로타바이러스보다 돼지의 혈청형 C 로타바이러스와 염기서열 상동성이 높다는 보고도 있다. 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스는 국내에서 다발하고 있는 것으로 추정되고 있지만 지역별, 사양조건별, 계절별, 연령별 발생역학상황이나 진단법이 부재한 것이 현실이다. 따라서 국내에서도 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스에 대한 자세한 역학조사와 진단키트를 산업화 시켜서, 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스의 발생을 억제함으로써, 양돈농가의 소득증대 및 진단산업의 활성화를 도모하여야 필요성이 대두된다.

Rotavirus Structure

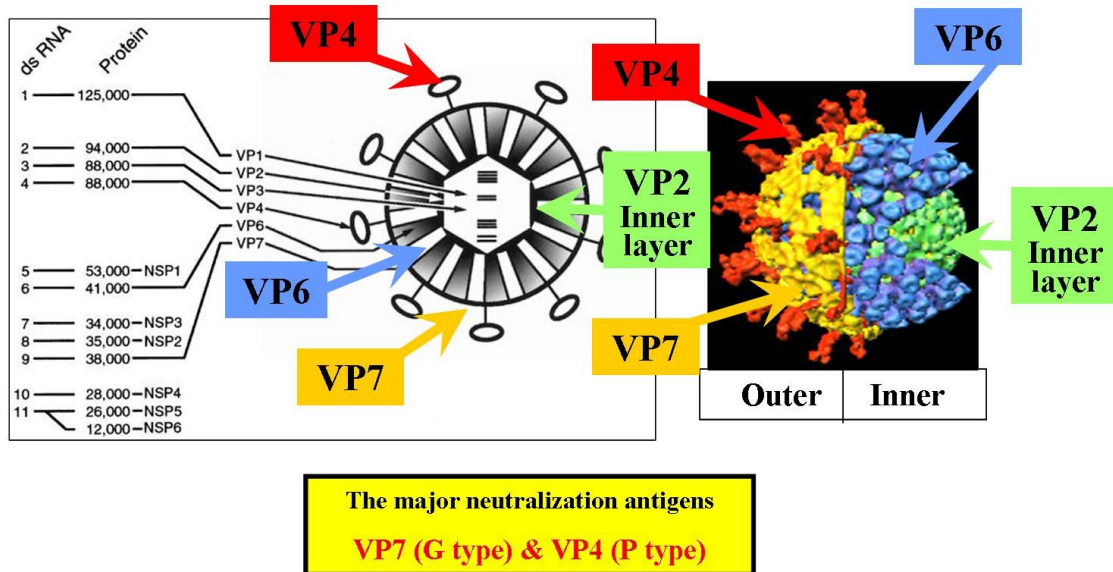


Fig1- 2. 로타바이러스의 구조. Kapikian et al., 2001. Fields Virology. pp 1787-1833.

2. 경제·산업적 측면

Kalorama Information는 2004년 진단키트의 시장규모를 약 38조원에 이른다고 보고하였으며, 성장률은 연평균 6% 내외로 추정하였다. 현재 세계 진단키트 시장은 북미(43%), 일본(31%), 서유럽(11%) 등이 전체시장의 85%를 차지하고 있다. 세계 시장 중 최대 수요처는 미국, 캐나다이며 이중 미국의 경우에는 전체 진단키트 시장의 35%를 차지하고 2007년에는 40억불 시장을 형성하고 있을 것으로 추정되고 있음. 2005년 한국과학기술정보연구원 보고에 의하면, 2004년 국내 진단키트 시장 규모는 약 1,300-2,000억원 내외로 추정되고 있다. 전 세계적인 시장규모 및 발전 가능성 그리고 국내 시장규모 및 발전가능성을 바탕으로 정부에서도 “진단키트” 등의 10개 산업을 신성장 동력산업으로 선정하여(2003.7), 추진하는 등 진단키트 산업이 주목을 받고 있고, 특허청 자료에 따르면, 1990년대 후반 이후 국내 진단키트 관련 출원이 급증하여, 2001-2003년 기간에 68%의 특허가 출원될 정도로 붐을 이루고 있는 것이 “진단키트”사업의 발전가능성을 엿보게 하는 좋은 증거라 할 수 있다. 국내 및 전 세계 가축질병 진단용 진단키트 시장규모는 파악되지 않고 있지 않지만 전 세계적으로 조류인플루엔자, 노로바이러스, 광견병, SARS 등 신종·재신종 악성 전염병 및 결핵, 부루셀라 등 고질적인 가축의 전염병이 창궐하고 있어서, 이러한 가축의 전염성 질병을 손쉽게 진단할

수 있는 진단키트 시장규모는 급성장 할 것으로 예상되고 있다.최근 축산업은 국민소득 증가와 식생활의 서구화로 비약적인 성장을 하여 우리 농업에 매우 중요한 부문으로 자리 잡고 있다. 하지만 최근 가축 전염병이 빈번히 발생하여 큰 문제가 되고 있으며, 국제 교역이 점차 증대되고 밀집사육이 보편화됨에 따라 우리나라에도 가축질병의 발생빈도가 점차 늘어나는 추세이며, 가축질병으로 인한 경제적 손실을 축산물 생산액의 약 20%라고 가정할 경우 그 액수는 2조 원에 육박할 정도이므로 가축질병이 경제에 미치는 양상은 매우 크다.(그림 1-3). 좋은 예로서 돼지의 경우 국내에서는 다두 밀집사육에 의한 전염성 질병이 창궐하여, 연간 돼지 총생산액 3조 7,586억 원 중에서 18.5-31.5%인 6,953억-1조 1,840억원의 피해를 유발하고 있다(가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원). 소의 경우에 있어서 2005년 기준 한육우 및 젖소 총생산액은 각각 3조 1,479억원과 1조 5,831억원이었으며, 전염병에 의한 폐사는 1.28-5.39%와 2.70-6.83%이었다. 폐사로 인한 직접적인 손실액은 403억-1,695억원과 427억-1,081억원으로 추정되고 있다(가축질병의 경제적 영향 분석, 2006년, 한국농촌경제연구원).



Fig 1-3. 전염성 질병과 관련된 국내 축산업의 문제점.

특히 어린 연령에서 다발하고 있는 설사의 경우 혈청형 C 로타바이러스를 포함한 다양한 장염 바이러스가 중요한 원인체로서, 이러한 어린 연령의 장염은 증체율과 면역기능을 저하시켜 결국 이유 후에도 충분한 면역기능이 형성되지 않아 지속적으로 전염성 질환에 감염되는 악순환을 유발케 된다. 따라서 개방화 시대에 있어 우리 축산업이 살아남기 위해서는 소와 돼지의 전염성 질병을 근절시킴으로써 생산능력을 향상시켜야 한다. 소 및 돼지 산업은 표 1-3에서도 나타난 바와 같이 그동안 비약적인 발전을 하였으며, 사양 방식도 예전의 영세성에서 현재 대단위 집단사육 되고 있다. 하지만 대단위 집약사육에 있어서 문제점은 악성의 전염병이 발생하면 농장 전체에 걸쳐 만연화 되어 막대한 경제적 피해가 발생한다는 것이다. 기술적인 측면에서 기술한 바와 같이 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증이 국내에서 만연화 되었을 것으로 추정되며, 이로 인해 막대한 경제적 피해가 발생하고 있을 것으로 예상되고 있다. 즉 송아지의 경우, 송아지 폐사율의 70% 이상이 장염에 의한 것이다. 예비 연구에 의하면 송아지 설사의 상당부분이 바이러스성이며, 이 중에서도 혈청형 C 로타바이러스가 높은 비율로 발생하고 있었다. 또한 돼지에서도 세균성 혹은 원충성 질환에 의한다고 알려진 포유자돈 혹은 이유자돈의 산발성 설사분변을 검사한 결과 많은 부분에서 혈청형 C 로타바이러스가 관여하고 있었다. 문제는 이러한 혈청형 C 로타바이러스의 정확한 역학조사와 이를 근거로 진단법이 국내에서 전혀 개발되어 있지 않다는 것이다. 상술한 바와 같이 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스는 국내에서 아주 중요한 질병이며, 향후 뚜렷한 대책이 없는 한 더욱 기승을 부릴 것으로 예상 된다.

Table 1-3. 축종별 축산물 생산액 현황

(경상가격, 단위 : 억원)

연 도	계	한·육우	젖소	돼지	닭	기타
1970	1,177	263 (22.3)	31 (2.6)	248 (21.1)	620 (52.7)	15 (1.3)
1980	12,273	2,970 (24.2)	1,910 (15.6)	3,784 (30.8)	3,185 (26.0)	424 (3.5)
1990	39,214	9,224 (23.5)	7,733 (19.7)	11,738 (29.9)	8,535 (21.8)	1,984 (5.1)
1995	69,031	21,073 (30.5)	10,249 (14.8)	19,601 (28.4)	14,073 (20.4)	4,035 (5.8)
2000	80,824	18,788 (23.3)	14,236 (17.6)	23,720 (29.3)	14,720 (18.2)	9,360 (11.6)

※ 자료 : 2002년 농림수산 통계연보.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 외국의 기술개발 현황

혈청형 C 로타바이러스가 사람을 포함하여 소와 돼지에 심각한 장염을 유발하고 있는 것으로 추정되고 있지만, 이에 대한 자세한 역학조사가 전 세계적으로 수행되지 않았다. 더욱이 혈청형 C 로타바이러스는 배양이 아주 까다로워 현재 사람, 소, 돼지에서 단지 소수만 분리되어 있는 상황이다. 전 세계적으로 혈청형 C 로타바이러스에 대한 자세한 역학조사가 불분명 하며 소수의 바이러스주만 분리되어, 혈청형 C 로타바이러스에 대한 자세한 연구가 진행되지 않아, 현장에서 간편히 사용할 수 있는 진단키트는 전 세계적으로 개발되어 상품화되어 있지 않다. 한편, 혈청형 C 로타바이러스 11개 지놈 유전자 염기서열은 혈청형 A 로타바이러스처럼 자세히 보고되어 있지 않지만, 몇몇 분리주 및 야외 발생주에 대한 유전자 염기서열은 보고 되었다. 이를 바탕으로 현재 혈청형 C 로타바이러스를 검출할 수 있는 RT-PCR 및 nested PCR 기법은 보고 되었다. 특히 VP6 유전자에 대한 염기서열이 보고되어 이 유전자를 증폭할 수 있는 RT-PCR 및 nested PCR 기법이 상품화되어 있지 않지만, 전 세계적으로 자주 사용되고 있다.

2. 국내의 기술개발 현황

소 및 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증을 야외에서 간단히 검출할 수 있는 진단키트는 국내는 물론 전 세계적으로 전혀 개발 및 상품화 되어 있지 않음. 사실 국내 소와 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증에 대한 역학조사는 오직 돼지에서만 단편적으로 수행되었다 (Park et al., 1998). 상기 연구결과 23건의 돼지 설사분변 중에서 2건이 혈청형 C 로타바이러스 VP6 유전자에 특이적인 primer pair를 이용한 RT-PCR에 의해서 검출 되었다. 하지만 예비연구결과에 의하면 혈청형 C 로타바이러스의 VP6 유전자를 증폭할 수 있는 RT-PCR 기법에 의해서 돼지의 혈청형 C 로타바이러스 감염증은 국내에서 상당히 높은 비율로 발생하고 있는 것으로 추정된다. 문제는 기존 연구나 예비연구결과에서 진단된 증례가 전부 혈청형 C 로타바이러스 감염증에 의한 것인지는 확실히 알 수 없다. 왜냐하면, RT-PCR에 의해서 증폭된 산물이 비특이적으로 증폭된 경우가 많기 때문이며, 따라서 RT-PCR에 의해 증폭된 산물을 염기서열 분석을 통해서 그 진위를 분명히 하여야 한다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 오하이오 주립대학교 수의과대학(Ojeh et al., 1991, J. Clin. Microbiol. 29:2051-2055.; Ojeh et al., 1992, J. Clin. Microbiol. 30:1667-1673.)	1991년 Ojeh et al.은 돼지 혈청형 C로 타바이러스 분리주인 Cowden strain을 Balb/c mouse를 이용하여 3개의 단클론 항체를 제작하였고, 이를 이용하여 1992 년 소, 돼지, 사람의 혈청형 C로타바이 러스를 동시에 검출할 수 있는 ELISA 진단법을 개발하여 보고하였다.	본 연구에서 개발한 혈청형 C로타바이 러스 검출용 ELISA 진단법은 상용화되 지 않았음.
미국 오하이오 주립대학교 수의과대학(Tsunemitsu et al., 1992, J. Clin. Microbiol. 30:2129-2134.)	1992년 돼지 혈청형 C로타바이러스를 무균돼지에 접종하여, 다클론 항체 (고도 면역혈청)를 생산한 후, 생산된 다클론 항체를 이용하여 sandwich ELISA법을 확립한 후, 혈청형 C로타바이러스 양성 분변 및 분리주에 응용하였음.	본 연구에서 사용된 항체가 단지 돼지에 서 생산된 다클론 항체 (고도면역혈청)이 어서, 돼지에서 재생산하는 것이 어렵기 때문에 상품화를 시키지 못하였음,
미국 CDC(Gouvea et al., 1991, J. Clin. Microbiol. 29:519-523.)	미국 CDC의 Gouvea 박사 등은 혈청형 C로타바이러스 뿐만 아니라 혈청형A 및 B로타바이러스 검출용 RT-PCR기 법을 개발하였다. 본 연구팀은 뿐만 아 니라 혈청형 A로타바이러스의 경우 각 각의 genotyping을 할 수 있는 multiplex RT-PCR을 개발하여 보고하 였다.	RT-PCR 기법은 현재 폭 넓게 많은 연 구실에서 사용중인 진단법 중의 하나이 다. 하지만 다수의 고가 기자재, 시약 및 실험 노하우가 필요하기 때문에 진단키 트로 개발되지 않고 있는 것이 현실이다. 따라서 국내에서 RT-PCR 진단법에 대 한 primer pairs에 대한 특허출원 및 등 록은 전 세계 연구 상황에 비추어 연구 자의 연구를 제한시키는 무리한 측면이 없지 않아 있다.
영국 Southampton 대학교 의과대학(James et al., 1998, J. Clin. Microbiol. 36:3178-3181.)	Sf9 세포에서 제작한 사람 혈청형 C로 타바이러스 VLP를 산란계와 도끼에 접 종하여 다클론 항체를 생산한 후, 각각 의 항체를 이용하여 sandwich ELISA법을 확립한 후, 사람 혈청형 C로타바이 러스 양성 분변에 응용하였음.	본 연구에서 개발된 sandwich ELISA기 법은 상용화 되지 않았음.
일본 오카야마현 보건환경연구원(Fujii et al., 1992, J. Clin. Microbiol. 30:1307-1311.)	사람설사분변에서 혈청형 C로타바이러 스를 정제하여, Balb/c 마우스에 접종하 여 제작한 단클론 항체를 이용하여 ELISA 진단법을 수립함.	본 연구에서 개발된 사람 혈청형 C로타 바이러스 검출용 ELISA는 로타바이러스 제일 검출을 검출하기 때문에 그 응용성 이 떨어지며, 상용화 되지 않았음.
일본 오카야마현 보건환경연구원(Kuzuya et al., 1993, J. Clin. Microbiol. 31:1308-1311.)	사람설사분변에서 혈청형 C로타바이러 스를 정제하여, Balb/c 마우스에 접종하 여 제작한 단클론 항체를 이용하여 Reverse Passive Hem -agglutination 및 Latex Agglutination 진단법을 수립 함.	본 연구에서 개발된 사람 혈청형 C로타 바이러스 검출용 Reverse Passive Hemagglutination 및 Latex Agglutination 진단법은 상용화 되지 않 았음.
일본 오카야마현 보건환경연구원(Kuzuya et al., 2001, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:161-165.)	사람 혈청 내 혈청형 C로타바이러스에 대한 항체가를 조사하기 위하여, ELISA 기법을 개발하였음.	본 연구에서 개발된 사람 혈청형 C로타 바이러스 검출용 ELISA는 상용화 되지 않았음.
일본 오카야마현 보건환경연구원(Fujii et al., 2000, J. Clin. Microbiol. 38:50-54.)	사람 혈청형 C로타바이러스 분리주를 이용하여 사람 혈청 내 항체가를 조사할 수 있는 Reverse Passive Hemagglutination Test를 확립하였음.	본 연구에서 개발된 사람 혈청형 C로타 바이러스에 대한 항체가를 검출하기 위 한 Reverse Passive Hemagglutination Test는 사람 혈청형 C로타바이러스가 필요하기 때문에 상용화 되지 않았음.

제 2 절 본 연구팀의 선행연구 수준

1. 제 1 세부과제(중앙백신연구소)

진단키트를 총괄하고 있는 1세부과제 책임자 중앙백신연구소는 현재까지 개에서 가장 문제되고 있는 전염성 질환인 개 파보바이러스, 개 디스토펜퍼 바이러스, 개 코로나바이러스, 개 심장 사상충 및 고양이 칼리시 바이러스, 소 돼지 로타 바이러스 를 손쉽게 진단할 수 있는 진단키트를 개발하여 현재 판매 중에 있으며, 조류 인플루엔자 바이러스 진단키트를 허가신청중에 있으며,이밖에 돼지 유행성설사(PED), 닭 뉴캐슬바이러스, 돼지호흡기 생식기 증후군(PRRS)바이러스 진단키트의 개발 진행중 등, 애완동물 및 산업 동물진단에 관련된 진단키트 전문역량을 갖추고 있다.

2. 제 1 협동과제(진남대학교)

제1협동연구 책임자는 국내 자돈 설사분변에서 혈청형 C 로타바이러스에 양성인 가검물 중에서 일부를 선정하여, 양성 가검물에 대하여 VP6 유전자를 RT-PCR로 검출한 후, 증폭산물의 염기서열을 분석하여, 계통학적으로 비교한 결과, 국내 돼지 혈청형 C 로타바이러스는 돼지 혈청형 C 로타바이러스 prototype인 Cowden strain과 계통학적으로 근연관계에 있음을 규명하였다(Fig.2-1). 하지만 연구의 필요성에서 언급한 바와 같이 혈청형 C 로타바이러스는 이중쇄 RNA로 이루어진 11개의 분절화 된 바이러스 genome을 보유하고 있어서, 바이러스 변이가 쉽게 일어날 뿐만 아니라 축종간 혹은 가축과 사람간의 전파가 가능하기 때문에, 더욱 많은 양성 증례에 대한 유전자 염기서열 분석을 통한 계통학적 차이점을 규명할 역량이 있다.

3. 제 2 협동과제(충북대학교)

제2협동과제 책임자는 식품의약품안전청 지원 연구비(2003년-2004년)로 사람 로타바이러스 주요 혈청형(G1, G2, G3, G4)에 대한 단클론항체 및 다클론항체를 생산하고 이를 이용하여 ELISA 진단법을 개발한 경험이 있으며 사람 로타바이러스의 주요 구조단백질인 VP4, VP6 그리고 VP7을 baculovirus expression system에서 발현시키고 정제한 경험이 있다. 또한 혈청형 C 로타바이러스 표준주인 Cowden strain에 대한 단클론항체를 생산한 경험이 있으며 표준주 바이러스를 확보하여, 대량 증식시켜 놓은 상태이다.

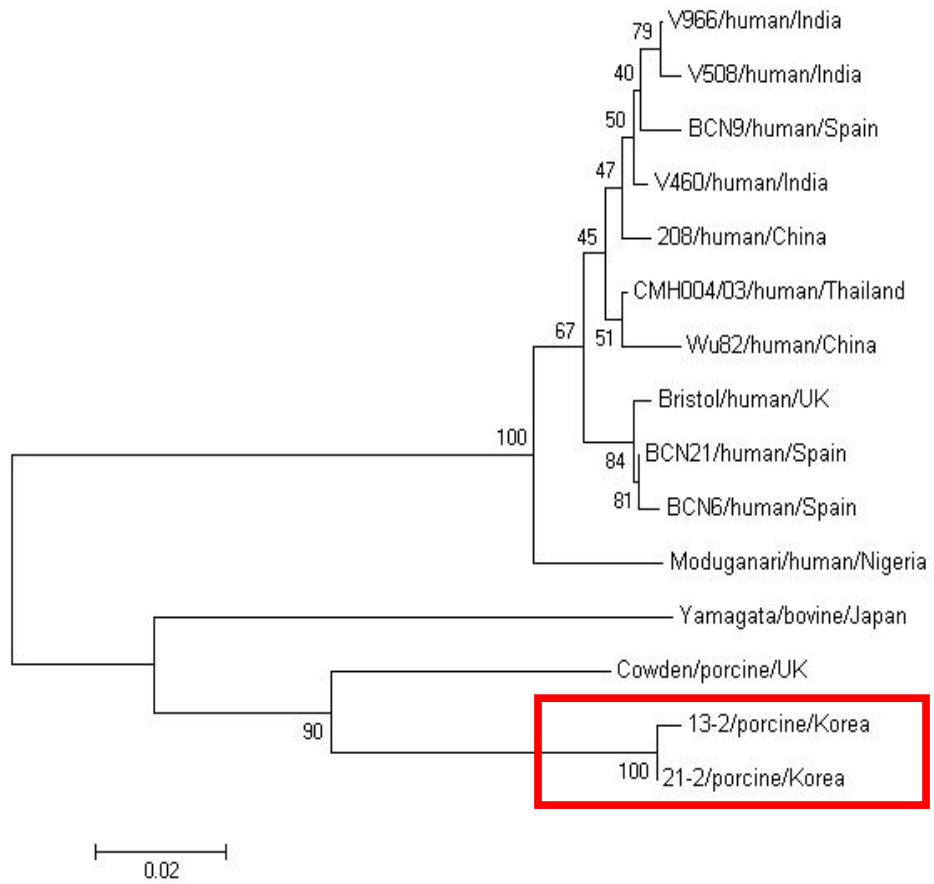


Fig 2-1. Phylogenetic tree of the VP6 protein of the Korean porcine group C rotaviruses, indicating its genetic relationship with the other group C rotaviruses.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

본 연구개발의 최종목표는 국내에서 발생하고 있는 소와 돼지의 혈청형 C로 타바이러스에 대한 정확한 역학조사를 바탕으로 이들 바이러스에 대한 특이적인 단클론 및 다클론항체를 대량생산한 후, 이를 이용하여 신속·정확히 진단할 수 있는 진단키트를 개발하여 산업화시키는 것이다.

제 2 절 연차별 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

1. 1차년도 개발목표 및 개발내용

가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사, 특이항체 제작과 항원 검출용 진단 키트 개발

(1) 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

(가) 각 단계별 돼지 성장시기에 맞추어서 총 200두 분 이상의 설사분변을 채취하여 혈청형 C 로타바이러스의 연도별, 지역별, 연령별, 계절별, 인수공통전염병 가능성 여부 등에 대한 정밀한 역학조사를 수행.

(나) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 검출용 RT-PCR 및 nested PCR primer pairs 제작 및 바이러스 검출

(다) 제작한 각각의 primer pairs는 야외 돼지 설사분변을 사용하여 RT-PCR 및 nested PCR을 수행하여, 증폭산물을 전기영동으로 확인

(라) 증폭산물의 염기서열 확인 및 계통학적 분석

(마) Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 이용한 야외 돼지 설사분변에서 혈청형 C 로타바이러스의 PAGE patterns 확인

(바) 장염 유발성 기타 바이러스성, 세균성, 기생충성 감염증과의 혼합감염 조사

(2) 국내 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 제작

(가) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 확보

(나) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백 발현 및 정제

(다) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 단클론 항체 생산 및 특성 조사

- (라) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 다클론 항체 생산 및 특성 조사
- (3) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One step/Rapid 진단키트 제작
 - (가) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 sandwich ELISA기법 개발
 - (나) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 One step/Rapid 진단키트 개발
 - (다) 선정된 양성 설사분변에서 RT-PCR 및 nested PCR 기법과의 민감도 및 특이도 비교

2. 2차년도 개발목표 및 개발내용

가. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사, 특이항체 제작과 항원 검출용 진단키트 개발

(1) 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

- (가) 각 단계별 돼지 성장시기에 맞추어서 총 200두 분 이상의 설사분변을 채취하여 혈청형 C 로타바이러스의 연도별, 지역별, 연령별, 계절별, 인수공통전염병 가능성 여부 등에 대한 정밀한 역학조사를 수행.
- (나) 소 혈청형 C 로타바이러스 검출용 RT-PCR 및 nested PCR primer pairs 제작 및 바이러스 검출
 - (다) 제작한 각각의 primer pairs는 야외 돼지 설사분변을 사용하여 RT-PCR 및 nested PCR을 수행하여, 증폭산물을 전기영동으로 확인
 - (라) 증폭산물의 염기서열 확인 및 계통학적 분석
 - (마) Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 이용한 야외 돼지 설사분변에서 혈청형 C 로타바이러스의 PAGE patterns 확인
 - (바) 장염 유발성 기타 바이러스성, 세균성, 기생충성 감염증과의 혼합감염 조사

(2) 국내 소 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 제작

- (가) 소 혈청형 C 로타바이러스 확보
 - (나) 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백질 발현 및 정제
 - (다) 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 단클론 항체 생산 및 특성 조사
 - (라) 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 다클론 항체 생산 및 특성 조사

- (3) 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One step/Rapid 진단키트 제작
 - (가) 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 sandwich ELISA 기법 개발
 - (나) 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 One step/Rapid 진단키트 개발
 - (다) 선정된 양성 설사분변에서 RT-PCR 및 nested PCR 기법과의 민감도 및 특이도 비교

3. 3차년도 개발목표 및 개발내용

가. 야외 증례에 대한 진단키트의 응용 및 산업화와 병리학적 및 면역조직화학적 연구

- (1) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 야외 감염증례에 대한 병리학적 및 면역조직화학적 연구
 - (가) 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 감염된 야외 증례 확보
 - (나) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 감염증례에 대한 병리조직학적 검사
 - (다) 기타 장염 원인체와의 혼합감염에 의한 소화기 장기의 병리학적 변화 검사
 - (라) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 감염증례에 대한 면역조직화학적 연구
- (2) 돼지와 소 야외 설사분변에 대한 진단키트의 민감도와 특이도 검증
 - (가) Sandwich ELISA 진단키트를 이용한 돼지와 소 야외 설사분변에서 혈청형 C 로타바이러스 검출
 - (나) One step/Rapid 진단법을 이용한 돼지와 소 야외 설사분변에서 혈청형 C 로타바이러스 검출
- (3) 돼지와 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 진단키트의 시제품 제작, 대량생산 시스템 구축 및 산업화
 - (가) 돼지와 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 Sandwich ELISA 진단법 시제품 제작
 - (나) 돼지와 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 One step/Rapid 진단법 시제품 제작
 - (다) 돼지와 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 Sandwich ELISA 진단키트 대량생산 시스템 개발
 - (라) 돼지와 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 One step/Rapid 진단키트 대량생산 시스템 개발

제 3 절 연구개발 수행 방법

1. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

- (1) 혈청형 C 로타바이러스를 검출하기 위하여 총 5쌍의 RT-PCR용 프라이머쌍을 사용하였다.(표3-1). 이러한 5개의 프라이머쌍을 이용한 RT-PCR에서 한 개 이상의 양성반응이 관찰되면, 해당 분변은 양성으로 간주하였다.
- (2) 국내 돼지 혈청형 A 로타바이러스 VP6 유전자의 분자적 특성을 확인 하기위해 RT-PCR에 의해서 증폭된 24개의 국내 돼지 혈청형 A 로타바이러스 VP6 유전자의 356 bp (nt 997-1352)에 대하여 염기서열 분석을 수행하였으며, 염기서열이 확인된 356 bp 중에서 프라이머쌍에 해당되는 부분을 제외한 310 bp에 대하여 외국 보고주 들과 비교분석을 수행하였다.
- (3) 국내 돼지 혈청형 C 로타바이러스의 VP6 유전자와 기존에 보고된 돼지, 소, 사람 혈청형 C 로타바이러스의 VP6 유전자의 핵산 및 아미노산 염기서열을 분석 하였다.
- (4) 야외에서 채취된 돼지 설사분변에서 돼지 혈청형 C 로타바이러스가 segmented double strand RNA genome을 가지고 있는지 여부를 확인하기 위하여 PAGE test를 수행하였다.

Table3-1. RT-PCR and nested PCR primers used for the detection of the groups A, B and C rotaviruses (GARV, GBRV, GCRV), porcine sapovirus (PSaV), porcine norovirus (PNoV), transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV) in the fecal samples from pigs with diarrhea

Target viruses	Target genes ^a	Primer names	Primer sequences, 5'-3' ^b	Region (nt)	Size (bp)	Source or reference
GCRV	VP6	C1	F: CTC GAT GCT ACT ACA GAA TCA G	997-1018	356	Gabbay et al. (2008)
		C4	R: AGC CAC ATA GTT CAC ATT TCA TCC	1329-1352		Gabbay et al. (2008)
		RVCF1	F: GCA TTT AAA ATC TCA TTC ACA	1-21	1352	This study
		T778a	R: AGC CAC ATA GTT CAC ATT TC	1-1352		Adah et al. (2002)
		T729	F: TTA ATG AAA ATA GAA GCT GG	685-714	668	Adah et al. (2002)
		T778a	R: AGC CAC ATA GTT CAC ATT TC	1333-1352		Adah et al. (2002)
		BMJ145	F: AGT CCG TTC TAT GTG ATT C	1014-1032	339	Sanchez-Fauquier et al. (2003)
		BMJ44	R: AGC CAC ATA GTT CAC ATT TC	1333-1352		Sanchez-Fauquier et al. (2003)
		T383	F: AAT CTC ATT CAC AAT GGA TG	10-29	311	Adah et al. (2002)
		RVCnR2	R: TTT CAT CAT CAC ATA CAG CT	301-320		This study
GARV	VP6		F: AAAGATGCTAGGGACAAAATTG	58-78	308	Elschner et al. (2002)
			R: TTCAGATTGTGGAGCTATTCCA	344-365		Elschner et al. (2002)
			nF: GACAAAATTGTGCGAAGGCACATTATA	69-94	121	Elschner et al. (2002)
			nR: TCGGTAGATTACCAATTCCTCCAG	166-189		Elschner et al. (2002)
GBRV	NSP2		F: CTATTCAGTGTGTCGTGAGAGG	18-40	434	Gouvea et al. (1991)
			R: GCAGACAAGCTAGCCCGCTTCG	429-451		Gouvea et al. (1991)
PSaV and PNoV	RdRp		F: GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC	4 5 6 8 - 4590	319	Jiang et al. (1999)
			R: TGA CAATGTAAT ATCACCATA	4 8 6 5 - 4886		Jiang et al. (1999)
TGEV ^c	ORF1b		F: GGGTAAAGTTGCTCATTAGAAATAATGG	7 9 6 8 - 7994	1006	Kim et al. (2000)
			R: CTTCTCAAAGCTAGGGACTG	920-940		Kim et al. (2000)
PEDV	N		F: AGGAACGTGACCTCAAAGACATCCC	812-836	540	Kubota et al. (1999)
			R: CCAGGATAAGCCGGTCTAACATTG	1 3 2 8 - 1351		Kubota et al. (1999)

^aVP6: viral protein 6; NSP2: non-structural protein 2; RdRp: RNA dependent RNA polymerase; ORF1b: open reading frame 1b; N: nucleocapsid.

^bF: forward primer for RT-PCR; R: reverse primer for RT-PCR; nF: forward primer for nested PCR; nR: reverse primer for nested PCR.

^cTGEV: forward primer was designed from the portion of TGEV ORF1b; reverse primer was designed from the portion of TGEV spike gene.

나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

- (1) 국내 소 혈청형 C 로타바이러스의 역학조사를 위해서 총 57개의 농가에서 127개의 송아지 설사분변을 채취 하였다.
- (2) 혈청형 C 로타바이러스의 검출을 위해 유전자 염기서열이 잘 보존되어 있는 VP6 유전자 전체 염기서열, 5'end 및 3' end region에서 RT-PCR용 primer pairs를 각각 제작하였으며, 민감도를 높이기 위해서 3' end를 targeting하는 RT-PCR primer pair 내에서 nested PCR용 primer pair를 제작하였다(표3-2).
- (3) 국내에서 설사를 유발하는 소 혈청형 C 로타바이러스의 분자적 특성을 규명하기 위해 혈청형 C 로타바이러스의 VP6 유전자 증폭산물을 젤에서 추출한 후, 염기서열을 분석하였고, 확인된 염기서열을 사람 및 동물에서 발생하고 있는 혈청형 C 로타바이러스 대표주와 계통학적 분석을 수행하였다.
- (4) 국내 송아지에서 발생하고 있는 설사증에서 혈청형 C 로타바이러스 및 기타 바이러스성, 세균성, 기생충성 감염증과의 혼합감염을 조사하기위해 송아지에 설사를 유발하는 다수의 바이러스들에 대하여 RT-PCR 및 nested PCR을 수행하였으며, 세균분리 및 원충 검사를 수행하였다.

Table 3-2. RT-PCR and nested PCR primers for the detection of the groups A, B and C rotaviruses (BRV A-C), bovine norovirus (BNoV), bovine enteric Nebraska-like calicivirus (BEC-NBV), , bovine coronavirus (BCoV), bovine torovirus (BToV) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) in the fecal specimens from calves with diarrhea

Target viruses	Target genes	Sequence (5'→3') ^a	Region	Product Size (bp)	Annealing Temp (°C)	Source or references
BRV C	VP6	F: CTGGATGCCACGACAGAATCTG	997-1352	356	50	Park et al., 2006.
		R: AGCCACATAGTTCACATTTTCATCC				
		nF: TCAGCGATGCCAGCTGGAAC	1075-1322	249	47	This study
		nR: GGATCATCTACATCATGCG				
BRV A	VP7	F:GCA TTT AAA ATC TCA TTC AC	1-1352	1352	50	This study
		R:AGC CAC ATA GTT CAC ATT TC				
		F:GAA GCT GTATGT GAT GAT GA	298-918	621	50	This study
		R:CAT AGC AGC TGG TCT AAT CA				
BRV B	VP7	F: GCCTTTAAAAGCGAGAATTT	3 -1062	1060	44	Chang et al., 1996.
		R: GGTCACATCATAACAAYTC TA				
		nF: TTTCTAACATCAAACT	274-930	657	39	
BRV B	VP7	nR: TTGCCACCATTTTTTCCAAT				Park et al., 2006.
		F: GGAAATAATCAGAGATG	1-795	795	42	Barman et al., 2004.
BNoV	RdRp	R: CTACTCGTTTGGCTCCCTCC				
		F: AGTTAYTTTTCTTYTAYGGBGA	4543-5074	532	54	Smiley et al., 2003
		R: AGTGTCTCTGTCAGTCATCTTCAT				
BEC-NB V	RdRp -MCP	nF: GTCGACGGYCTKGTSTTCCT	4690-5015	326	50	
		nR: CACAGCGACAAATCATGAAA				Park et al., 2006.
		F: TTTCTAACYTATGGGGAYGAYG	4518-5066	549	52	Smiley et al., 2003.
BCoV	N	R: GTCACTCATGTTTCTTCTAAT				
		nF: CGCTCCGTGTGGGATCACGA	4788-4981	194	50	Park et al., 2006.
		nR: GCACGGGCTTCTTCTAGAGA				
BToV	M	F: GCAATCCAGTAGTAGAGCGT	13-712	700	50	Cho et al., 2001.
		R: CTTAGTGGCATCCTTGCCAA				
		nF: GCCGATCAGTCCGACCAATG	152-551	400	52	Cho et al., 2001.
BVDV	5'-UT R	nR: AGAATGTCAGCCGGGGTAG				
		F: TTCTTACTACACTTTTTGGA	98-700	603	49	Park et al., 2006.
		R: ACTCAAACCTAACACTAG AC				
BVDV	5'-UT R	nF: TATGTACTATGTTTCCAGCT	152-560	409	49	Park et al., 2006.
		nR: CCAACACAAATCCGCAACGC				
BVDV	5'-UT R	F: GCTAGCCATGCCCTTAG	107-396	290	47	Givens et al., 2003.
		R: CCATGTGCCATGTACAG				

^a F: forward primer for RT-PCR; R: reverse primer for RT-PCR; nF: forward primer for nested PCR; nR: reverse primer for nested PCR.

다. 야외증례에 대한 병리 면역학적 연구

파라핀 포매된 각각의 장기 및 조직을 3 um 두께로 세절하여 상법에 준하여 탈파라핀 및 재합수를 수행한다. 3% H₂O₂가 포함된 PBS(pH 7.4)로 내인성 peroxidase를 불활성 시킨 후 정상 혈청을 각각의 절편에 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 억제시킨다. 1차항체로는 제2협동과제에서 제작된 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체를 사용하고 1차항체를 농도별로 희석한 후 각각의 절편에 분주 시킨 후, 12시간 동안 4°C에서 반응시킨다. 2차항체는 avidin conjugated anti-mouse antibody를 사용하고 Streptoavidin-biotin peroxidase complex를 각각의 절편에 반응시켜 DAB로 각각의 절편을 발색시킨 후, Mayer's hematoxylin으로 counter stain 한후 각각의 절편을 봉입 후, 광학현미경으로 관찰한다.

2. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 제작

가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이항체 제작

(1) 돼지 C형 로타바이러스의 VP6 유전자를 baculovirus에서 발현시키기 위하여 RT-PCR법에 의하여 C형 로타바이러스 양성으로 확인된 돼지 설사분변(#06-52-1)을 제1 협동과제 연구책임자인 조경오박사로부터 분양받아 사용하였다. 또한, 현재 조직배양이 가능한 돼지 C형 로타바이러스 Cowden strain을 미국 오하이오주립대학교의 Dr. Linda Saif로부터 분양받아 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포주를 사용하여 증식시켜 대조군으로 사용하였다. MA104세포는 5% 소태아혈청(Fetal calf serum: FCS)이 함유된 α -MEM 배지를 사용하여 배양하였다.

(2) 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자 크로닝 및 발현은 그림3-1과 같이 하였다.

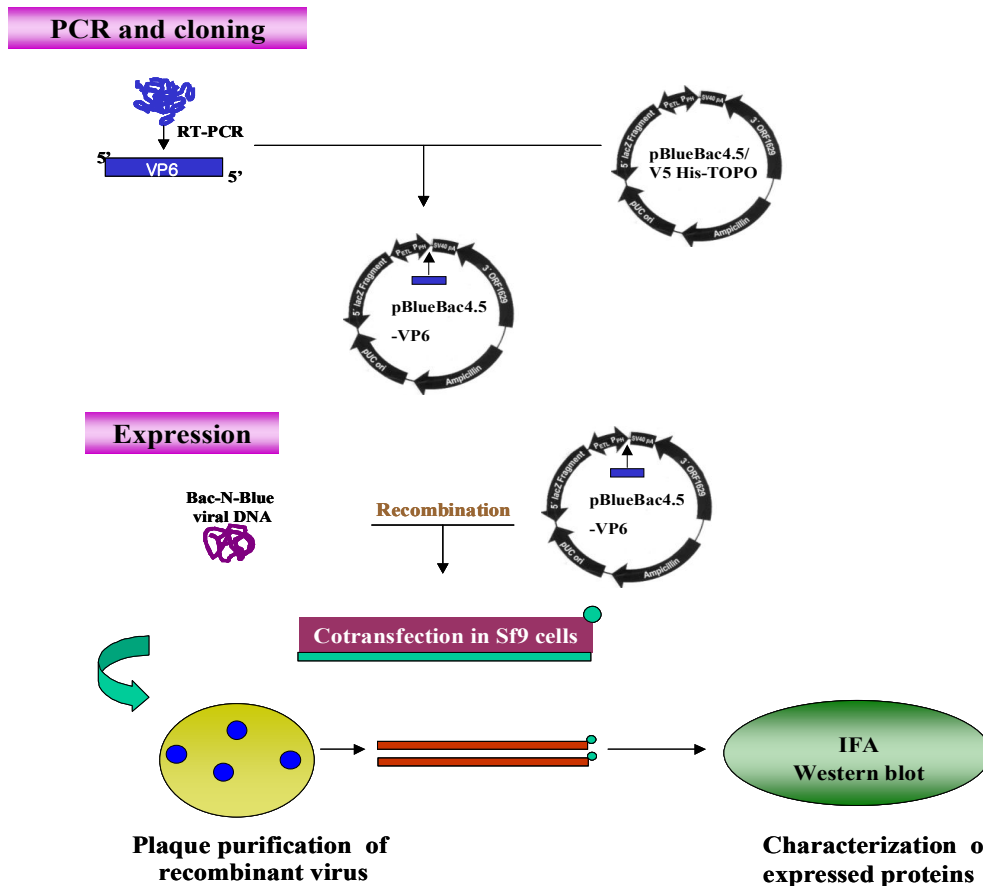


Fig 3-1. Schematic diagram for VP6 gene expression in baculovirus expression system

(가) 바이러스 RNA 분리

돼지 C형 로타바이러스 RNA는 Gentsch 등과 Gouvea 등의 방법에 따라 Cowden strain으로 감염된 조직배양액 및 설사분변(#06-52-1)으로부터 추출한 다음 RNaid kit를 사용하여 정제하였으며 정제된 RNA는 DEPC water에 용해하여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

(나) Primer 제작

돼지 C형 로타바이러스 VP6 전체 유전자를 coding하는 oligonucleotide primer는 GenBank의 data를 기초로 하여 표3-3와 같이 제작하였다.

Table3-3. Primers used for group C rotavirus VP6 gene amplification

	Sequences (5' → 3')	Position	Size (bp)
GpC-VP6	Sense GATCTCGAGTCATGGATGTGCTTTTTTCCA	1-19	1,188
	Antisense ATCAAGCTTCATCACCATTCTTTCACGGA	1,169-1,185	

CTCGAG: *Xho I* site, AAGCTT: *Hind III* site

(다) RT-PCR

돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 primer를 사용하여 Rosen 등의 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. 즉, 순수 분리한 RNA 10 μ l에 2 μ l의 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 첨가하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 옮겨 5분간 방치하였다. 10,000rpm에서 5초간 원심한 후 DEPC 처리된 증류수 20 μ l, 5 \times first strand buffer 10 μ l, 0.1 M DTT 5 μ l, 10mM dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, reverse transcriptase(200 U/ μ l) 1 μ l을 순서대로 넣어 반응용량 50 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA template 10 μ l에 DEPC 처리된 증류수 63 μ l, 10 \times PCR buffer 10 μ l, 25mM MgCl₂ 12 μ l, 10mM dNTP 2 μ l, 각각의 forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) 1 μ l를 넣어 전체반응용량 100 μ l를 pre-PCR (95 $^{\circ}$ C, 5 min), PCR(denaturation 94 $^{\circ}$ C/45 sec, annealing 50 $^{\circ}$ C/45 sec, extension 72 $^{\circ}$ C/1 min, 30 cycles) 그리고 post-PCR(72 $^{\circ}$ C, 7 min)을 핵산증폭기(PCR Thermal Cycler Dice Gradient, Dakara)를 사용하여 실시하였다. 반응산물은 1% agarose gel 상에서 100volt로 30분 간 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였으며 증폭된 각각의 유전자 크기는 1kb DNA ladder(Gibco BRL)를 같이 전기영동 함으로써 확인하였다.

(라) Baculovirus 발현 vector로의 크로닝

돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자의 baculovirus에서의 발현을 위하여 RT-PCR로 증폭한 VP6 유전자를 pBlueBac4.5/V5-His TOPO TA expression kit를 사용하여 pBlueBac4.5/V5-His TOPO vector로 크로닝하고 *E. coli* TOP10 competent cell로 형질전환하였다. 형질전환된 *E. coli* 배양액은 37 $^{\circ}$ C에서 220rpm으로 1시간 동안 진탕 배양한 다음 ampicillin(50 μ g/ml)을 함유하는 LB plate에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 배양하였다. 성장한 집락으로부터 *E. coli*을 취하여 5ml의 LB broth에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 220rpm으로 16시간 진탕 배양한 다음 크로닝 유무를 조사하기 위하여 alkaline lysis method로 plasmid를 분리하고 30 μ l의 TE buffer(pH 8.0)에 용해하였다. 분리한 plasmid DNA는 제한효소 *Xho* I과 *Hind* III을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 절단하여 1.0% LE agarose gel에서 1시간 동안 전기 영동하여 크로닝 유무를 확인하였다. 또한 VP6 유전자가 삽입된 방향을 확인하기 위하여 각각의 VP6 유전자에 해당하는 제한효소로 처리한 후 확인하거나 염기서열을 결정한 후 확인하였다.

(마) 재조합 baculovirus 선발

돼지 C형 VP6 유전자가 크로닝된 baculovirus transfer vector pBlueBac4.5-GpC/VP6은 Bac-N-blue Transfection kit를 사용하여 Bac-N-blue wild type DNA와 함께 제조사의 술식에 따라 Sf9 세포로 cotransfection하였다. 먼저 4 μ l의 재조합 transfer plasmid DNA (1 μ g/ μ l)에 Bac-N-blue wild type DNA 10 μ l, Grace's insect media(w/o FCS) 1ml, Cellfectin reagent 20 μ l를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 반응시켰다. 15분 후, 혈청이 첨가되지 않은 Grace's insect media로 3회 세척한 Sf9 세포에 한 방울씩 떨어뜨린 다음 4시간 동안 반응시키고 10% 혈청이 첨가된 complete Grace's insect media 1ml

을 가하고 27°C에서 72시간 동안 배양하였다. 상호유전자 감염용액에서 재조합 baculovirus를 선별하기 위하여 O'Reilly 등의 방법에 따라 플라크 검정을 실시하였다. 먼저 십진 희석한 상호유전자 감염용액을 미리 100mm 세포배양 petri dish에서 배양한 Sf9 세포에 감염시키고 60분간 배양한 다음 배양액을 제거하고 여기에 2.5% agarose 5ml, complete Grace's insect media 5ml 및 15 μ l의 X-gal(50mg/ml)을 가하고 실온에서 굳힌 다음 27°C에서 8일간 배양하였다. 8일간 배양 후, 형성된 plaque 중 푸른색의 plaque만을 선별하여 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염시켜 27°C에서 5일간 배양하고 일부 세포 및 배양액을 회수하여 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자의 재조합 유무를 확인하였다. VP6 유전자가 재조합된 것으로 확인된 것은 1,500g에서 15분간 원심하여 얻은 상층액을 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염시켜 고역가의 재조합 baculovirus stock을 만들어 일부는 보관하고 일부는 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다

(바) 재조합 baculovirus 확인

Plaque법으로 순수분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 VP6 유전자의 삽입유무를 확인하였다. 또한 baculovirus에 특이적인 polyhedrin forward primer인 5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3'와 reverse primer인 5'-CAACAACGCACA GAATCTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행하여 wild type baculovirus의 오염여부를 확인하였다. Plaque assay로 순수 분리한 recombinant 바이러스가 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백을 발현하는가를 확인하기 위하여 IFA를 실시하였다. 즉, Sf9 세포가 배양된 96-well plate에 recombinant 바이러스를 접종하여 72시간 배양한 후 80% acetone으로 고정하였다. 1차 항체로 His₆ 혹은 V5에 특이적인 토끼 복합항체(Bethyl Laboratories Inc.)와 돼지 C형 로타바이러스 항혈청을 1:2,000과 1:1,000으로 각각 희석하여 50 μ l씩 넣어 37°C에서 1시간 반응 후 phosphate buffer saline(PBS)로 5회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG(Kirkegaard Perry Laboratory) 및 FITC-conjugated goat anti-swine IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:100으로 희석하여 50 μ l씩 넣어 1시간 배양 후 PBS로 5회 세척하고 mounting buffer를 넣어 형광현미경으로 형광발현 유무를 관찰하였다. Recombinant 바이러스에 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백질의 발현 유무 및 성상을 확인 분석하기 위하여 Towbin 등의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다. 즉, recombinant 바이러스를 접종하여 27°C에서 72시간 동안 배양하여 수확한 Sf9 세포와 대조군으로 바이러스를 접종하지 않은 Sf9 세포를 flask로부터 떨어뜨려 원심분리한 뒤 얻은 상층액과 pellet을 Western blot의 샘플로 사용하였다. 각각의 sample을 NuPAGE LDS Sample Buffer(4X)와 NuPAGE LDS Reducing Agent(10X)를 혼합하여 70°C에서 10분간 끓여 denaturation 시켰다. 처리된 sample을 12% Bis-Tris Mini Gel(Invitrogen)에서 200V로 60분간 전기영동한 후, NuPAGE transfer buffer에 30분간 침지시켰다. 미리 transfer buffer에 침지시켜 놓은 filter paper와 nitrocellulose membrane사이에 gel을 넣어 semi trans-blot를 이용하여 25V로

90분간 transfer하였다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5: TBS)에서 2시간 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 His₆ 혹은 V5에 특이적인 토끼 항혈청과 돼지 C형 로타바이러스 항혈청을 1:2,000과 1:1,000으로 각각 희석하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰으며 TBS로 3회 세척하였다. 그리고 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG(Kirkegaard Perry Laboratory) 또는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-swine IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution(Boehringer mannheim) 200 μ l을 alkaline phosphatase buffer(0.1M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂) 10ml에 섞어 사용하여 결과를 확인하였다.

(3) 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 단클론 항체생산 및 특성조사

돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 단클론항체는 baculovirus expression system에서 발현한 VP6 단백을 면역원으로 하여 일반적인 세포융합 방법에 따라 연구를 수행하였다.

(가) Mouse 면역

세포융합에 사용할 mouse는 4-6 주령의 BALB/c strain을 사용하였다. Baculovirus expression system에서 발현한 VP6 cell lysate를 동량의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합한 뒤 mouse의 foot-pad를 통하여 3일 간격으로 4회 접종하였으며 1차는 Freund's complete adjuvant와 2차부터는 Freund's incomplete adjuvant와 혼합한 항원을 사용하였다.

(나) 양성 hybridoma 검색법 확립

돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 양성 hybridoma는 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)을 이용하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 즉, 검색할 hybridoma 배양 상층액 100 μ l를 돼지 C형 로타바이러스 VP6 제조합바이러스(rGpC 6-2) 또는 돼지 C형 로타바이러스(Cowden strain)로 감염시키고 48시간 후에 80% acetone으로 고정시킨 well에넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 반응 후, PBS로 3회 세척하고 FITC가 conjugate된 goat anti-mouse immunoglobulin을 첨가하여 다시 30분 동안 같은 온도에서 반응시켰다. 30분 후 세포를 PBS로 세척하고 형광현미경으로 관찰하여 형광을 나타내는 well의 hybridoma를 돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 단클론항체 양성으로 판정하였다.

(다) 세포융합

세포융합은 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백질로 면역된 mouse의 서혜절 입과

질세포와 SP2/0 myeloma 세포를 polyethylene glycol(PEG) 1500을 사용하여 일반적인 세포융합 방법에 따라 시행하였다. 세포융합이 끝난 혼합세포액은 20% 소태아 혈청과 HAT(50 uM Hypoxanthine, 0.4 uM Aminopterin, 16 uM Thymidine)가 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시킨 다음 96-well 조직배양 plate에 well 당 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소 조건 하에서 배양하고, 배양 후 3, 5, 7 및 9일에 새로운 HAT와 HT배지로 교환하였다. Hybridoma 세포가 well의 30% 이상 증식하였을 때(세포 융합 후 10-15일) 돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 양성 hybridoma는 위에서 확립한 검색방법으로 선별하였다. 양성으로 확인된 hybridoma 세포는 limiting dilution 방법으로 2회 이상 크로닝 하고 단클론항체로 확인된 hybridoma 세포는 일부는 액체질소에 저장하였다. 반면에 limiting dilution방법으로 크로닝된 양성 hybridoma 세포는 소태아혈청이 함유되어 있지 않은 RPMI 1640 배지로 1회 세척한 후, 1 x 10⁶개의 세포를 pristane으로 미리 감작시킨 BALB/c mouse의 복강 내로 접종하고 10-15일 후 복수를 채취하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 실험에 사용하였다.

(라) 단클론항체 특성 규명

생산된 단클론항체의 isotype은 Monoclonal antibody isotyping kit(Sigma)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 다음과 같이 확인하였다. 즉, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA 그리고 IgM에 대한 항체를 coating buffer에 1:2,000으로 희석하여 100 μ l씩 96-well pate에 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 흡착시켰다. PBS-T로 3회 세척한 후, 검사하고자 하는 단클론항체를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척한 후, peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG를 1:2,000으로 희석하여 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. PBS-T로 3회 세척한 후 TMB substrate로 발색시켰다. 10분 후, stop solution(1M H₂SO₄)을 100 μ l씩 넣어 반응을 중지시키고 450nm에서 흡광도를 측정하여 isotype을 확인하였다. 각각의 단클론항체가 돼지 group C 로타바이러스 VP6 단백질과 반응성을 확인하기 위하여 Towbin의 방법으로 Western blotting을 다음과 같이 실시하였다. 즉, 돼지 group C 로타바이러스 VP6 재조합단백을 NuPAGE LDS Sample Buffer(4X)와 NuPAGE LDS Reducing Agent(10X)를 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓여 denaturation 시켰다. 처리된 샘플을 12% Bis-Tris Mini Gel(Invitrogen)에서 200V로 60분간 전기영동한 후, NuPAGE Transfer Buffer에 30분간 침지시켰다. 미리 transfer buffer에 침지시켜놓은 filter paper와 nitrocellulose membrane사이에 gel을 넣어 semi

trans-blot를 이용하여 25V로 90분간 transfer하였다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5: TBS)에서 2시간 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 검사하고자 하는 단클론항체의 배양상층액은 희석하지 않고, 그리고 복수는 1:500-1:2,000으로 희석하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰으며 TBS로 3회 세척하였다. TBS로 3회 세척한 후 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated-goat-anti-mouse IgG+M(Kirkegaard Perry Laboratory)을 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution (Boehringer mannheim) 200 μ l을 alkaline phosphatase buffer(0.1M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂) 10ml에 섞어 사용하여 결과를 확인하였다.

(마) 단클론항체 역가 확인

생산된 단클론항체의 역가는 IFA법으로 확인하였다.

(바) 단클론항체와 A형 로타바이러스와 반응성 조사

각각의 단클론항체와 A형 로타바이러스와의 반응성은 IFA법으로 다음과 같이 수행 하였다. 즉, MA104 세포가 96-well plate에서 monolayer로 형성된 후, 사람 유래 로타바이러스인 Wa, DS, M, ST3 그리고 F45 strain과 동물유래 로타바이러스인 NCDV, OSU, Gottfried, AEQ 그리고 B223 strain을 각각 희석하여 감염시켰다. CPE를 확인한 후 80% acetone으로 10분간 고정시키고 PBS로 3회 세척하여 검사 하고자 하는 단클론항체를 100 μ l 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회세척하고 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG+M을 1:100으로 희석하여 1 drop씩 첨가하여 1시간동안 반응시켰다. PBS로 3회 세척한 후 80% glycerol을 1 drop씩 떨어뜨려 형광현미경으로 관찰하여 로타바이러스 특유의 형광이 나타나는 것을 양성으로 판정하였다.

(사). 단클론항체와 다른 돼지 바이러스와 반응성 조사

각각의 단클론항체와 돼지에서 문제가 되고 있는 전염성위장염바이러스 (Transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지유행성설사증바이러스(Porcine epidemic diarrhea virus; PEDV) 및 돼지생식기호흡기증후군바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)와의 반응성은 A형 로타 바이러스와의 반응성 조사와 동일한 IFA법으로 조사하였다.

나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이항체 제작

- (1) 소 C형 로타바이러스의 VP6 유전자를 baculovirus에서 발현시키기 위하여 RT-PCR법에 의하여 C형 로타바이러스 양성으로 확인된 소 설사분변 (#04-56-136)을 제1 협동과제 연구책임자인 조경오박사로부터 분양받아 사용하였다. 또한, 현재 조직배양이 가능한 돼지 C형 로타바이러스 Cowden strain을 미국 오하이오 주립대학교의 Dr. Linda Saif로부터 분양받아 원숭이 신장세포 유래인 MA104 세포주를 사용하여 증식시켜 대조군으로 사용하였다. MA104세포는 5% 소태아혈청(Fetal calf serum: FCS)이 함유된 α -MEM 배지를 사용하여 배양하였다.
- (2) 소 C형 로타바이러스 VP6 유전자 크로닝 및 발현은 돼지 C형 크로닝 방법과 동일한 방법으로 수행 하였다.
- (3) 소 C형 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 단클론 항체생산 및 특성조사
돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 단클론항체생산 및 특성조사와 같은 방법으로 수행 하였다.

다. 돼지 C형 로타바이러스 특이 복합항체 생산

- (1) VP6 단백질 정제
돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 복합항체 생산에 필요한 항원은 Baculovirus에서 발현된 VP6 단백질을 사용하며 Ni-NTA agarose column을 이용하여 제조사의 술식에 따라 정제하였다.
- (2) 복합항체 생산 및 특성 규명
복합항체 생산에는 토끼를 사용하며 Baculovirus 발현 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백질을 항원으로 사용하였다. 정제한 항원(100 μ g/ml)을 동량의 Freund's complete adjuvant와 잘 혼합한 뒤 토끼의 근육 및 피하로 1차 접종하고, 3주 후 같은 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 잘 혼합하여 같은 경로로 2차 접종하였다. 3주 후 2차 접종과 같은 방법으로 3차 접종하고, 2주 후 채혈하여 돼지 C형 로타바이러스 VP6에 대한 항체역가를 IFA법으로 측정하였다. 돼지 C형 로타바이러스 VP6에 대한 항체역가가 충분히 높을 경우에는 채혈하여 혈청을 분리하여 -20 $^{\circ}$ C에 저장하고 항체역가가 낮을 경우에는 3차 접종과 같은 방법으로 추가 접종하였다. 생산된 복합항체의 역가 및 A형 로타바이러스와의 반응여부는 IFA법으로 확인하였다.

라. 소 C형 로타바이러스 특이 복합항체 생산 : 상기와 같은 방법으로 수행 하였다.

3. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One/step Rapid Kit
제조 및 산업화

가. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 One/step Rapid Kit 제작

(1)제2협동과제에서 선별된 항 돼지 혈청형 C로타바이러스 단클론 항체와, 항 소 혈청형 C 로타바이러스 단클론 항체의 가장 좋은 선별을 위해 마우스 복강에서 배양 후 protein G로 정제 과정을 거치고, 각각을 1mg/ml로 농도를 조절 한 후 nitrocellulose membrane에 1ul씩 dot blotting 하였다. 약 40nm의 gold colloid에 각각의 항체를 접합 시킨 후 baculovirus에서 발현 확인된 돼지, 소 C형 로타바이러스의 VP6 단백질과 PCR, nested PCR로 양성 판정된 돼지, 소 분변 각각 1 검체씩을 양성 대조로 ,배지자체 및 PCR, nested PCR로 음성 판정된 돼지, 소 분변 각각 1 검체씩을 제1협동과제 연구책임자인 조경오박사로 부터 분양받아 검사에 사용하고 최적의 capture 와 detector를 선별 하였다.

그림 Schematic diagram of C-rota Rapid

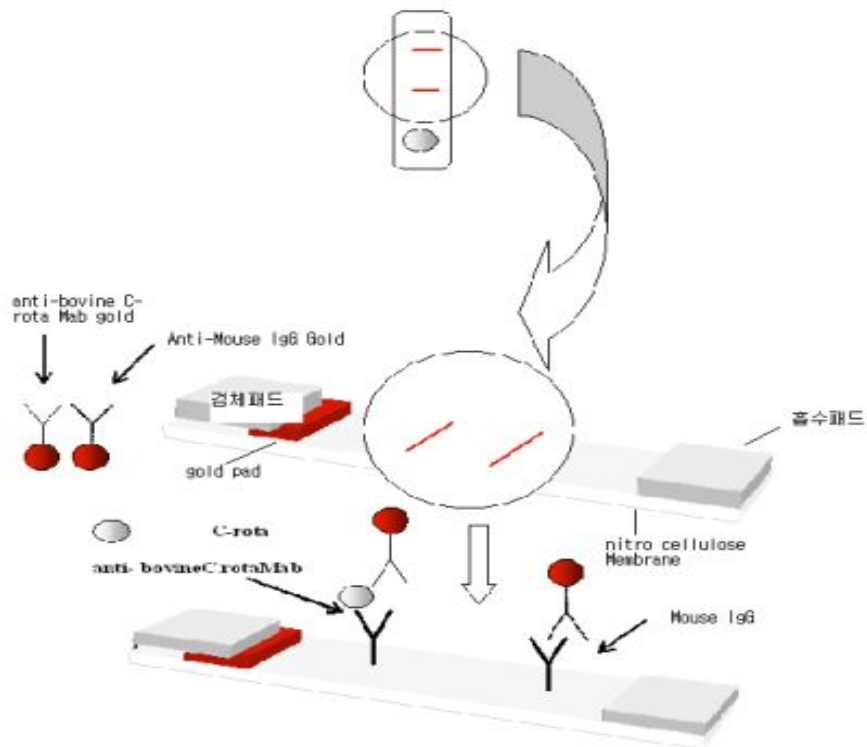


Fig 3-2. Schematic diagram of Raipd test

(2) 선별된 capture 와 detector를 이용 kit를 제조하였다.

(가) 항체고정 멤브레인

검사선에 7E7 항체를 희석용 완충액(10 mM 붕산염 완충액) 으로 2.5 mg/ml로 희석한 후 니트로 셀룰로즈 멤브레인용 분주기를 이용하여 1 μ l/ cm 비율로 나이트로셀룰로즈 멤브레인에 분주하여 1.0 \pm 0.1 μ g/Device로 제조하며, 대조선에는 산양- 마우스 면역글로블린지를 희석용 완충액(10 mM 붕산염 완충액)으로 농도가 2.5 mg/ml이 되도록 희석하여 만든 용액을 멤브레인용 분주기를 이용하여 1 μ l/ cm 비율로 니트로셀룰로즈 멤브레인에 분주하여 1.0 \pm 0.1 μ g /Device 로 제조한다. 준비된 나이트로 셀룰로즈 멤브레인을 확인 검사대에 올려놓고, 코팅액이 정상적으로 코팅이 되었는지의 여부를 검사후, 소혈청 알부민이 함유된 용액으로 봉쇄한다. 정상적으로 코팅이 된 멤브레인을 37 $^{\circ}$ C에서 항온 하여 건조한 후 조립 전 까지 밀봉 포장하여 배송상태로 보관한다.

(나) 콜로이드성 금입자 제조

Gold chloride solution에 Na-citrate를 첨가하여 gold chloride를 환원시켜 입자크기가 약 40 nm인 Colloidal gold를 생성시킨다.

(다) 금입자 표준화 시험

광도계에 규정된 용기에 1ml의 주사용 증류수를 넣고 O.D 값을 520nm로 측정한 흡광도를 0값으로 한다. 검체를 증류수로 적량 희석하여 검체의 흡광도가 검량선의 직선역일 때 그 측정치에서 흡광도 값을 읽는다. 희석도를 곱하여 검체의 흡광값(O.D)으로 하여 실측정치로 한다.

(라) Conjugation

gold colloid에 5E4 항체 1.0mg/ml을 gold 용액에 1/10 첨가한 후 실온에서 1 시간 동안 진탕 반응 시킨다. 반응이 완료된 금 입자를 세척하고 흡광도계를 이용하여 520nm에서 흡광도 값을 측정하여 정량한 후 보존제를 첨가하고, 콜로이드성 금입자에 항체가 일정하게 접합되었는지를 확인하기 위하여 이미 제조된 디바이스 및 골드 콘쥬게이트를 이용하여 시험하여 접합 효율을 측정한다.

(마) 유리섬유에 흡습

5E4항체 골드 콘쥬게이트를 혼합하여 유리섬유에 0.4cm \pm 0.04 \times 0.5 \pm 0.05cm당 50 μ l를 사용하여 균질하게 흡수시킨다. 상대 습도 20% 이하 상태에서 4시간 이상 건조한다. 건조가 완료된 골드 건조 유리섬유를 원료약품의 분량 항에 명기된 규격으로 절단하여 조립 전 까지 밀봉

포장하여 제습 상태로 보관한다.

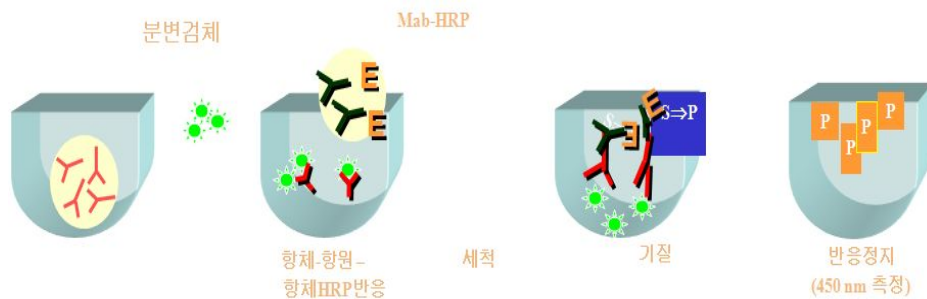
(바) 조립 및 절단

코팅한 멤브레인의 하단에 골드 콘쥬게이트 패드와 검체 패드를 순차적으로 중첩되도록 부착하고 상단 에는 흡수 패드를 부착한다. 이 시험지를 전용 절삭기를 사용하여 $4.0 \pm 0.4\text{mm} \times 60 \pm 6.0\text{mm}$ 규격으로 절단하고 디바이스 조립 전까지 방습 포장하여 보관한다.

나. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA Kit 제작

- (1) 2협동과제에서 제조된 단클론 항체의 capture와 detector의 pairing 예비시험에서 Rapid Kit에서와 같이 capture는 7E7, detector는 5E4로 선별 하고 direct one-step ELISA 법으로 고안 하였다(그림3-3). ELISA법에 capture antibody로 사용할 단클론 항체의 적정농도를 결정하기 위하여 checkerboard 적정법 이용 하였다.

Fig 3-3. Schematic diagram of direct 1 step Sandwich ELISA



- (2) 선별된 capture 와 detector를 이용 kit를 제조하였다.

(가) 항체 흡착 96 well plate

정제된 7E7 Mab를 0.1 M Carbonate 버퍼 (pH 9.6)에 0.25 ~ 0.5 ug/ml의 농도가 되도록 희석시킨 후 자동분주기를 사용하여 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 ul씩 분주한다. 분주 후 2 ~ 8°C 조건에서 15 ~ 24 시간 동안 정치하여 항체를 흡착시킨 후 흡입장치를 사용하여 내용물을 제거하고 0.1 % casein이 포함된 인산염 생리완충용액(pH 7.0 ~ 7.5)을 각 웰에 250 ul씩 자동분주한다. 15 ~ 30 °C에서 2 ~ 6 시간 동안 도포시킨 후 흡입장치를 사용하여 내용물을 제

거 하고 2 ~ 8 °C에서 건조시킨다.

(나) Mab 5E4 -HRP conjugation

HRP(Sigma Cat No P8375)와 항체의 몰비를 1:4로 설정하여 필요한 양을 구하고 증류수에 첨가하고 완전히 용해한 후 HRP 용액에 0.5M NaIO₄ 용액을 HRP질량 4mg 당 0.1ml 첨가하고 25±5°C에서 20±2분간 교반한다. 준비된 항체에 활성화된 HRP용액을 첨가하고 사용한 HRP질량 4mg당 0.02ml의 비율로 1M Na₂CO₃를 첨가 하여 pH 9.6±0.2임을 확인한다. 25±5°C에서 180±5분간 교반한다. 반응이 끝난 접합체액을 가루 얼음속에 10±2분간 정치시킨 후 사용한 HRP질량 4mg 당 0.1ml의 비율로 1M NaBH₄을 첨가하여 4±1°C에서 120±5분간 정치시켜 반응 정지시킨다. 접합체액을 open column에 DEAE-T겔을 이용하여 20mM Tris(pH7.2±0.1)로 컬럼을 세척한다. monitor 상에서 평형상태가 이루어졌을때 ion gradient로 용출한다. 용출액의 main peak중 OD = 0.1이상 튜브만 모아서 흡광도를 측정한다. 후, 용출액에Kathon CG(RhomHass)를 1/2000배량 첨가하여 0.2µm Minisart를 이용하여 여과한다

(다) 봉쇄용액의 결정

ELISA법에 적합한 blocking 완충용액을 선별하기 위하여 3% non-fat dried milk (NFDM), 5% NFDM, 3% bovine serum albumin (BSA), 5% gelatin, 3%NFDM + 3% BSA, 그리고 0.1% Tween 20의 blocking 완충용액을 가지고 ELISA를 수행하였다.

(라) 기질용액

Bio FX사의 TMB working용액을 사용 하였다.

다. 돼지,소혈청형 C로타바이러스 항원 검출용 Raipid, ELISA Kit의 민감도 특이도시험 1협동기관에서 분리하여 RT-PCR 및 Nested PCR 양성 검체 및 음성 검체를 사용 사용하여 본 연구에서 확립된 Rapid, ELISA kit의 민감도, 특이성을 조사하였다.

(1) Rapid 검사방법

분변을 면봉을 이용하여 채취하고, 검체 추출액에 넣어 면봉을 추출액 용기 벽면에 문지른 후 드로퍼로 2-3 방울 혹은 마이크로 피펫으로 100-120ul를 검체 주입구에 떨어뜨린 후 반응이 끝나는 10-15분 후에 판독하여 검사선 및 대조선에서 모두 색이 나타나면 양성으로, 대조선에서만 색이 나타나면 음성으로 판정 한다.

(2) ELISA 검사방법

실링된 96well pouch를 개봉 하여 1-A,1-B에 양성 대조액을 1-C, 1-D에 음성대조액을 각각 100ul 넣으며, 검체는 검체회석액 0.5ml에 먼봉을 이용 회석된 검체 각각 100ul씩 1-E부터 넣고 각 well에 접합체액 25ul를 첨가하여 잘 흔들어 주고 실온에서 90분간 반응 한 후 washer로 1회에 세척액 300ul/well로 6회 세척 한 후 기질 100ul를 첨가하여 실온에서 10분 반응 후 반응정지액을 100ul 첨가하여 reader로 492nm에서 흡광도를 측정한다. 양성대조는 O.D 1.0 이상이어야 하며 음성대조는 0.25 이어야 하며 판독은 음성 평균 값에 +0.100 한 값보다 높으면 양성으로 판정 한다.

제 4 절 연구개발 수행 결과

1. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

(1) 혈청형 C 로타바이러스 검출

총 55개 농가 137개 자돈 설사분변을 대상으로 혈청형 C 로타바이러스 검출용 프라이머쌍을 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 36개(26.3%)의 설사분변이 혈청형 C 로타바이러스에 양성 이었다. 이중에서 10개 분변은 2개 이상의 프라이머쌍을 이용한 RT-PCR에서 양성이었으며, 26개 분변은 오직 C1 및 C4 프라이머쌍에서만 양성 이었고 특히 C1 및 C4 프라이머쌍을 이용한 RT-PCR이 가장 민감도가 높았음을 알 수 있다.(표3-4).

Table3-4. RT-PCR assay results for the individual swine fecal samples

Porcine fecal samples positive using RT-PCR assays ^a					No. of total positive samples ^b
(No. of positive samples/Total No. of total samples %)					
RVCF1/T778a	T729/T778a	C1/C4	BMJ145/BMJ44	T383/RVCnR2	
3/137 (2.2%)	0/137 (0%)	28/137 (20.4%)	9/137 (6.6%)	10/137 (7.3%)	36/137 (26.3%)

^aVirus and target protein for each primer pair are listed in Table3-1.

^bFecal samples were considered positive if at least one positive fecal sample was detected in the same sample by one of the primer pairs.

(2) 국내 돼지 혈청형 A 로타바이러스 VP6 유전자의 분자적 특성

24개 국내 주들 중에서 23개는 돼지 Cowden 주와 소의 WD534tc 주(돼지 유래로 간주 됨)와 계통학적으로 같은 lineage에 속한다. 하지만 24개 중에서 1개는 소혈청형 C 로타바이러스인 Shintoku 주와 Yamagata 주와 같은 lineage에 속하였다(그림3-4).

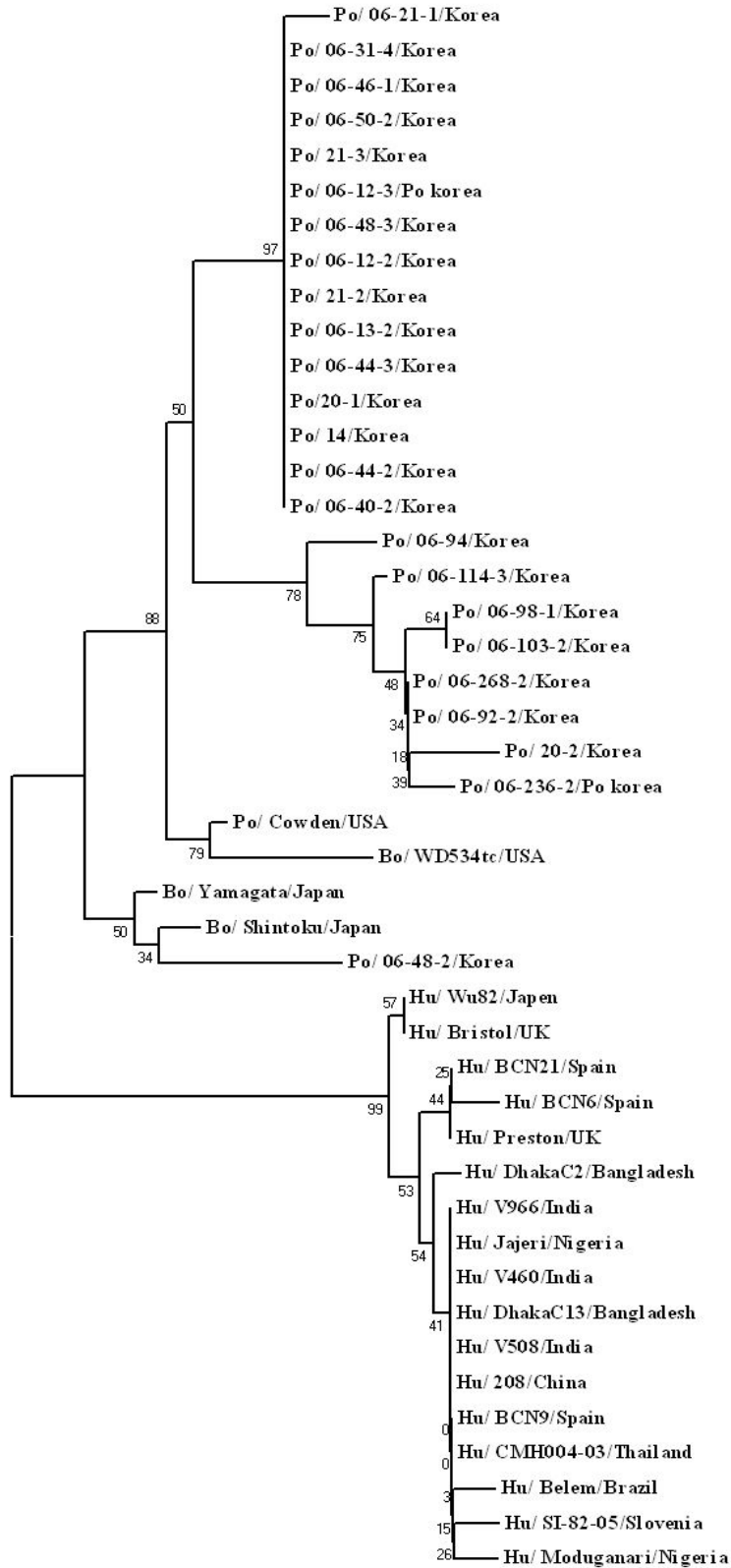


Fig 3-4. Phylogenetic tree of a VP6 peptide (aa 334 to 395) of the Korean porcine group C rotavirus strains showing its genetic relationship with the other group C rotavirus strains.

(3) 국내 돼지 혈청형 C 로타바이러스의 VP6 유전자와 기존에 보고된 돼지, 소, 사람 혈청형 C 로타바이러스의 VP6 유전자의 핵산 및 아미노산 염기서열분석 계통학적 분석결과와 동일하게 23개의 국내 돼지 혈청형 A 로타바이러스는 상호간에 86.5-100%의 핵산 및 89.9-100%의 아미노산 염기서열 상동도를 보이며 이러한 바이러스들은 돼지 혈청형 C 로타바이러스 prototype인 Cowden 주나 소 WD534ct 주와 85.8-96.0%의 핵산 및 89.8-96.0%의 아미노산 상동도를 보이고, 반면에 나머지 한 개 주는 소 혈청형 C 로타바이러스인 Shitoku 주와 Yamagata 주와 89.0-89.7%의 핵산 및 92.9-93.9%의 아미노산 상동도를 보인다(표 3-5).

Table 3-5. Nucleotide and deduced amino acid sequence comparison of the VP6 of the Korean group C rotavirus strains with that of the other strains

Strain	Origin	% identity with strains ^a			
		23 Korean strains ^b		One Korean strain ^c	
		nt	aa	nt	aa
Cowden	Porcine	87.4-89.4	91.9-96.0	84.8	90.9
WD534tc	Bovine	85.8-87.7	89.8-94.9	83.5	88.8
Shintoku	Bovine	85.8-87.4	89.9-92.9	89.7	93.9
Yamagata	Bovine	84.8-87.1	90.9-93.9	89.0	92.9
V996	Human	82.3-84.8	81.8-83.8	83.9	85.9
DhakaC2	Human	82.6-84.8	81.8-83.8	83.5	84.8
BCN6	Human	82.3-84.5	80.8-82.8	83.9	88.8
Bristol	Human	82.9-85.2	82.8-84.8	83.9	84.8
Belem	Human	81.9-83.9	80.8-82.8	84.5	84.8
Jajeri	Human	83.2-85.2	81.8-83.8	84.2	85.9
Wu82	Human	81.9-84.5	82.8-84.8	83.5	84.8
SI-82-05	Human	81.6-84.2	81.6-82.8	83.9	84.8

^aThe classification of Korean GCRV strains into 23 and 1 is based on the phylogenetic data in which they clustered on the separate branches (Fig.3-4). ^bThe nucleotide and deduced amino acid sequence identities of VP6 among the Korean 23strains were 86.5-100% and 89.9-100%, respectively. ^cThe nucleotide and deduced amino acid sequence identities of VP6 between the Korean 23 and 1 strains were 82.9-84.8% and 85.9-88.9%, respectively.

(4) Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 이용한 야외 돼지 설사분변에서 혈청형 C 로타바이러스의 PAGE patterns 확인
C 로타바이러스의 전형적인 PAGE 패턴인 4-3-2-2 패턴을 확인할 수 있었다.

나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 역학조사

(1) 국내 소 혈청형 C 로타바이러스 역학조사를 수행하기 위해서, 봄철에 11개 농가에서 30개 설사분변, 여름철 11개 농가 29개 설사분변, 가을철 14개 농가 33개 설사분변, 겨울철 16개 농가 35개 설사분변을 채취 하였으며 소 혈청형 C 로타바이러스는 봄철에 1건 (1/30 fecal samples, 1/11 herds), 여름철에는 0건 (0/29 samples, 0/11 herds), 가을철에 4건 (4/33 samples, 4/14 herds), 겨울철에 2건 (2/35 samples, 2/16 herds)이 검출되었다. Table 3-2 의 혈청형 C 로타바이러스 검출용 프라이머쌍을 이용하여 RT-PCR 및 nested PCR을 수행한 결과, 오직 nested PCR에서만 6개(26.3%)의 설사분변이 혈청형 C 로타바이러스에 양성 이었다.

(2) 국내 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 유전자의 분자적 특성

Nested PCR에 의해서 증폭된 7개의 국내 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 유전자의 249 bp (nt 1075-1322)에 대하여 염기서열을 외국 보고주들과 비교분석을 수행한 결과는 Table3-6과 같다. 국내 송아지에서 발생하고 있는 설사증에서 혈청형 C 로타바이러스 및 기타 바이러스성, 세균성, 기생충성 감염증과의 혼합감염을 조사하기 위해 송아지에 설사를 유발하는 다수의 바이러스들에 대하여 RT-PCR 및 nested PCR을 수행 하였으며, 세균분리 및 원충 검사를 수행한 결과 표 3-6에서 보이는 바와 같이 소 혈청형 C 로타바이러스 단독감염은 3건의 설사분변(2.4%)에서 검출되었고, 나머지 4건의 소 혈청형 C 로타바이러스 양성 분변에서는 혈청형 A 로타바이러스, BVDV, 노로바이러스 및 소 네브라스카양 칼리시바이러스와 혼합 감염 되어 있음을 알 수 있었다.

Table 3-6. Genbank accession numbers of the VP6 gene of the Korean bovine group C rotavirus strains and the reference group C rotavirus strain used in phylogenetic and sequence analyses

Strains	Origin	Accession numbers	Strains	Origin	Accession numbers
KJ64	Bovine	1349251	DhakaC2	Human	AY754827
KJ297	Bovine	1349257	Jajeri	Human	AF325805
KJ298	Bovine	1349258	Bristol	Human	X59843
KJ317	Bovine	1349260	Preston	Human	M94156
KJ353	Bovine	1349261	BCN6	Human	AM118018
KJ423	Bovine	1349262	BCN21	Human	AM118020
KJ514	Bovine	1349264	Wu82	Human	EF528570
Yamagata	Bovine	Ab108680	Moduganari	Human	AF325806
Shintoku	Bovine	M88768	CMH004	Human	EF641110
WD534tc	Bovine	AF162434	Belem	Human	M94155
Cowden	Porcine	M94157	V460	Human	AY786570
KJ 06-12-2	Porcine	FJ494666	V966	Human	AY786571
KJ 06-50-2	Porcine	FJ494682	V508	Human	AY795898
KJ 06-94	Porcine	FJ494684	C08	Human	AB008672
KJ 06-268-2	Porcine	FJ494689			

표 3-7에서 보이는 바와 같이 국내 소 혈청형 C 로타바이러스는 다양성을 보인다. 2개 바이러스(KJ353 및 KJ297)는 소 혈청형 C 로타바이러스 표준주인 Shintoku 주 및 Yamagata주와 95.1-97.6%의 핵산 및 98.4-96.8%의 아미노산 염기서열 상동성을 보이며, KJ423주는 국내에서 보고된 돼지 혈청형 C 로타바이러스인 KJ06-268-2 및 KJ06-94-2와 93.2-93.7%의 핵산 및 90.5-95.2%의 아미노산 염기서열 상동성을 보였다. KJ514주는 국내에서 보고된 돼지 혈청형 C 로타바이러스와 96.6%의 핵산 및 93.7%의 아미노산 염기서열 상동성을 보였으며, 나머지 3개 바이러스는 소와 돼지 혈청형 C 로타바이러스와 85.4-92.2%의 핵산 및 84.1-92.1%의 아미노산 염기서열 상동성을 보였다.

Table 3-7. Nucleotide sequence deduced amino acid sequence comparison of the VP6 of the Korean group C rotavirus strains with that of the other strains

Strain	Origin	% identity with strains ^a							
		2 Korean strains ^b		1 Korean strain ^c		1 Korean strain ^c		3 Korean strains ^b	
		nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa
<i>Shintoku</i>	<i>Bovine</i>	97.1-97.6	96.8	88.8	93.7	89.8	92.1	88.3-91.7	85.7-87.3
<i>Yamagata</i>	<i>Bovine</i>	95.1-95.6	98.4	89.8	92.1	90.7	90.5	87.3-89.8	84.1-85.7
Cowden	Porcine	88.3-88.8	92.1	89.3	93.7	89.8	88.9	87.3-88.8	87.3-88.9
<i>KJ06-12-2</i>	<i>Porcine</i>	87.8-88.8	90.5	89.3	92.1	96.6	93.7	87.8-92.2	88.9-92.1
<i>KJ06-50-2</i>	<i>Porcine</i>	87.8-88.3	90.5	89.3	92.1	96.6	93.7	87.8-92.2	88.9-92.1
<i>KJ06-268-2</i>	<i>Porcine</i>	87.3-87.8	90.5	93.2	95.2	87.8	88.9	88.8-90.2	87.3-88.9
<i>KJ06-94-2</i>	<i>Porcine</i>	85.4-85.9	88.9	93.7	90.5	87.3	87.3	87.3-89.3	87.3-90.5
WD534tc	Bovine	86.3-86.8	90.5	87.8	92.1	86.8	90.5	85.4-86.8	88.9-90.5
Bristol	Human	80.0-84.4	81.0	82.4	79.4	82.0	74.6	80.0-82.0	73.0-74.6
BCN6	Human	83.4-83.9	79.4	82.0	77.8	81.5	73.0	79.5-81.5	71.4-73.0
BCN21	Human	83.4-83.9	79.4	82.0	77.8	81.5	73.0	79.5-81.5	71.4-73.0
Belem	Human	83.4-83.9	81.0	81.0	76.2	81.5	74.6	78.5-81.5	69.8-71.4
C208	Human	82.9-83.4	79.0	81.5	77.8	82.0	73.0	79.0-82.0	71.4-73.0
Jajeri	Human	82.9-83.4	79.4	81.5	77.8	82.0	73.0	79.0-82.0	71.4-73.0
Wu82	Human	82.9-83.4	81.0	81.0	79.4	81.5	74.6	78.5-81.5	73.0-74.6
CMP004	Human	82.9-83.4	79.4	81.0	77.8	81.5	73.0	78.5-81.5	71.4-73.0
Perston	Human	79.0-83.4	79.4	81.5	77.8	81.0	73.0	79.0-81.0	71.4-73.0
DhakaC2	Human	82.0-82.4	77.8	81.5	77.8	82.0	73.0	79.0-82.0	71.4-73.0
Moduganari	Human	82.0-82.4	77.8	80.5	76.2	81.0	71.4	78.0-81.0	69.8-71.4

(2) 국내 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 유전자의 계통학적 특성

Nested PCR에 의해서 증폭된 7개의 국내 소 혈청형 C 로타바이러스 VP6 유전자의 249 bp의 염기서열과 외국 보고주들과의 상관관계를 계통학적으로 분석하였다 (그림3-5). 염기서열 상동성 검사결과와 유사하게 계통학적으로도 2개 바이러스(KJ353 및 KJ297)는 소 혈청형 C 로타바이러스 표준주인 Shintoku주 및 Yamagata주와 근

연관계를 보였다. 돼지 혈청형 C 로타바이러스와 높은 상동성을 보인 KJ514 및 KJ423주는 돼지 혈청형 C 로타바이러스와 같은 계통에 있었으며, 반면에 돼지 및 소 혈청형 C로타바이러스와 공히 높은 상동성을 보인 나머지 3개 주(KJ298, KJ317, KJ64)는 돼지 혈청형 C 로타바이러스 lineage에 속해 있었지만, 기존 보고주와는 다른 sublineage를 형성 하였다. 이상의 결과 국내 소 혈청형 C 로타바이러스는 유전학 적으로 다양성이 있음을 알 수 있었으며, 특히 돼지에서 유래한 것이 있음이 규명되었다.

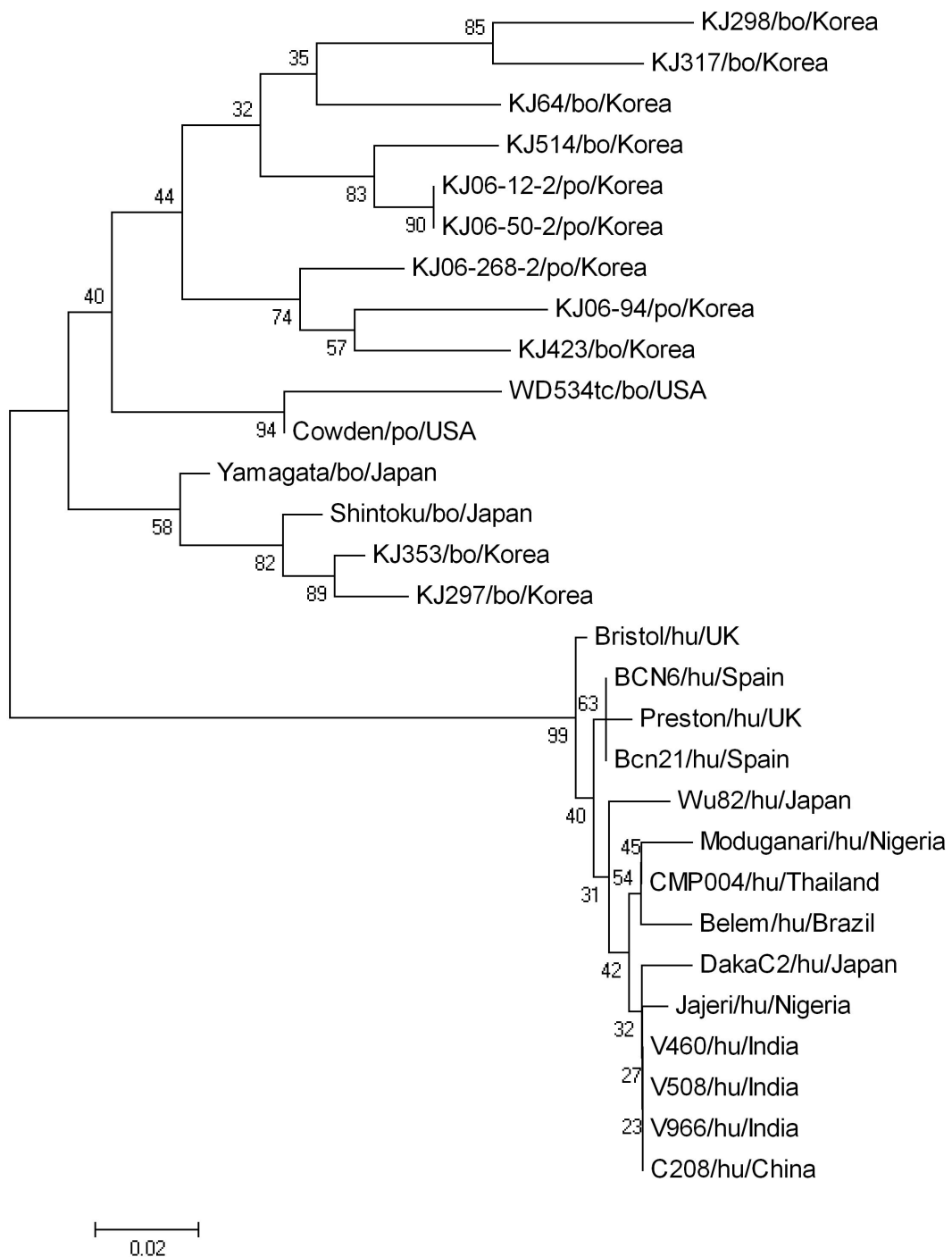


Fig 3-5. Phylogenetic tree of a partial VP6 gene of the Korean bovine group C rotavirus strains showing its genetic relationship with the other group C rotavirus strains.

다. 야외증례에 대한 병리 면역학적 연구

(1) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 및 혼합 감염증례에 대한 병리조직학적 검사

부검 후 10% 중성포르말린에 고정된 돼지 혈청형 C 로타바이러스 감염증례의 소화기 장기에 대한 병리조직학적 검사를 수행한 결과 혈청형 C 로타바이러스에 감염된 소장외의 용모병변은 용모 상피세포의 탈락에 의한 용모의 위축 및 융합과 탈락된 상피세포의 대체를 위한 음와의 증식이었으며, 또한 용모 고유층에는 림프구양 세포들이 침윤되어 있었다. 일반적으로 혼합 감염된 병변에서 병변의 지수가 높았으나, 바이러스 감염초기 혹은 후기 병변의 양상에 따라서 단독 혹은 혼합감염에 의한 병변의 지수가 달랐음(그림 3-6). 부검 증례의 연령이 증가할수록 호흡기 감염 발생률이 증가하였지만, 돼지 혈청형 C 로타바이러스 감염률은 낮아졌는데 이는 포유자돈에서는 바이러스성 장염이 우세하다, 연령이 증가하여 이유자돈으로 넘어가면 호흡기 감염이 증가되는 경향과 일치하였다. 즉 폐의 조직학적 소견으로는 간질성 폐렴, 화농성 폐렴, 화농성 간질성 폐렴의 양상이 관찰되었다(그림 3-7). 간질성 폐렴은 PRRSV나 PCV2의 감염에 의한 것으로 판단되며, 이러한 바이러스와 2차 감염균인 세균성 폐렴균과 혼합되는 경우에 있어서는 화농성 간질성 폐렴이 관찰되었으며 화농성 폐렴의 경우에는 특히 *Haemophilus parasuis* 균이 자주 분리 되었다. 이 경우에 있어서는 화농성 폐렴뿐만 아니라, 섬유소성 흉막염, 심낭염, 복막염 등이 관찰되었다.

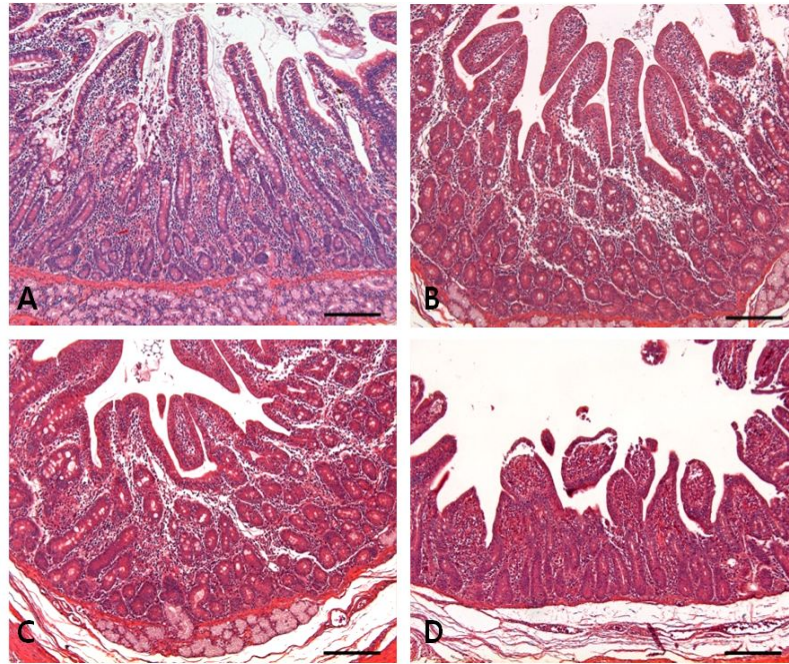


Fig3-6. Histopathological changes of small intestine sampled from the piglets infected with group C rotavirus alone or concurrent infections of group C rotavirus and other enteric viruses. (A) Duodenum sampled from a piglet infected with group C rotavirus alone. Villi are moderately atrophied, inducing moderate crypt hyperplasia. Note severe lymphoid cell infiltration in the lamina propria, indicating chronic inflammation. (B) Duodenum sampled from a piglet infected with group C and other enteric viruses. Villi are moderately atrophied, inducing moderate crypt hyperplasia. Note moderate lymphoid cell infiltration in the lamina propria, causing chronic inflammation. (C) Duodenum sampled from a piglet infected with group C and other enteric viruses. Villi are moderately atrophied, inducing moderate crypt hyperplasia. Note villi fusion and moderate lymphoid cell infiltration in the lamina propria, indicating chronic inflammation. (D) Duodenum sampled from a piglet infected with group C and other enteric viruses. Villi are severely atrophied, eliciting severe crypt hyperplasia. Note villi fusion and moderate lymphoid cell infiltration in the lamina propria, indicating chronic inflammation. Hematoxylin and eosin stain. Bar = 100 μ m.

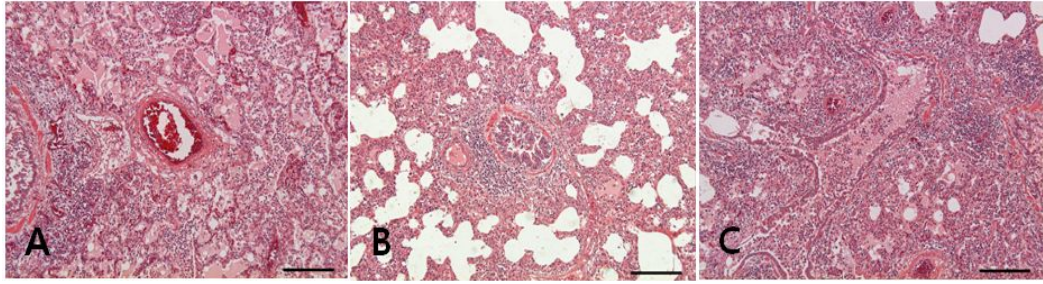


Fig. 3-7. Histopathological changes of lungs from the pigs infected with porcine group C rotaviruses. (A) Concurrent purulent pneumonia is seen in the weaner. (B) Concurrent interstitial pneumonia is noted in the weaner. (C) concurrent purulent and interstitial pneumonia is marked in the grower. Hematoxylin and eosin stain. Bar = 200 um.

(2) 돼지 혈청형 C 로타바이러스 감염증례에 대한 면역조직화학적 연구

혈청형 C 로타바이러스 표준주인 돼지 혈청형 C 로타바이러스 Cowden strain과 국내 분리주를 monolayer 된 MA-104 세포에 접종하여, 24시간 바이러스를 배양한 후, 상법에 준하여 indirect immunofluorescence assay를 수행하였으며 또한 음성 대조군으로는 monolayer 된 MA-104 세포에서 mock-inoculation 한 것을 위에서 기술한 방법에 준하여, IFA를 수행하였다. 그 결과 양성의 형광반응은 오직 표준주와 국내분리주를 접종한 세포의 세포질 내에서 관찰되었으며, mock-inoculated 대조군에서는 관찰되지 않았다. 결과 본 연구진에 의해서 개발된 혈청형 C 로타바이러스 VP6 단백질에 특이적인 단클론 항체는 혈청형 C 로타바이러스를 특이적으로 검출하는 것을 알 수 있다(그림 3-8).

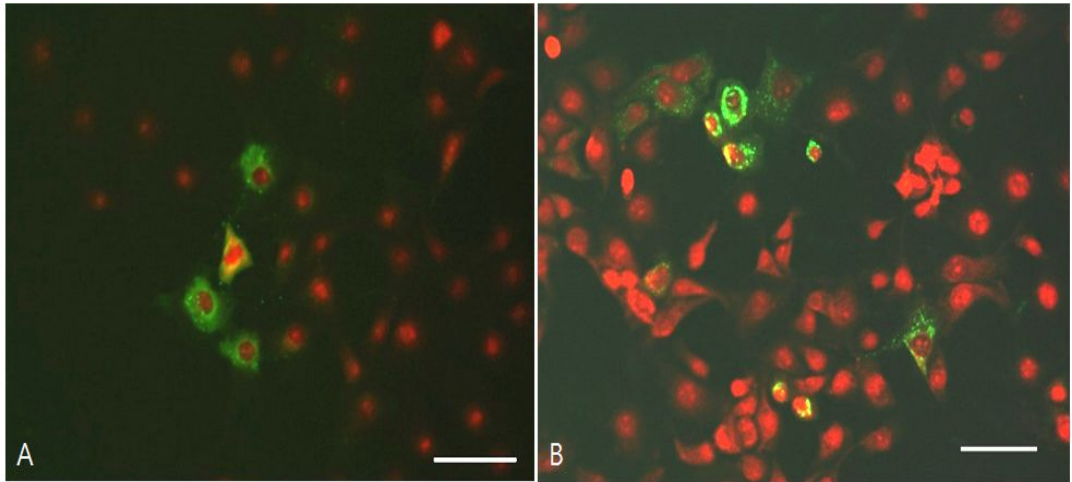


Fig 3-8. Detection of porcine group C rotavirus in the MA-104 cells after inoculation of Korean (A) and reference Cowden (B) strains. Positive reaction is confined in the cytoplasm. Bar = 100 um.

RT-PCR 및 nested PCR 기법에서 혈청형 C 로타바이러스에 양성인 가검물의 소화기 병변의 파라핀 포매 조직을 이용하여 상술한 바와 같이 면역조직화학적 방법을 통해 혈청형 C 로타바이러스의 검출을 시도한 결과 혈청형 C 로타바이러스 감염의 초기 병변으로 추정되는 장 용모에서는 양성의 반응이 용모상피 세포 전반에 걸쳐서 확인되었으며 이러한 소견은 조직학적으로 보았을 때 용모의 길이가 경미하게 위축되었으며, 또한 음와의 증식이 심하지 않아, 바이러스 감염 초기라고 추정된다. 반면에 조직학적으로 용모의 길이가 심하게 위축되고, 일부분 용모의 상피가 탈락되었으며, 이로 인해 음와의 증식이 심한 경우에 있어서는, 용모 상피세포에서의 혈청형 C 로타바이러스에 대한 양성반응을 보이는 세포는 앞서 기술한 바이러스 감염 초기에 관찰되는 병변에 비해 많지 않았다(그림 3-9).

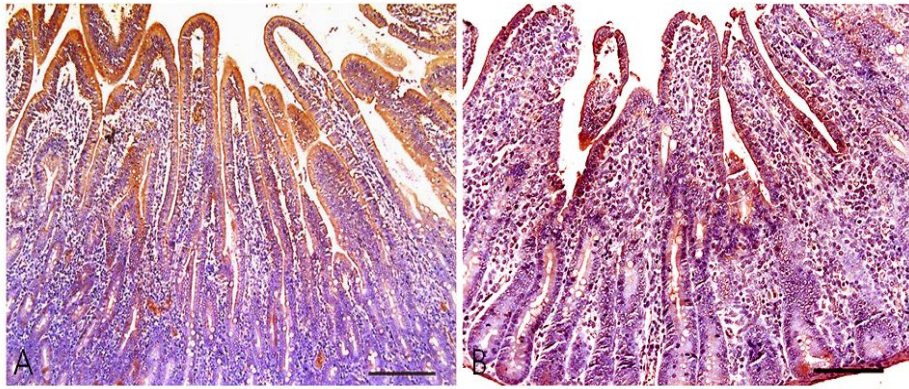


Fig 3-9. Detection of porcine group C rotavirus in the small intestine sampled from the field piglets positive for group C rotavirus by RT-PCR and/or nested PCR. (A) Morphological changes of villi is minimal but positive reaction is strong in the villi epithelial cells. SAB immunohistochemistry with Mayer's hematoxyline counter staining. Bar = 200 um. (B) Morphological changes of villi is severe (severe villi atrophy and fusion, and severe crypt hyperplasia) but relatively positive reaction is milder. SAB immunohistochemistry with Mayer's hematoxyline counter staining. Bars A and B= 200 um.

2. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스에 특이적인 항체 제작

가. 돼지 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이 단클론항체 제작

(1) 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자 증폭

돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 대조군으로 사용한 돼지 C형 로타바이러스 표준주인 Cowden strain 과 설사분변(#06-52-1)에서 모두 1,188bp 크기의 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었다(그림3-10).

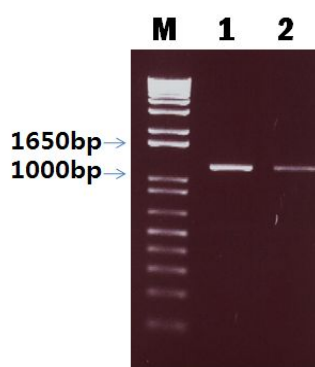


Fig 3-10. Amplification of porcine group C rotavirus VP6 gene by RT-PCR
Lane 1: porcine group C rotavirus Cowden strain, lane 2: porcine group C rotavirus Korean isolate(#06-52-1), lane M: 1Kb ladder marker

(2) 국내 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자의 염기서열 분석

VP6 유전자는 단일의 ORF(Open reading frame)로 구성되어 있으며 Cowden strain과 마찬가지로 1,188개의 염기로 구성되고 395개의 아미노산을 encoding하였다(그림 3-11). 다른 C형 로타바이러스의 VP6 유전자와 염기서열의 상동성을 조사한 결과, 돼지 C형 로타바이러스인 Cowden strain과 06-92-1 strain과는 각각 86% 와 83%, 소 C형 로타바이러스인 Yamagata strain과는 80% 그리고 사람 C형 로타바이러스인 BCN21 strain과 V460 strain과는 83%로 나타났다. 하지만 A형 로타바이러스인 OSU strain의 VP6 유전자와는 46%로 낮게 나타났다.

1 ATGGATGTGC TTTTTTCCAT TGCAAAGACT GTGTCAGATC TCAAAAAGAA AGTTGTAGTT
 61 GGTACAATCT AACTAATGT GGAAGATATT ATTCAACAAA CAAATGAATT AATCAGAACG
 121 CTGAATGGCA ATACCTTTCA TACTGGTGGG ATTGGAACAC AGCCTCAGAA AGAATGGACC
 181 TTTCAATTAC CGCAGTTAGG TACAACCTTG CTTAATTTAG ATGATAATTA CGTTCAAGCA
 241 GCTAGAAGTG TAATTGATTA TTTAGCTTCA TTTATAGAGG CAGTGTGTGA TGATGAGATA
 301 GTTAGGGAAG CATCTAGAAA TGGAATGCAA CCTCAGTCTC CAACTCTTAT AGCACTATCT
 361 TCTTCGAAAT TAAAACTAT TAACTTTAAT AATAGTTCTC AGTCTATTAA GAATTGGAGT
 421 GCTCAATCAA GCGGTGAAAA TCCTGTCTAT GAATATAGAA ACCCAATGGT ATTTGAATAC
 481 AGAAATTCAT ATATTTTGCA ACGTGCTAAT CCACAATTCG GAAATGTTAT GGGATTAAGA
 541 TATTATACTT CTAGCAATAC ATGTCAAATT GCAGCTTTTG ATTCAACATT TGCTGAGAAC
 601 GCGCAAATA ATACACAGCG TTTCATTTAT AATGGAAGAC TAAAAGACC GATTTCCAAT
 661 GTCTTAATGA AAATTGAAGC TGGTGCTCCA AATATTAGTA ATTCAACTGT TTTACCTGAT
 721 CCAACAAACC AGACAACATG GTTGTTTAA CCAAGTCAAG TGATGAATGG GACTTTTACT
 781 ATTGAATTTT ACAATAATGG TCAATTAGTA GATATGGTCA GGAGTATGGG AGTGGTGACT
 841 GTTAGAACAT TTGACTCATA TAGAATGACA ATTGACATGA TTAGACCAGC AGCCATGACT
 901 CAATATGTTT AGAGAATGTT TCCACAAGGT GGTCCATATG CTTATCAAGC TGCATATATG
 961 TTAACATTAA GTATACTGGA TGCTACAACA GAATCCGTTT TATGTGATTC ACATTCCGTT
 1021 GATTATTCGA TTGTTGCAA CGTTAGGAGA GATTCAGCTA TGCCAGCAGG AACTGTTTTT
 1081 CAGCCAGGGT TTCCATGGGA ACAAACCTCTG TCCAACCTACA CAGTTGCACA AGAAGATAAT
 1141 CTAGAAAGAC TTCTATTAGT TGCATCCGTG AAGAGAATGG TGATGTGA

Fig 3-11. Nucleotide sequences of VP6 gene of porcine group C rotavirus Korean isolate(#06-52-1)Initiation(ATG) and termination(TGA) codons are underlined.

(3) Baculovirus 발현 vector로의 크로닝

Plaque법으로 순수 분리한 2개의 유전자 재조합바이러스(rGpC 6-1, rGpC 6-2)로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 확인한 결과, Fig.3-12, lane A와 같이 재조합 바이러스에서 1,188bp 크기의 band가 확인되어 VP6 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 baculovirus에 특이적인 polyhedrin forward primer인 5'-ACCATCTCGCAAATAA-3'와 baculovirus reverse primer인 5'-ACAACGCACAGAATCTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 재조합 바이러스에서 1,760bp 크기의 band가 확인되어 VP6 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 3-12 lane B). 하지만, 재조합바이러스, rGpC 6-1에서 839bp 크기의 band가 나타나 wild type baculovirus에 오염되었음을 확인하였고 이 후의 실험에서는 재조합바이러스, rGpC 6-2만을 사용하였다.

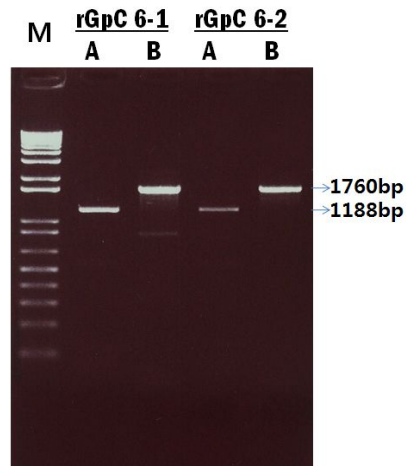


Fig 3-12. Confirmation of porcine groupC rotavirus VP6 recombinant baculovirus by PCR VP6 recombinant baculovirus(rGpC 6-1 and rGpC 6-2) were confirmed by PCR using VP6-specific(lane A) and baculovirus-specific(lane B) primers. Lane M: 1Kb ladder marker

(4) 세포변성효과 및 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)

Recombinant 바이러스에 의한 세포변성효과(Cytopathic effect: CPE)를 확인하기 위해 recombinant 바이러스를 Sf9 세포에 감염시킨 결과,그림 3-12와 같은 CPE를 관찰할 수 있었다. 즉, mock-infected Sf9 세포(A)에서는 어떠한 CPE를 관찰할 수 없었으나 rGpC 6-2 recombinant 바이러스에 의해 감염된 Sf9 세포(B)에서는 감염 후 48시간부터 세포의 수가 증가하지 않고 감염된 세포는 커지는 등의 recombinant 바이러스 감염 시 나타나는 특유의 CPE를 관찰할 수 있었다. 또한 wild type baculovirus 감염시 나타나는 세포질 내 과립형태는 관찰되지 않았다.

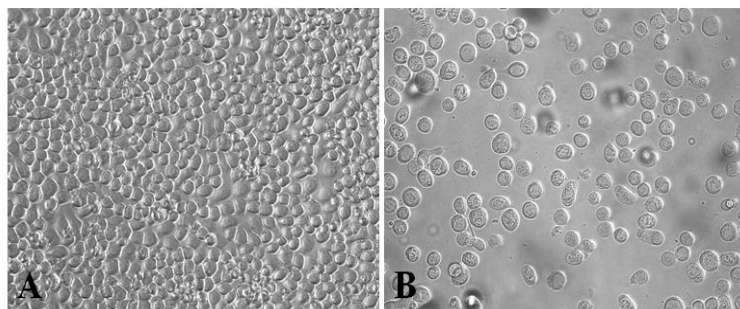


Fig 3-12. Cytopathic effects of Sf9 cells infected with porcine groupC rotavirus VP6 recombinant baculovirus(200X)
VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells(B) were growth inhibited and enlarged compared with mock-infected(A) Sf9 cells.

순수 분리한 recombinant 바이러스가 V64 유전자를 발현하는가를 확인하기 위하여 1차 항체로 His₆ 혹은 V5에 특이적인 토끼 복합항체와 돼지 C형 로타바이러스 항혈청을 사용하여 IFA를 실시한 결과는 그림 3-13과 같다. 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자가 발현된 recombinant 바이러스에 의해 감염된 Sf9 세포를 His₆에 특이적인 복합항체로 반응시켰을 때 형광이 관찰되었다. Mock-infected Sf9 세포 대조군(A)에서는 어떠한 형광도 관찰되지 않았다.

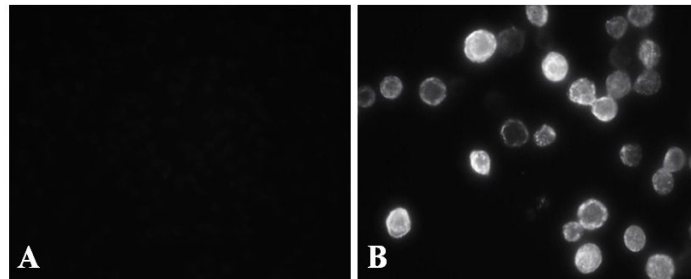


Fig 3-13. Immunofluorescence of Sf9 cells infected with porcine groupC rotavirus VP6 recombinant baculovirus(400X)
Mock-infected(A) and VP6 recombinant baculovirus infected Sf9 cells(B) were immunostained with rabbit His₆-specific antiserum.

(5) 재조합 baculovirus 선발

돼지 C형 VP6 유전자가 크로닝된 baculovirus transfer vector pBlueBac4.5-GpC/VP6은 Bac-N-blue Transfection kit를 사용하여 Bac-N-blue wild type DNA와 함께 제조사의 술식에 따라 Sf9 세포로 cotransfection하였다. 먼저 4 μ l의 재조합 transfer plasmid DNA (1 μ g/ μ l)에 Bac-N-blue wild type DNA 10 μ l, Grace's insect media(w/o FCS) 1ml, Cellfectin reagent 20 μ l를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 반응시켰다. 15분 후, 혈청이 첨가되지 않은 Grace's insect media로 3회 세척한 Sf9 세포에 한 방울씩 떨어뜨린 다음 4시간 동안 반응시키고 10% 혈청이 첨가된 complete Grace's insect media 1ml을 가하고 27 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 배양하였다. 상호유전자 감염용액에서 재조합 baculovirus를 선발하기 위하여 O'Reilly 등의 방법에 따라 플라크 검정을 실시하였다. 먼저 십진 희석한 상호유전자 감염용액을 미리 100mm 세포배양 petri dish에서 배양한 Sf9 세포에 감염시키고 60분간 배양한 다음 배양액을 제거하고 여기에 2.5% agarose 5ml, complete Grace's insect media 5ml 및 15 μ l의 X-gal(50mg/ml)을 가하고 실온에서 굳힌 다음 27 $^{\circ}$ C에서 8일간 배양하였다. 8일간 배양 후, 형성된 plaque 중 푸른색의 plaque만을 선발하여 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염시켜 27 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양하고 일부 세포 및 배양액을 회수하여 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자의 재조합 유무를 확인하였다. VP6 유전자가 재조합된 것으로 확인된 것은 1,500g에서 15분간 원심하여 얻은 상층액을 Sf9 세포에 0.1-1 m.o.i로 감염시켜 고역가의 재조합 baculovirus stock을 만들어 일부는 보관하고 일부는 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다

(6) 재조합 baculovirus 확인

Plaque법으로 순수분리한 재조합 바이러스로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 돼지 C형 로타바이러스 VP6에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 VP6 유전자의 삽입유무를 확인하였다. 또한 baculovirus에 특이적인 polyhedrin forward primer인 5'-TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTTG-3'와 reverse primer인 5'-CAACAACGCACA GAATCTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행하여 wild type baculovirus의 오염여부를 확인하였다. Plaque assay로 순수 분리한 recombinant 바이러스가 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백을 발현하는가를 확인하기 위하여 IFA를 실시하였다. 즉, Sf9 세포가 배양된 96-well plate에 recombinant 바이러스를 접종하여 72시간 배양한 후 80% acetone으로 고정하였다. 1차 항체로 His₆ 혹은 V5에 특이적인 토끼 복합항체(Bethyl Laboratories Inc.)와 돼지 C형 로타바이러스 항혈청을 1:2,000과 1:1,000으로 각각 희석하여 50 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 phosphate buffer saline(PBS)로 5회 세척하였다. 2차 항체로 FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG(Kirkegaard Perry Laboratory) 및 FITC-conjugated goat anti-swine IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:100으로 희석하여 50 μ l씩 넣어 1시간 배양 후 PBS로 5회 세척하고 mounting buffer를 넣어 형광현미경으로 형광발현 유무를 관찰하였다. Recombinant 바이러스에 돼지 C형 로타바이러스 VP6 단백질의 발현 유무 및 성상을 확인 분석하기 위하여 Towbin 등의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다. 즉, recombinant 바이러스를 접종하여 27 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 배양하여 수확한 Sf9 세포와 대조군으로 바이러스를 접종하지 않은 Sf9 세포를 flask로부터 떨어뜨려 원심분리한 뒤 얻은 상층액과 pellet을 Western blot의 샘플로 사용하였다. 각각의 sample을 NuPAGE LDS Sample Buffer(4X)와 NuPAGE LDS Reducing Agent(10X)를 혼합하여 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 끓여 denaturation 시켰다. 처리된 sample을 12% Bis-Tris Mini Gel(Invitrogen)에서 200V로 60분간 전기영동한 후, NuPAGE transfer buffer에 30분간 침지시켰다. 미리 transfer buffer에 침지시켜 놓은 filter paper와 nitrocellulose membrane사이에 gel을 넣어 semi trans-blot를 이용하여 25V로 90분간 transfer하였다. Nitrocellulose membrane을 5% non-fat dry milk/tris buffered saline(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.5: TBS)에서 2시간 blocking 시킨 후 TBS로 강하게 흔들며 3회 세척하였다. 1차 항체로 His₆ 혹은 V5에 특이적인 토끼 항혈청과 돼지 C형 로타바이러스 항혈청을 1:2,000과 1:1,000으로 각각 희석하여 1시간 동안 실온에서 흔들며 반응시켰으며 TBS로 3회 세척하였다. 그리고 2차 항체로 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG(Kirkegaard Perry Laboratory) 또는 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-swine IgG(Kirkegaard Perry Laboratory)를 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시킨 뒤 TBS로 3회 세척하였다. 발색제로 NBT/BCIP stock solution(Boehringer mannheim) 200 μ l을 alkaline phosphatase buffer(0.1M Tris-HCl, pH 9.5, 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂) 10ml에 섞어 사용하여 결과를 확인하였다.

(7) Western blotting

Recombinant 바이러스의 VP6 단백질 발현 유무 및 성상을 확인, 분석하기 위하여 recombinant virus에 감염된 cell lysate와 His₆ 혹은 V5에 특이적인 토끼 항혈청과 돼지 C형 로타바이러스 항혈청을 사용하여 Western blotting을 실시한 결과는 그림3-14와 같다. 돼지 C형 로타바이러스 VP6 유전자가 삽입된 recombinant 바이러스인 rGpC-Cowden과 rGpC 6-2를 감염시킨 Sf9 cell lysate에 V5에 특이적인 항체로 반응시킨 결과, 46 KDa의 크기에서 band가 확인되었으나 대조군으로 사용한 mock-infected Sf9 cell lysate와 A형 로타바이러스 VP6 유전자가 삽입된 recombinant 바이러스인 rGpA-VP6에서는 이에 상응하는 band가 확인되지 않았다.

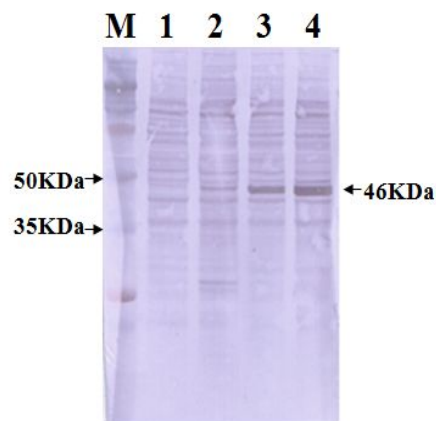


Fig 3-14. Confirmation of expressed porcine group C rotavirus VP6 by Western blotting Sf9 cells were infected with mock(lane 1), rGpA-VP6(lane 2), rGpC-Cowden (lane 3) and rGpC 6-2, respectively. The cell lysates were reacted with V5-specific rabbit antiserum. M: molecular weight marker.

(8) 돼지 C형 로타바이러스 VP6 특이 단클론항체 특성

Baculovirus expression system에서 발현한 VP6 단백을 면역원으로 하여 세포융합을 실시한 결과, 7개의 돼지 C형 로타바이러스 VP6 특이 단클론항체를 생산하였으며 이들의 특성은 표 3-8과 같다. 4개의 단클론항체(2A4, 3F7, 5E4, 9B3)의 isotype은 IgG1, 2의 단클론항체(4B5, 4B9)는 IgG2b, 그리고 7E7은 IgG2a로 확인되었다. 이들 모두 A형 로타바이러스 VP6재조합바이러스인 rGpAVP6와 IFA법으로 반응하지 않았으나 C형 로타바이러스VP6 재조합바이러스인 rGpC 6-2와 돼지 C형 로타바이러스 표준주인 Cowden strain과는 특이적으로 반응하였다(그림 3-15).

Table 3-8. Characterization of group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibodies(MAb)

MAb	Isotype	Protein specificity	Antibody titers ¹	Reaction with ²		
				rGpAVP6	rGpC 6-2	Cowden
2A4	IgG1	VP6	NT	-	+	+
3F7	IgG1	VP6	NT	-	+	+
4B5	IgG2b	VP6	NT	-	+	+
4B9	IgG2b	VP6	NT	-	+	+
5E4	IgG1	VP6	NT	-	+	+
7E7	IgG2a	VP6	>12,800	-	+	+
9B3	IgG1	VP6	NT	-	+	+
25A11 ⁴	IgG2b	VP6	>12,800	+	-	-

¹Antibody titers against group C rotavirus VP6 recombinant virus were determined by IFA using ascite fluids.

²rGpAVP6: group A rotavirus VP6 recombinant virus, rGpC 6-2: group C rotavirus VP6 recombinant virus, Cowden: porcine group C rotavirus

³Not tested

⁴Group A rotavirus VP6-specific MAb

생산된 단클론항체와 A형 로타바이러스와의 반응성 및 다른 돼지 바이러스와의 반응성 조사 결과는 표 3-8, 3-9와 같다. 10개의 단클론항체 모두 본 연구에서 사용한 어떠한 A형 로타바이러스와도 반응을 하지 않는 것으로 확인되었다.

본 연구에서 생산된 7개의 단클론항체는 모두 다른 돼지 바이러스인 전염성위장염 바이러스(Transmissible gastroenteritis virus; TGEV), 돼지유행성설사증바이러스(Porcine epidemic diarrhea virus; PEDV) 그리고 돼지생식기호흡기증후군바이러스(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)와는 IFA법으로 반응하지 않는 것으로 확인되었다(표 3-9).

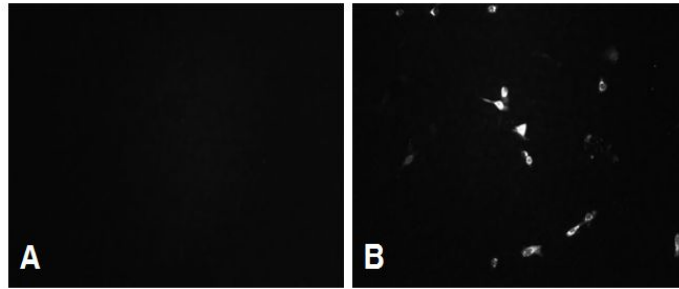


Fig 3-15. Immunofluorescence of porcine group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibody(MAb)(200X)
 MA104 cells were infected with porcine group C rotavirus Cowden strain and reacted with group A rotavirus VP6-specific MAb, 25A11(A) and group C rotavirus VP6-specific MAb,7E7(B), respectively.

Table 3-9. Reactivity patterns of group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibodies (MAb) with group A rotaviruses by IFA test

MAb	Cowden ¹	Human Rotaviruses ²					Animal Rotaviruses ³				
		Wa	DS	M	ST	F45	Gott	OSU	NCDV	B223	AEQ
2A4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3F7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4B5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4B9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5E4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7E7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9B3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25A11 ⁴	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹Cowden: porcine group C rotavirus

²Wa: G1 serotype, DS-1: G2 serotype, M: G3 serotype, ST: G4 serotype, F45: G9 serotype

³Gott: porcine G4 serotype, OSU: porcine G5 serotype, NCDV: bovine G6 serotype, B223: bovine G10 serotype, AEQ: avian G7 serotype

⁴Group A rotavirus VP6-specific MAb

나. 소 혈청형 C 로타바이러스에 대한 특이 단클론항체 제작

(1) Baculovirus 발현 vector로의 크로닝

소 C형 로타바이러스 VP6 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 1,188bp 크기의 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었다(그림 3-16).

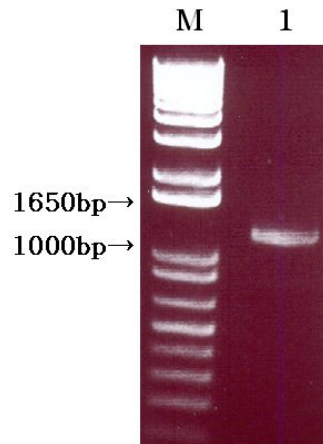


Fig 3-16. Amplification of bovine group C rotavirus VP6 gene by RT-PCR
Lane 1: Bovine group C rotavirus Korean isolate(#04-56-136),
lane M: 1Kb ladder marker

(2) 재조합 baculovirus 선발/확인

Plaques법으로 순수 분리한 3개의 유전자 재조합바이러스(rGpC136-1, rGpC136-2, rGpC136-3)로부터 DNA를 추출하여 RT-PCR에 사용한 소 C형 로타바이러스 VP6 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 확인한 결과, Fig. 3-17, lane A와 같이 3개의 재조합바이러스 모두에서 1,188bp 크기의 band가 확인되어 VP6 유전자가 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 baculovirus에 특이적인 polyhedrin forward primer인 5'-ACCATCTCGCAAATAA-3'와 baculovirus reverse primer인 5'-ACAACGCACAGAAT CTAGC-3'를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 재조합 바이러스에서 1,760bp 크기의 band만 확인되어 이들 모두 wild type baculovirus에 오염되어 있지 않은 것으로 확인되었으며(그림 3-17, lane B) 이 후의 실험에서는 재조합바이러스 rGpC136-1만을 사용하였다.

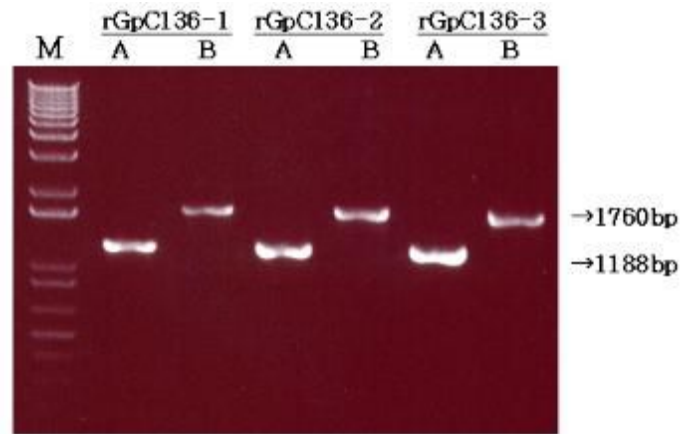


Fig3-17. Confirmation of bovine groupC rotavirus VP6 recombinant baculovirus by PCR VP6 recombinant baculovirus(rGpC136-1, rGpC136-2 and rGpC136-3) were confirmed by PCR using VP6-specific(lane A) and baculovirus-specific(lane B) primers.
Lane M: 1Kb ladder marker

(3) 세포변성효과 및 간접형광항체법(Indirect fluorescence antibody: IFA)
상기 가 (4)와 같은 방법으로 하여 그림 3-18과 같은 결과를 얻었다.

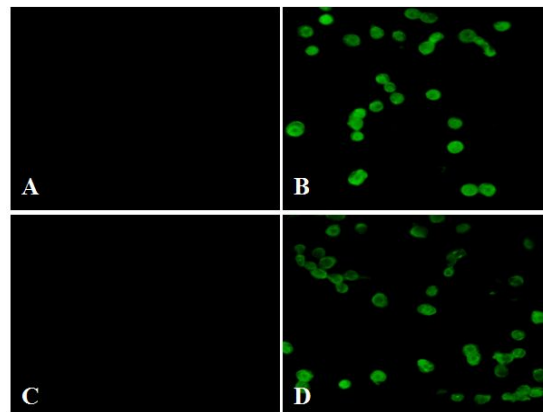


Fig 3-18. Immunofluorescence of Sf9 cells infected with bovine groupC rotavirus VP6 recombinant baculovirus
Mock-infected(A and C) and rGpC136-1 recombinant virus infected Sf9 cells(B and D) were immunostained with rabbit His₆-specific antiserum(A and B) and porcine group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibody, 7E7(C and D), respectively.

(4). Western blotting

Towbin 등의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다. 결과는 그림3-19와 같다. 소 C형 로타바이러스 VP6 유전자가 삽입된 recombinant 바이러스인 rGpC136-1을 감염시킨 Sf9 cell lysate에 His₆와 V5에 특이적인 항체로 반응시킨 결과, 45 KDa의 크기에서 band가 확인되었으나 대조군으로 사용한 mock-infected Sf9 cell lysate에서는 이에 상응하는 band가 확인되지 되지 않았다.

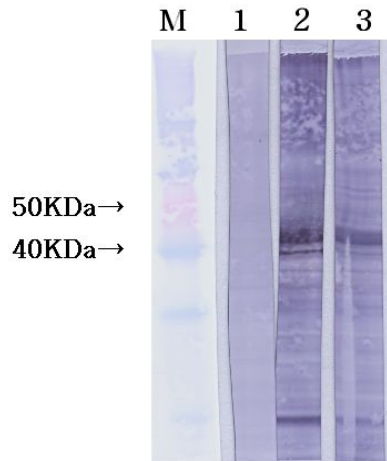


Fig 3-19 Confirmation of expressed bovine group C rotavirus VP6 by Western blotting Sf9 cells were infected with mock(lane 1) and bovine group C rotavirus VP6 recombinant virus, rGpC136-1(lane 2 and 3), respectively. The cell lysates were reacted with V5(lane 2) and His₆-specific(lane 3) rabbit antiserum, respectively. M: Molecular weight marker.

(5) 단클론항체 생산 및 특성

Baculovirus expression system에서 발현한 VP6 단백을 면역원으로 하여 세포융합을 실시한 결과, 5개의 소 C형 로타바이러스 VP6 특이 단클론항체를 생산하였으며 이들의 특성은 Table 3-10과 같다. 3개의 단클론항체(5F6, 6A3, 6C9)의 isotype은 IgG1, 2개의 단클론항체(6A12, 6B3)는 IgG2b로 확인되었다. 생산된 단클론항체 모두 A형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpAVP6와 IFA법으로 반응하지 않았으나 본 연구에서 작성한 C형 소 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC136-1와 rGpC 6-2와 국내분리 돼지 C형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC6-2와는 특이적으로 반응하였다(표 3-10).

Table 3-10. Characterization of bovine group C rotavirus VP6-specific monoclonal antibodies(MAb)

MAb	Isotype	Western blotting	Reaction with ¹			
			rGpC136-1	rGpAVP6	rGpC6-2	rGpC Cowden
5F6	G1	?	+	-	+	+
6A3	G1	?	+	-	+	+
6A12	G2b	?	+	-	+	+
6B3	G2b	?	+	-	+	+
6C9	G1	?	+	-	+	+
25A11 ²	G2b	+	-	+	-	-

¹Reaction with rotavirus VP6 recombinant virus was determined by IFA.

rGpC136-1: Bovine groupC rotavirus VP6 recombinant virus

rGpAVP6: Group A rotavirus VP6 recombinant virus(Wa strain)

rGpC 6-2: Group C rotavirus VP6 recombinant virus(Korean isolate)

rGpC Cowden: Porcine group C rotavirus recombinant virus(Cowden strain)

²Group A rotavirus VP6-specific MAb

다. 돼지,소 C형 로타바이러스 특이 복합항체 생산

- (1) 두 마리의 토끼로부터 총 50ml 정도의 항혈청을 생산하였으며 VP6에 대한 반응성을 IFA법으로 확인한 결과, A형 로타바이러스와는 반응하지 않았으며 6,400 배의 희석에서 C형 로타바이러스 VP6에 대하여 양성으로 나타났다.

3. 국내 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One/step Rapid Kit
제조 및 산업화

가. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 One/step Rapid Kit 제작

(1) 최적의 capture 및 detector 선정을 위한 dot blotting 시험

최적의 capture 와 detector는 표 3-11과 같이 각각 7E7, 5E4로 선정 돼지,소의 로타바이러스 항원 공통 검출용으로 사용하였다.

capture	detector: 2A4						detector : 3F7					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
2A4	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3F7	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+	+	+
5E4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
9B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7E7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5F6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

capture	detector: 5E4						detector : 9B3					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3F7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5E4	2+	2+	2+	2+	+/-	-	+	+	+	+	+	-
9B3	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+	+	+
4B5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7E7	3+	4+	4+	2+	-	-	+	+	+	+	+	-
5F6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

capture	detector: 4B5						detector : 4B9					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3F7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5E4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
9B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B5	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7E7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5F6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

capture	detector: 7E7						detector : 5F6					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3F7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5E4	2+	3+	2+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	-
9B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7E7	2+	2+	3+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-
5F6	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+/-	+/-
6A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

capture	detector: 6A3						detector : 6C9					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3F7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5E4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
9B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7E7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5F6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A3	+	+	+	2+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
6C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+
6A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

capture	detector: 6A12						detector : 6B3					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3F7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5E4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
9B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7E7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5F6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6C9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6A12	+	+	+	2+	+	+	+	+	+	+	+	+
6B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	+	+

Table 3-11. 돼지 및 소의 혈청형 C로타바이러스에 대한 단클론 항체의 capture와 detector 선정시험

2A4,3F7,5E4,9B3,4B5,4B9,7E7 : 돼지 혈청형 C로타바이러스에 대한 단클론 항체

5F6,6A3,6C9,6A12,6B3 : 소 혈청형 C로타바이러스에 대한 단클론 항체

1: Cowden (porcine group C rotavirus)

2: rGpC136-1 : recombinant porcine group C rotavirus

3: rGpC6-2 : recombinant bovine group C rotavirus

4: PCR positive stool (전남대)

5: PCR negative stool (전남대)

6: Stool extraction buffer(20mM Tris /0.5%casein pH 8.0)

(2) 코팅 항체, 골드 콘쥬게이트의 농도 및 검사시간 설정

검사선 부위에 mouse 항 - Porcine C-rota 단클론항체(7E7)를 스트립 1개중에1.6 μg 농도로 멤브레인에 코팅하고 대조선 부위에 산양 항 - 마우스면역글로블린-지를 스트립 1 개중에 각각 2.0 μg 농도로 코팅한 후 mouse 항 - porcine C-rota 단클론항체(5E4) 골드 콘쥬게이트의 농도를 각각 OD₅₂₀ 2.0, 3.0, 4.0로 달리하고 마우스 면역글로블린-지 골드 콘쥬게이트의 농도를 각각 OD₅₂₀ 0.3 ,0.4, 0.5로 달리하여 조립한 후 재조합 porcine C-rota VP6 항원으로 검사하여 OD₅₂₀ 3.0,마우스 면역글로블린-지 골드 콘쥬게이트 농도는 OD₅₂₀ 0.4로 조립한 디바이스에서, 골드 콘쥬게이트의 농도 판독시간을 15분으로 하였을때 양,음성의 기준이 가장 우수하여 15분을 검사시간으로, 이 농도를 코팅 농도 및 골드 콘쥬게이트 농도로 결정하였다(그림 3-20,2122).

Fig 3-20. 검사선,대조선 농도시험

검사선 코팅액 항체 농도 : mouse 항 - Porcine C-rotavirus 단클론 Mab(7E7)1.6 μ g

대조선 코팅액 항체 농도 : 산양 항 - 마우스면역글로블린-지 2.0 μ g

VP6 정제 (ug/ml)	OD ₅₂₀ 3.0/0.3		OD ₅₂₀ 3.0/0.4		OD ₅₂₀ 3.0/0.5	
	T	C	T	C	T	C
0.1	-		-		-	
0.5	-		-		±	
1	±		+		+	
5	++		++		++	

Fig 3-21. 골드컨쥬게이트 농도시험

mouse 항 - bovine C-rotavirus Mab(6B3/E4)gold/ 마우스 면역글로블린-지 gold

VP6 정제 (ug/ml)	OD ₅₂₀ 4.0/0.3		OD ₅₂₀ 4.0/0.4		OD ₅₂₀ 4.0/0.5	
	T	C	T	C	T	C
0.1	-		-		-	
0.5	±		±		+	
1	++		++		++	
5	++		++		++	

Fig 3-22. 반응시간 결정시험

시간 Vp6(ug/ml)	10분	15분	20분	25분	30분
	T C	T C	T C	T C	T C
1x10 ⁴					
5x10 ⁴					
1x10 ⁵					
1x10 ⁷					

(3) 자체 성능평가지험











표 3-12와 같이 미생물등에 의해 간섭을 받는지를 평가하기 위하여, 각종Virus를 각각 VP6 재조합항원첨가 양성 및 음성의 분변 검체에 1×10^5 TCID/ml로 첨가하여 시험한 결과 그림 3-23 과 같이 각각의 미생물들과 pairing된 단클론 항체들은 서로 교차 반응을 일으키지 않으므로 높은 특이도를 보였다.

Table. 3-12 첨가 미생물

첨가미생물	첨가농도 (TCID/ml)	Vp6 재조합항원 (ug/ml)
Canine corona	1×10^5	0.1, 2
PRRS	1×10^5	
PED	1×10^5	
Bovine rota GroupA	1×10^5	
Bovine diahhrea	1×10^5	
Canine Distemper	1×10^5	
Bovine corona	1×10^5	
Bovine brucella	1×10^5	
Rotavirus	1×10^5	
Canine parvo	1×10^5	
Canine parainfluenza	1×10^5	
Canine adeno virus	1×10^5	

Fig 3-23 첨가미생물 시험 결과

첨가미생물	첨가농도 (TCID/ml)	Vp6 재조합 항원(0.1ug/ml)
Canine corona	1×10^5	T C
PRRS	1×10^5	
PED	1×10^5	
Bovine rota GroupA	1×10^5	
Bovine diahhrea	1×10^5	
Canine Distemper	1×10^5	
Bovine corona	1×10^5	
Bovine brucella	1×10^5	
Rotavirus	1×10^5	
Canine parvo	1×10^5	
Canine parainfluenza	1×10^5	
Canine adeno virus	1×10^5	

첨가미생물	첨가농도 (TCID/ml)	Vp6 재조합 항원(2.0ug/ml)
Canine corona	1×10^5	T C
PRRS	1×10^5	
PED	1×10^5	
Bovine rota GroupA	1×10^5	
Bovine diahrea	1×10^5	
Canine Distemper	1×10^5	
Bovine corona	1×10^5	
Bovine brucella	1×10^5	
Rotavirus	1×10^5	
Canine parvo	1×10^5	
Canine parainfluenza	1×10^5	
Canine adeno virus	1×10^5	

나. 돼지,소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA Kit 제작

(1) Capture의 선발 및 적정농도

2협동과제에서 제조된 단클론 항체의 capture와 detector의 pairing 예비시험에 서 captrue는 7E7, detector는 5E4로 선별 하고 direct one-step ELISA 법으로 고안 하였다. ELISA법에 capture antibody로 사용할 단클론 항체의 적정농도를 결정하기 위하여 checkerboard 적정법을 수행한 결과, 그림 3-24과 같이 0.1 μ g /well 로 결정 하였다.

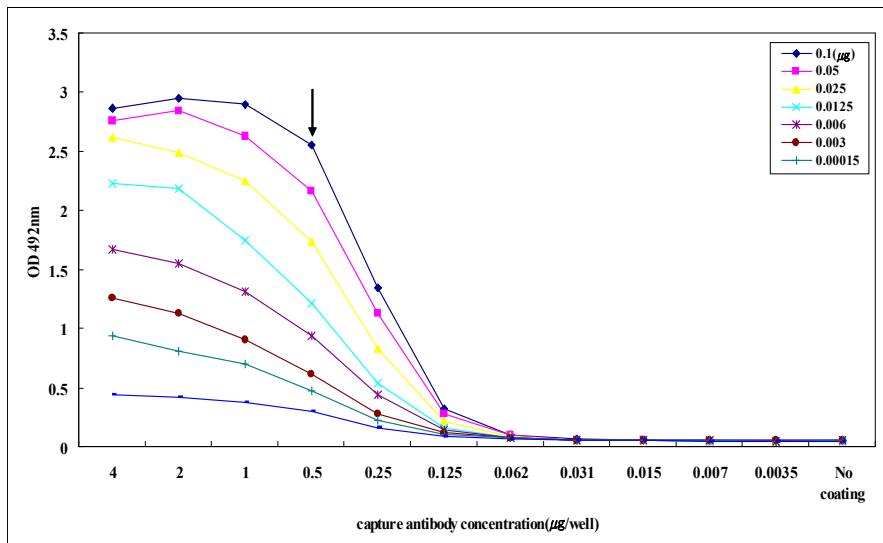


Fig 3-24. Determination of monoclonal capture antibody concentration by checkerboard titration

또한 detector antibody로 사용할 복합항체의 적정농도를 결정하기 위하여 checkerboard 적정법을 수행한 결과, 그림 3-25와 같이 역시 0.5 μ g/well로 나타났 다.

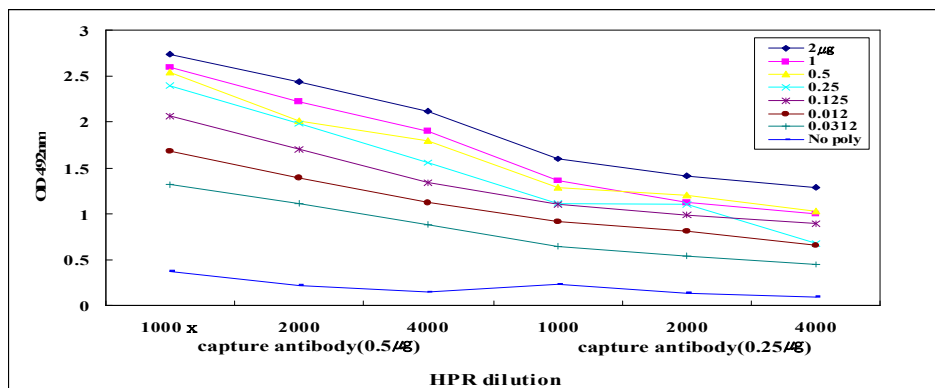


Fig 3-25. Determination of conjugate concentration by checkerboard titration

(2) Blocking agent의 결정

ELISA법에 적합한 blocking 완충용액을 선별하기 위하여 3% non-fat dried milk (NFDM), 5% NFDM, 3% bovine serum albumin (BSA), 5% gelatin, 3% NFDM + 3% BSA, 그리고 0.1% Tween 20의 blocking 완충용액을 가지고 ELISA를 수행한 결과 표준항원을 첨가하지 않은 sample에서 optical density (OD) 값이 3% BSA의 경우 0.3 정도로 나타나고 다른 blocking 완충용액에서는 0.15와 0.2 사이에서 나타났다. 또한 detector antibody를 첨가하지 않은 sample에서도 blocking 완충용액 간에는 OD 값에 차이점은 나타나지 않았다. 본 실험에서는 가장 OD 값이 낮게 나타난 것으로 확인된 5% skim milk를 blocking 완충용액으로 결정하였다. 이상의 실험으로 본 연구에서 표준화한 ELISA법의 조건은 표 3-13과 같다.

Table 3-13. 표준화한 ELISA법의 조건

	Dilution or concentration	Dilution buffer	Incubation time
Capture antibody (7E7)	0.1 μ g/well	0.05M Carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6	27 $^{\circ}$ C, 18hr
Conjugate (HRP conjugated 5E4)	0.5 μ g/well	3% Skim milk	37 $^{\circ}$ C, 1hr
Color development (OPD)	30mg/50ml	0.05M Phosphate-citrate, pH 5.0	R · T 10min
Stop solution	1.0M H ₂ SO ₄		
Reading	492 nm		
Washing buffer	0.01% EDTA in PBS with 0.1% Tween 20		
Blocking buffer	5 Skim milk		

(3) 항원항체, 효소 반응시간결정시험

시험제목	항원 항체 반응 시간 설정																																																																																
사용검체	음성표준시료, 양성표준시료(제1협동과제제공)																																																																																
시험목적	항원 항체 반응 시간에 따른 변화를 검사하여, 정확한 판정을 위한 검사시간을 결정한다.																																																																																
시험방법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 일정량의 7E7 Mab가 흡착되어 있는 96웰 플레이트에 분변추출액을 이용하여 추출한 100μl의 음성표준시료와 양성표준시료를 각각 넣은 후 25μl의 효소표지 항체 용액을 첨가한다. 2. 각 시간별로(15분,30분,45분,60분,75분,90분,105분,120분)37℃에 반응시킨다. 3. 반응이 끝난 후 세척액으로 5회 씻어낸 후 기질용액100μl를 가하여 상온에서 10분간 반응시킨다. 4. 반응 정지액 100μl를 가하여 발색을 정지시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정한다. 																																																																																
시험결과	<table border="1"> <thead> <tr> <th>반응시간</th> <th>검체</th> <th colspan="2">raw data</th> <th>ave</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">15분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.015</td> <td>0.019</td> <td>0.017</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>0.318</td> <td>0.367</td> <td>0.343</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">30분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.020</td> <td>0.011</td> <td>0.016</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>0.529</td> <td>0.512</td> <td>0.521</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">45분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.015</td> <td>0.018</td> <td>0.017</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>0.745</td> <td>0.799</td> <td>0.772</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">60분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.016</td> <td>0.011</td> <td>0.014</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>0.954</td> <td>1.027</td> <td>0.991</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">75분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.014</td> <td>0.018</td> <td>0.016</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>1.487</td> <td>1.326</td> <td>1.407</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">90분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.012</td> <td>0.014</td> <td>0.013</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>1.663</td> <td>1.698</td> <td>1.681</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">105분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.018</td> <td>0.023</td> <td>0.021</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>1.705</td> <td>1.726</td> <td>1.716</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">120분</td> <td>음성표준시료</td> <td>0.017</td> <td>0.015</td> <td>0.016</td> </tr> <tr> <td>양성표준시료</td> <td>1.824</td> <td>1.765</td> <td>1.795</td> </tr> </tbody> </table>				반응시간	검체	raw data		ave	15분	음성표준시료	0.015	0.019	0.017	양성표준시료	0.318	0.367	0.343	30분	음성표준시료	0.020	0.011	0.016	양성표준시료	0.529	0.512	0.521	45분	음성표준시료	0.015	0.018	0.017	양성표준시료	0.745	0.799	0.772	60분	음성표준시료	0.016	0.011	0.014	양성표준시료	0.954	1.027	0.991	75분	음성표준시료	0.014	0.018	0.016	양성표준시료	1.487	1.326	1.407	90분	음성표준시료	0.012	0.014	0.013	양성표준시료	1.663	1.698	1.681	105분	음성표준시료	0.018	0.023	0.021	양성표준시료	1.705	1.726	1.716	120분	음성표준시료	0.017	0.015	0.016	양성표준시료	1.824	1.765	1.795
반응시간	검체	raw data		ave																																																																													
15분	음성표준시료	0.015	0.019	0.017																																																																													
	양성표준시료	0.318	0.367	0.343																																																																													
30분	음성표준시료	0.020	0.011	0.016																																																																													
	양성표준시료	0.529	0.512	0.521																																																																													
45분	음성표준시료	0.015	0.018	0.017																																																																													
	양성표준시료	0.745	0.799	0.772																																																																													
60분	음성표준시료	0.016	0.011	0.014																																																																													
	양성표준시료	0.954	1.027	0.991																																																																													
75분	음성표준시료	0.014	0.018	0.016																																																																													
	양성표준시료	1.487	1.326	1.407																																																																													
90분	음성표준시료	0.012	0.014	0.013																																																																													
	양성표준시료	1.663	1.698	1.681																																																																													
105분	음성표준시료	0.018	0.023	0.021																																																																													
	양성표준시료	1.705	1.726	1.716																																																																													
120분	음성표준시료	0.017	0.015	0.016																																																																													
	양성표준시료	1.824	1.765	1.795																																																																													

시험결과	<div style="text-align: center;"> </div>
결론	<p>위의 표와 그림에서 보는 바와 같이 90분 이후에서는 안정된 음성, 양성 흡광도를 나타냈으며 양성과 음성간의 차이도 현저하였다. 따라서 위의 결과를 토대로 본 시약의 항원 항체, 효소 반응 시간을 90분으로 결정하였다.</p>

(4)판정기준값설정

시험제목	판정기준값 설정							
사용검체	음성검체(30례)							
시험목적	판정 기준치를 설정하기 위하여 제1협동과제로 부터 공급받은 돼지 소 C-rota 음성으로 판정된 음성검체30례를 기준으로 판정기준값을 설정							
시험방법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 일정량의 7E7 Mab가 흡착되어 있는 96웰 플레이트에 분변추출액을 이용하여 추출한 100μl의 음성시료를 넣은 후 25μl의 효소 표지 항체 용액을 첨가한다. 2. 반응이 끝난 후 세척액으로 5회 씻어낸 후 기질용액 100μl를 가하여 상온에서 10분간 반응시킨다. 3. 반응 정지액 100μl를 가하여 발색을 정지시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정한다. 							
시험결과	음성 검체의 평균 흡광도와 표준편차							
	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">음성(30례)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">평균(Mean)</td> <td style="text-align: center;">0.094</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">표준편차(SD)</td> <td style="text-align: center;">0.004939</td> </tr> </table>		음성(30례)	평균(Mean)	0.094	표준편차(SD)	0.004939	
	음성(30례)							
평균(Mean)	0.094							
표준편차(SD)	0.004939							

(5)항체-과산화효소 접합체(Conjugate)의 양설정

시험제목	항원-과산화효소 접합체(Conjugate)의 양 설정				
사용검체	음성표준시료, 양성표준시료(제1협동과제제공)				
시험목적	항체-과산화효소 접합체(Conjugate)의 양을 결정한다.				
시험방법	<ol style="list-style-type: none"> 1. 일정량의7E7 Mab가 흡착되어 있는 96웰 플레이트에 분변추출액을 이용하여 추출한 100μl의 음성시료를 넣은 후 25μl의 효소표지 항체 용액을 첨가한다. 2. 반응이 끝난 후 세척액으로 5회 씻어낸 후 기질용액 100μl를 가하여 상온에서 10분간 반응시킨다. 3. 반응 정지액 100μl를 가하여 발색을 정지시킨 후 492nm에서 흡광도를 측정한다. 				
시험결과	μ g/ml	검체	raw data		ave
	0.25	음성표준시료	0.019	0.021	0.020
		양성표준시료	0.579	0.605	0.592
	0.5	음성표준시료	0.011	0.011	0.011
		양성표준시료	0.954	0.962	0.958
	1	음성표준시료	0.016	0.013	0.015
		양성표준시료	1.391	1.403	1.397
	2	음성표준시료	0.012	0.019	0.016
		양성표준시료	2.117	2.067	2.092
	4	음성표준시료	0.017	0.018	0.018
		양성표준시료	2.216	2.384	2.300
	8	음성표준시료	0.015	0.013	0.014
		양성표준시료	2.410	2.551	2.481

<p>시험결과</p>	<table border="1"> <caption>항원-과산화효소 접합체 (Conjugate)의 양</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (µg/ml)</th> <th>Negative Sample (음성시료)</th> <th>Positive Sample (양성시료)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.25</td> <td>0.000</td> <td>~0.6</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>0.000</td> <td>~1.0</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>0.000</td> <td>~1.4</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.000</td> <td>~2.1</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.000</td> <td>~2.3</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>0.000</td> <td>~2.5</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (µg/ml)	Negative Sample (음성시료)	Positive Sample (양성시료)	0.25	0.000	~0.6	0.5	0.000	~1.0	1	0.000	~1.4	2	0.000	~2.1	4	0.000	~2.3	8	0.000	~2.5
Concentration (µg/ml)	Negative Sample (음성시료)	Positive Sample (양성시료)																				
0.25	0.000	~0.6																				
0.5	0.000	~1.0																				
1	0.000	~1.4																				
2	0.000	~2.1																				
4	0.000	~2.3																				
8	0.000	~2.5																				
<p>결론</p>	<p>위의 표와 그림에서 보는 바와 같이 2 ~ 4 µg/ml의 항원-과산화효소 접합체 (conjugate) 용량에서 음성 및 양성 검체에 대하여 최적의 결과를 얻을 수 있었으므로 이 용량 범위를 항체-과산화효소 접합체의 최적 농도로 결정하였다.</p>																					

다. 돼지, 소혈청형 C로타바이러스 항원 검출용 Rapid, ELISA Kit의 민감도 특이도 시험
 1협동기관에서 분리하여 RT-PCR 및 Nested PCR 어느곳에서도 양성인 검체 19검체
 둘다 음성인 86 검체로 본 연구에서 표 3-14와 표 3-15에서와 같이 확립된 Rapid, ELISA
 kit의 민감도는 각각 57.8%, 68.4%이며 특이도는 89.5%, 94.1% 이었다. 민감도향상을 위
 해 복합 항체와 indirect법으로 시험 하였으나 특이도 면에서 현저히 낮아지는 결과, 진단
 효율에서는 개선 되지 않는 결과를 얻었다(data not shown).

Table 3-14 . Rapid ,ELISA 민감도 특이도 결과


















		Rapid		
		+	-	계
PCR, Nested- PCR	+	11	8	19
	-	9	77	86
계		20	85	105

		ELISA		
		+	-	계
PCR Nested- PCR	+	13	6	19
	-	4	82	86
계		17	88	105

Table 3-15. Raw data of Rapid and ELISA kit

Rapid 양성 : test /control ++ Rapid 음성 : test /control -/+
 ELISA 양성 >0.22 음성 <0.22

시료 번호	PCR	Nested PCR	Rapid T C	ELISA	시료 번호	PCR	Nested PCR	Rapid T C	ELISA
1	-	+		0.331	47	-	-		0.082
2	+	+		0.876	48	-	-		0.097
3	+	+		1.332	49	-	-		0.102
4	+	+		0.436	50	-	-		0.113
5	+	+		0.298	51	-	-		0.116
6	+	+		0.543	52	-	-		0.087
7	+	+		0.192	53	-	-		0.099
8	-	+		0.338	54	-	-		0.101
9	-	+		0.187	55	-	-		0.114
10	-	+		0.099	56	-	-		0.105
11	+	+		1.765	57	-	-		0.172
12	+	+		1.862	58	-	-		0.142
13	+	+		0.201	59	-	-		0.130
14	-	+		0.165	60	-	-		0.091
15	-	+		0.360	61	-	-		0.086
16	-	+		0.143	62	-	-		0.083
17	-	+		1.012	63	-	-		0.090
18	-	+		0.438	64	-	-		0.099
19	-	+		0.623	65	-	-		0.121
20	-	-		0.112	66	-	-		0.118
21	-	-		0.092	67	-	-		0.070
22	-	-		0.087	68	-	-		0.093
23	-	-		0.124	69	-	-		0.232
24	-	-		0.154	70	-	-		0.071
25	-	-		0.136	71	-	-		0.176
26	-	-		0.144	72	-	-		0.154
27	-	-		0.165	73	-	-		0.334
28	-	-		0.117	74	-	-		0.089
29	-	-		0.102	75	-	-		0.091
30	-	-		0.104	76	-	-		0.098
31	-	-		0.089	77	-	-		0.088
32	-	-		0.096	78	-	-		0.867
33	-	-		0.088	79	-	-		0.067
34	-	-		0.063	80	-	-		0.107
35	-	-		0.107	81	-	-		0.133
36	-	-		0.133	82	-	-		0.125
37	-	-		0.105	83	-	-		0.109
38	-	-		0.112	84	-	-		0.104
39	-	-		0.104	85	-	-		0.065
40	-	-		0.105	86	-	-		0.138
41	-	-		0.129	87	-	-		0.110
42	-	-		0.221	88	-	-		0.129
43	-	-		0.117	89	-	-		0.133
44	-	-		0.160	90	-	-		0.107

45	-	-		0.116	91	-	-		0.097
46	-	-		0.143	92	-	-		0.099
93	-	-		0.186	101	-	-		0.152
94	-	-		0.113	102	-	-		0.139
95	-	-		0.132	103	-	-		0.144
96	-	-		0.139	104	-	-		0.142
97	-	-		0.182	105	-	-		0.097
98	-	-		0.099					
99	-	-		0.134					
100	-	-		0.112					

라. Rapid 및 ELISA Kit의 시제품 견본사양 및 specification

Rapid Kit

(1) 디바이스

- ① 흡수지 4±0.4mm X20±2mm
- ② 샘플패드 4±0.4mm X20±2mm
- ③ 단 클론 항-C 로타 금콜로이드 건조 흡착패드 4±0.4mm X6±0.6mm
- ④ 산양 항 - 마우스면역글로불린(GoatAnti-Mouse IgG) ,
항 -C로타 바이러스 단 클론항체 흡착 니트로셀룰루스 멤브레인
..... 4±0.4mm X25±2.5mm
- ⑤ 폴리에스테르필름 4±0.4mm X60±6.0mm

- ⑥ 스트립 지지 플라스틱 상자 케이스 35±3.5mm X85±8.5mm

(2) 드로퍼

(3) 면봉

- (4) 검체채집회석액 ----- 1병 (0.5ml±0.05ml/병)

주성분 : 인산염 생리식염 완충액 (1리터당)

Nacl(Extra Pure) -----	4g
KCl(Extra Pure) -----	0.1g
Na ₂ HPO ₄ (Extra Pure)-----	0.7g
KH ₂ PO ₄ (Extra Pure) -----	0.1g
Casein(Extra pure) -----	10g
증류수(1차증류수) -----	적량

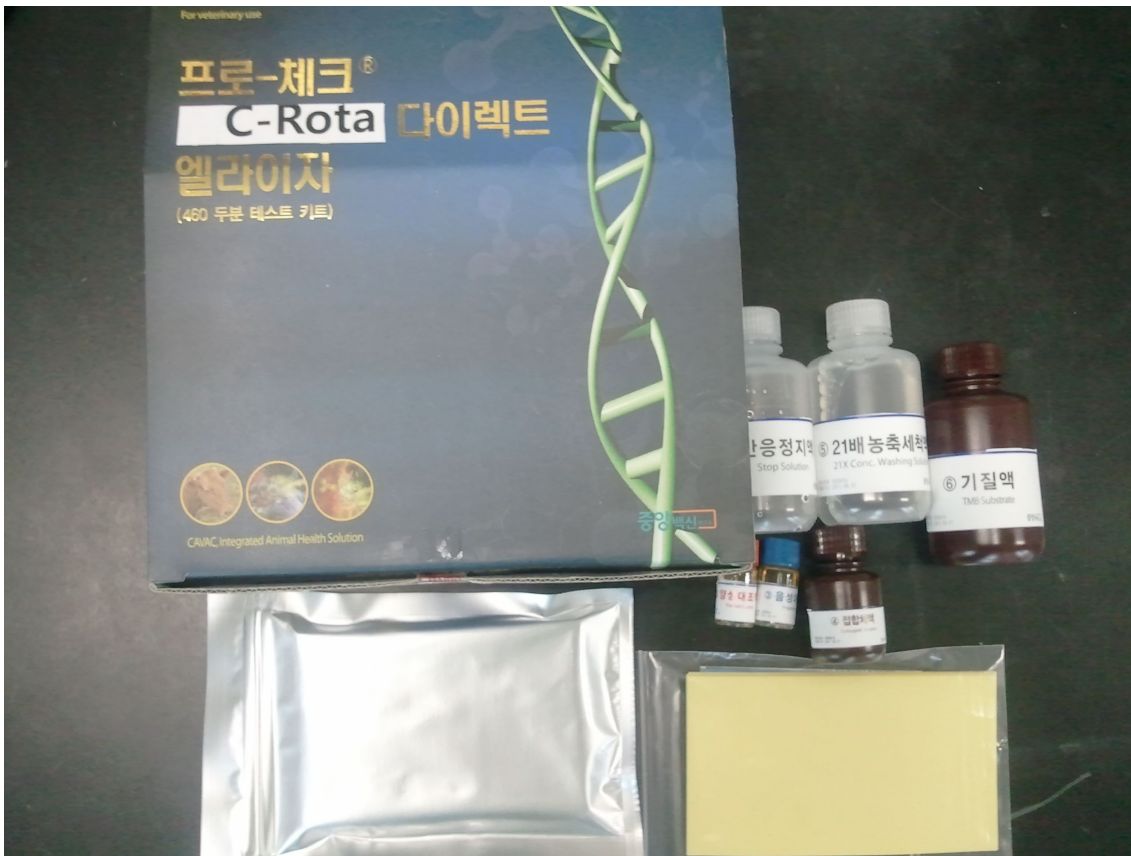
Fig 3-20 돼지/소 혈청형 C-rota항원 검출용 Rapid kit 시제품



Elisa Kit

- (1) Anti-C rota mAb 흡착플레이트 : 96 wells (8wells x 12)/플레이트
1 well 중
주 성분 : 7E7 mab ----- 1ug
- (2) 양성대조액 : 1병 (0.5 ml/병)
1병 중
주성분 : 불활화 C-rota 면역 돼지/소혈청 -----0.5 ml
보존제 : Proclin 300 -----0.05 v/v %
- (3) 음성대조액 : 1병 (0.5 ml/병)
1병 중
주성분 : 비동화 NCS/NPS -----0.5 ml
보존제 : Proclin 300 -----0.05 v/v %
- (4)접합체액 : 1병 (15ml/병)
1병 중
주성분 : anti-Crota mAb 과산화효소접합액 ----- 15ml
보존제 : Proclin 300 -----0.05 v/v %
- (5)농축세척액 (21배) (50ml/병)
주성분 : 200mM 인산염완충액(pH 7.0) ----- 50 ml
- (6)기질액 : 1 병 (15 ml/병)
1병 중
주성분 : Tetramethylbenzidine(TMB) -----15 ml
- (7)반응정지액 : 1병 (15 ml/병)
1병 중
주성분: 1.6 N 황산 ----- 15 ml
- (8) 밀봉테이프 : 2장

Fig 3-21 돼지/소 혈청형 C-rota항원 검출용 ELISA kit 시제품



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 연도	연구개발의 목표	연구개발의 달성도	관련분야의 기술발전기여도
1차년도 2008	<ul style="list-style-type: none"> - 야외 돼지 설사분변의 채취 및 RT-PCR, nested PCR, PAGE법에 의한 혈청형 C 로타바이러스 검출 - 국내 발생주에 대한 단클론 및 다클론 항체 생산 - 돼지 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One step/Rapid 진단키트 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - 혈청형 C 로타바이러스의 역학조사를 수행한 결과, 국내에서 혈청형 C 로타바이러스가 다발하고 있음을 규명하였음. 또한 혈청형 C 로타바이러스는 단독감염보다는 기타 바이러스성 장염의 원인체들과 혼합감염되어 발생하는 것을 밝혀냈음. - 7개의 돼지 C형 로타바이러스 VP6 특이 단클론항체를 생산하였으며 이들의 특성은 모두 A형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpAVP6와 IFA법으로 반응하지 않았으나 C형 로타바이러스VP6 재조합바이러스인 rGpC6-2와 돼지 C형 로타바이러스 표준주인 Cowden strain과는 특이적으로 반응하였다 - 제조된 항체를 이용 Rapid 및 ELISA kit를 제작하였다. 	<ul style="list-style-type: none"> - 향후 돼지 혈청형 C 로타바이러스 방역대책 확립에 활용할 수 있으며, 백신개발 및 치료제 개발에도 활용할 수 있을 것임. 또한 본 연구를 통해 확립된 돼지 바이러스성 장염 진단용 RT-PCR 및 nested PCR은 국립수의과학검역원을 비롯하여 각 일선 방역기관에서 돼지 바이러스성 장염 진단법으로 활용할 수 있을 것임. - 연구결과는 향후 검역원이나 기타 병성감정기관에서 IFA 검사법이나 진단 kit에 활용할 수 있을 것임. - Kit를 이용 야외 농장이나 혹은 병성감정 기관에서 대량의 검체를 진단하는데 유용하게 사용될 수 있음
2차년도 2009	<ul style="list-style-type: none"> - 야외 소 설사분변의 채취 및 RT-PCR, nested PCR, PAGE법에 의한 혈청형 C 로타바이러스 검출 - 국내 발생주에 대한 단클론 항체 제작 - 소 혈청형 C 로타바이러스 항원 검출용 ELISA 및 One step/Rapid 진단키트 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내에서 소 혈청형 C 로타바이러스가 산발적으로 발생하고 있음을 규명하였으며 송아지 설사에서 혈청형 C 로타바이러스는 단독감염보다는 기타 바이러스성 장염의 원인체들과 혼합감염되어 발생하는 것을 밝혀냈으며 국내 소 혈청형 C 로타바이러스의 계통학적 사를 수행한 결과, 일부는 소 혈청형 C 로타바이러스형 C 로타바이러스와 재조합된 바이러스도 검출되었음. - 5개의 소 C형 C형 소 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC136-1와 rGpC6-2와 국내분리 돼지 C형 로타바이러스 VP6 재조합바이러스인 rGpC6-2와는 특이적으로 반응하였다. - 제조된 항체를 이용 Rapid 및 ELISA kit를 제작하였다. 	<ul style="list-style-type: none"> - 향후 소 혈청형 C 로타바이러스 방역대책 확립에 활용할 수 있으며, 백신개발 및 치료제 개발에도 활용할 수 있을 것임. 또한 본 연구를 통해 확립된 소 바이러스성 장염 진단용 RT-PCR 및 nested PCR은 국립수의과학검역원을 비롯하여 각 일선 방역기관에서 돼지 바이러스성 장염 진단법으로 활용할 수 있을 것임. - 연구결과는 향후 검역원이나 기타 병성감정기관에서 IFA 검사법이나 진단 kit에 활용할 수 있을 것임. - Kit를 이용 야외 농장이나 혹은 병성감정 기관에서 대량의 검체를 진단하는데 유용하게 사용될 수 있음

<p>3차년도 2010</p>	<p>- 혈청형 C 로타바이러스 야외 감염증례에 대한 병리학적 및 면역조직화학적 연구</p> <p>-야외 설사분변을 이용한 개발된 진단키트의 검증, 시제품 제작, 대량생산 시스템 구축 및 산업화</p>	<p>- 혈청형 C 로타바이러스를 특단법위대소화과, 이적으로 검출할 수 있는 기법 확립을 위하여, 분리된 바이러스에 대한 IFA 및 야외 증례의 면역조직화학적 기법을 수행한 결과 성공적으로 혈청형 C 로타바이러스를 검출할 수 있었다.</p> <p>- 혈청형 C로타바이러스를 소 돼지 공용으로 검사하는 Rapid,ELISA kit를 제작 하였으며 대량생산 시스템을 구축 하였다.</p>	<p>- 본 연구를 통해 혈청형 C 로타바이러스는 야외에서 단독 감염보다는 혼합감염의 양상을 보이고 있고, 특히 증가할수록 호흡기 감염에 병행하는 것으로 보아, 이 및 치료제 선택에 있어, 이 것이며 또한 돼지 혈청형 C 로타바이러스 특이 단클론 항체는 향후 수의과학원 및 일선 방역기관에서 혈청형 C 로타바이러스를 검출하기 위한 면역조직화학적 검사 방법에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대됨.</p> <p>- 본 연구를 토대로 향후 진단 Kit는 혈청형 A 와 혈청형 C 로타바이러스의 감별 진단에 유용하게 활용 하여야 할 것 임</p>
----------------------	--	--	---

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

1. 실용화산업화 계획

본 연구에서 활용한 단클론 항체를 향후 산업화 시켜 야외 증례에서 면역조직화학적기법으로 활용할 수 있도록 실용화 시킬 계획이며, Rapid의 경우 1000test/lot ,Elisa의 경우 100 plate/lot 각각 3lot 생산하여 제조편차 및 안정성 시험결과 특별한 문제가 발생하지 않았으며, 이를 토대로 야외 현장의 시험 개체수를 늘려 신빙성 data를 확보하여 국립수의과학 검역원에 허가서를 제출할 계획이며, 효율성을 고려 혈청형 C와 혈청형 A를 감별 진단 하는 kit를 개발 제품허가를 신청 할 예정임.

2. 교육지도홍보 등 기술확산 계획 등

돼지 및 소 혈청형 C 로타바이러스의 중요성에 대해 방역기관, 대학교, 일선 수의사 및 양축업자를 대상으로 교육·지도·홍보 등을 통해 기술을 확산 시키려고 함.

3. 특허,품종,논문 등 지식재산권 확보계획 등

본 연구를 통해 얻어진 결과가 SCI 논문에 2편 게재되었음(Genetically diverse group C rotaviruses cause sporadic infection in Korean calves. Journal of Veterinary Medical Science, 2011, 73(4), 479-482; Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in south Korea. Veterinary Microbiology, 2009, 138, 217-224).

C 형 로타바이러스 검출 kit는 국내외적으로 최초이므로 국내외 kit에 대한 물질특허를 출원할 계획임.

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획

본 연구를 통해 돼지 혈청형 C 로타바이러스가 국내에서 다발하여 막대한 경제적 피해가 발생하고 있음이 규명되어, 향후 이에 대한 백신 및 치료제 개발에 관한 추가연구가 필요할 것으로 사료되며 혈청형 C와 혈청형 A를 감별 진단 하는 kit를 개발 제품허가를 신청 할 예정임.

5. 제품 상업화시 접근 가능한 시장에 대한 분석

가. 시장분석 (단위 : 억원)

구 분		사 업 화 년 도		
		2012년도	2013년도	2014년도
투자 계획	소요인원(명)	2	1	1
	제조시설	1.5	1	5
	시험시설	.5	1	1
생산계획(test)		-	50,000	150,000
판매계획 (억 원)	내수	-	5	15
	수출	-	-	5
	계	-	7	20

나. 개발의 주안점

(1). 편리성

(2). 시료 적용(양, 융통성)

(3). 판정시간

(4). 성능

high sensitivity (<1% false negative)

high specificity (<1% false positive)

good long-term stability (≥ 12 months)

(5). 제품의 균질성

coefficients of variance ($\leq 5\%$)

다. 파급효과와 전망

산업동물의 질병진단시약

- 돈콜레라
- 우결핵
- 구제역
- 블루셀라

해외시장의 개척

- 중국
- 동남아
- 일본, 유럽, 북미

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음 -

제 7 장 참고문헌

- Adah, M.I., Wade, A., Oseto, M., Kuzuya, M., Taniguchi, K., 2002. Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequence analysis of their genes encoding VP4, VP6, and VP7 proteins. *J. Med. Virology*. 66,269-275.
- Alam, M.M., Kobayashi, N., Ishino, M., Ahmed, M.S., Ahmed, M.U., Paul, S.K., Muzumdar, B.K., Hussain, Z., Wang, Y.H., Naik, T.N., 2007. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch.Virol*.152,199-208.
- Allen, S. R., Jafri, M., Donnelly, B., McNeal, M., Witte, D., Bezerra, J., Ward, R. and Tiao, G. M. Effect of rotavirus strain on the murine model of biliary atresia. *J. Viro.*, 2007, 81, 1671-1679.
- Azevedo, M. S., Yuan, L., Jeong, K. I., gonzalez, A., Nguyen T. V., Pouly, S., gochnauer, M., Zhang, W., Azevedo, A. Saif, L. J. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa Human rotavirus. *J. Virol*. 2005, 79, 5428-5436.
- Alfieri, A. F., Alfieri, A. A., Barreiros, M. A. B., Leite, J. P. G. and Richtzenhain, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996 - 1999. *Vet Microbiol*. 2004, 99, 167-173.
- Bányai, K., Jiang, B., Bogdán, A., Horváth, B., Jakab, F., Meleg, E., Martella, V., Magyari, L., Meleg, B., Szucs, G., 2006. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J. Clin. Virol*. 37, 317-322.
- Barman, P., Ghosh, S., Das, S., Varghese, V., Chaudhuri, S., Sarkar, S., Krishnan, T., Bhattacharya, S.K., Chakrabarti, A., Kobayashi, N., Naik, T.N., 2004. Sequencing and sequence analysis of VP7 and NSP5 genes reveal emergence of a new genotype of bovine group B rotavirus in India. *J. Clin. Microbiol*. 42, 2816 - 1818.
- Blackhall, J., Bellinzoni, R., Mattion, N., Estes, M. K., LaTorre, J. L. and Magnusson, G. A bovine rotavirus serotype 1: serological characterization of the virus and nucleotide sequence determination of the structural glycoprotein VP7 gene. *Virology* 1992, 189, 833-837, 1992.
- Blutt, s. E., Matson, D. O., Crawford, S. E., Staat, M. A., Azimi, P., Bennett, B. L., Piedra, P. A. and Conner, M. E. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *Plos. Med*. 2007, 4, 660-668.

- Bohl, E.H., Saif, L.J., Theil, K.W.A., Agnes, G., Cross, R.F., 1982. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 15, 312 - 319.
- Brandt, C.D., Kim, H.W., Rodriguez, W.J., Arrobio, J.O., Jeffries, B.C., Parrott, R.H., 1982. Rotavirus gastroenteritis and weather. *J. Clin. Microbiol.* 16, 478 - 482.
- Bridger, J.C., 1994. Non-group A rotaviruses. In: Kapikian, A.Z. (ed) *Viral infection of the gastrointestinal tract.* Marcel Dekker, New York, pp 369 - 407.
- Bridger, J.C., Brown, J.F., Arnold, P.S., Pocock, D.H., McCrae, M.A., 1983. Antigenic variation in porcine and bovine rotaviruses, p. 48 - 55. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Neonatal Diarrhea*, Saskatoon, Canada.
- Brown, C. C., Baker, D. C. and Barker, I. K. Alimentary system in *PATHOLOGY OF DOMESTIC ANIMALS*. p.1-296, 5th ed., vol. 2. Edinburgh: ELSEVIER, 2007.
- Caul, E.O., Ashley, C.R., Darville, J.M., Bridger, J.C., 1990. Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak. *J. Med. Virol.* 30, 201-205.
- Chang, K.O., Nielsen, P.R., Ward, L.A., Saif, L.J., 1999. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J. Virol.* 73, 9284-9293.
- Chang, K.O., Parwani, A.V., Smith, D.R., Saif, L.J., 1997. Detection of group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2107 - 2110.
- Chang, K.O., Parawani, A. V., Saif, L.J., 1996. The characterization of VP7(G type) and VP4(P type) genes of bovine group A rotavirus from field samples using RT-PCR and RFLP analysis. *Arch. Virol.* 141, 1727 - 1739.
- Chasey, D., Davies, P., 1984. Atypical rotaviruses in pigs and cattle. *Vet. Rec.* 114, 16 - 17.
- Chinsangaram, J., Akita, G.Y., Osburn, B.I., 1994. Detection of bovine group B rotaviruses in feces by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 302 - 307.
- Cho, K.O., Hasoksuz, M., Nielsen, P.R., Chang, K.O., Lathrop, S., Saif, L.J., 2001. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. *Arch. Virol.* 146, 2401 - 2419.
- Ciarlet, M. and Estes, M. K. Rotaviruses: basic biology, epidemiology and methodologies in *Encyclopedia of environmental microbiology*. p.2753-2773. New York: John Wiley and

- Sons, 2002.
- Collins, P.J., Martella, M., O'Shea, H., 2008. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2973–2979.
- Cook N, Bridger J, Kendall K, Iturriza Gomara M, El-Attar L, Gray J. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect.* 48, 289–302.
- Elschner, M., Prudlo, J., Hotzel, H., Otto, P., Sachse, K., 2002. Nested reverse transcriptase–polymerase chain reaction for the detection of group A rotaviruses. *J. Vet. Med. B* 49, 77–81.
- Esona, M.D., Humphrey, C.D., Dennehy, P.H., Jiang, B., 2008. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. *J. Clin. Virol.* 42, 221–224.
- Estes, M.K., Kapikian, A.Z., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Straus, S.E., Howley, P.M., Martin, M.A., Roizman, B. (Eds.). *Fields Virology*, Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1917–1974.
- Fielding, P.A., Lambden, P.R., Caul, E.O., Clarke, I.N., 1994. Molecular characterization of the outer capsid spike protein (VP4) gene from human group C rotavirus. *Virology* 204, 442–446.
- Gabby, Y.B., Borges, A.A., Oliveria, D.S., Linhares, A.C., Mascarenhas, J.D., Barardi, C.R., Simões, C.M., Wang, Y., Glass, R.I., Jiang, B., 2008. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. *J. Med. Virol.* 80, 1666–1674.
- Gelberg, H. B. *Alimentary System in PATHOLOGIC BASIS of VETERINARY DISEASE.* p.301–391, 4th ed. St. Louis: MOSBY ELSEVIER, 2007.
- Ghosh, S., Varghese, V., Samajdar, S., Bhattacharya, S.K., Kobayashi, N., Naik, T.N., 2007. Evidence for independent segregation of the VP6- and NSP4- encoding genes in porcine group A rotavirus G6P[13] strains. *Arch. Virology.* 152, 423–429.
- Givens, M.D., Heath, A.M., Carson, R.L., Brock, K.V., Edens, M.S., Wenzel, J.G., Stringfellow, D.A., 2003. Analytical sensitivity of assays used for detection of bovine viral diarrhoea virus in semen samples from the Southeastern United States. *Vet. Microbiol.* 96, 145 - 155.
- Gouvea, V., Allen, J.R., Glass, R.I., Fang, Z., Bremont, M., Cohen, J., McCrae, M.A., Saif, L.J., Sinarachatanant, P., Caul, E.O., 1991. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 519–523.

- Green, K., Sears, Y., Taniguchi, F., Midthun, K., Hoshion, K., Gorziglia, Y., Nishikawa, M., Urasawa, K., Kapikian, S., Chanock, Z. and Flores, M. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J. Virol.* 1988, 62, 1819-1823.
- Grice, A.S, Lambden, P.R., Caul, E.O., Clarke, I.N., 1994. Sequence conservation of the major outer capsid glycoprotein of human group C rotaviruses. *J. Med. Virol.* 44, 166-171.
- Griffin, D.D., Nakagomi, T., Hoshino, Y., Nakagomi, O., Kirkwood, C.D., Parashar, U.D., Glass, R.I., Gentsch, J.R., 2002. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6],G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology* 294, 256-269.
- Hoshino, Y. and Kapikian, A. Z. Rotavirus serotype: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Health Popul. Nutr.* 2000, 18, 5-14.
- Hung, T., Chen, G., Wang, C., Yao, H., Fang, Z., Chao, T., Chou, Z., Ye, W., Chang, X., Den, S., Liang, X., Chang, W., 1984. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet* 1, 1139 - 1142.
- Iizuka, S., Tabara, K., Kawamukai, A., Itogawa, H., Hoshina, K., 2006. An outbreak of group C rotavirus infection in an elementary school in Shimane prefecture, Japan, February 2006. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59, 350-351.
- Iturriza-Gomara, M., Clarke, I., Desselberger, U., Brown, D., Thomas, D., Gray, J., 2004. Seroepidemiology of group C rotavirus infection in England and Wales. *Eur. J. Epidemiol.* 19, 589-595.
- Jain, V., Das, B. K., Bhan, M. K., Glass, R. I. and Gentsch, J. R. Great diversity of group A rotavirus strains and high prevalence of mixed rotavirus infections in India. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3524-3529.
- Janke, B.H., Nelson, J.K., Benfield, D., Nelson, E.A., 1990. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 308-311.
- Jeong, C., Park, S.I., Park, S.H., Kim, H.H., Park, S.J., Jeong, J.H., Choy, H.E., Saif, L.J., Kim, S.K., Kang, M.I., Hyun, B.H., Cho, K.O., 2007. Genetic diversity of porcine sapoviruses. *J. Vet. Med.* 122, 246-257.

- Jiang, B., Saif, L.J., Gentsch, J.R., Glass, R.I., 2000. Completion of the four large gene sequences of porcine group C Cowden rotavirus. *Virus Genes* 20, 193-194.
- Jiang, B., Gentsch, J.R., Tsunemitsu, H., Saif, L.J., Glass, R.I., 1999a. Sequence analysis of the gene encoding VP4 of a bovine group C rotavirus: molecular evidence for a new P genotype. *Virus Genes* 19, 85-88.
- Jiang, X., Espul, C., Zhong, W.M., Cuello, H., Matson, D.O., 1999b. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch. Virol.* 144, 2377-2387.
- Jiang, B., Dennehy, P.H., Spangenberg, S., Gentsch, J.R., Glass R.I., 1995. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. *J. Infect. Dis.* 172, 45-50.
- Jung, K., Kang, B. K., Lee, C. S. and Song, D.S. Impact of porcine group A rotavirus co-infection on porcine epidemic diarrhea virus pathogenicity in piglets. *Res. Vet. Sci.* 2008, in press.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y. and Chanock, R. M. Rotaviruses in *Fields Virology*. p.1787-1833, 4th ed., vol. 2. Philadelphia: Lipincott William & Wilikins, 2001.
- Katsuhiko, F., Toshiya, S., Kyoichi, I. and Mitsu, S. Molecular characterization of novel P[14],G8 bovine group A rotavirus, Sun9, isolated in Japan. *Virus Res.* 2004, 105, 101-106.
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Peerakome, S., Chan-it, W., Yagyu, F., Okitsu, S. and Ushijima, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007, 361, 243-252.
- Kim, L., Chang, K.O., Sestak, K., Parwani, A., Saif, L.J., 2000. Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest* 12, 385-388.
- Kim, Y., Chang, K.O., Straw, B., Saif, L.J., 1999. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreak in feeder pigs. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1484-1488.
- Krishnan, T., Sen, A., Choudhury, J.S., Das, S., Naik, T.N., Bhattacharya, S.K., 1999. Emergence of adult diarrhea rotavirus in Calcutta, India. *Lancet* 353, 380 - 381.
- Kubota, S., Sasaki, O., Amimoto, K., Okada, N., Kitazima, T., Yasuhara, H., 1999. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of

- the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 827-830.
- Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nishijima, M., Ogura, H., 2007. Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005. *J. Med. Virol.* 79, 1219-1228.
- Kuzuya, M., Hamano, M., Nishijima, M., Fujii, R., Ogura, H., Tanaka, M., Oda, A., Kusaka, S., Naitou, M., 2005. An outbreak of acute gastroenteritis caused by human group C rotavirus in a welfare institution in Okayama Prefecture. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 255-257.
- Kuzuya, M., Fujii, R., Hamano, M., Nakamura, J., Yamada, M., Nii, S., Mori, T., 1996. Molecular analysis of outer capsid glycoprotein (VP7) genes from two isolates of human group C rotavirus with different genome electropherotypes. *J. Clin. Microbiol.* 34, 3185-3189.
- Leite, J. P. G., Alfieri, A. A., Woods, P. A., Glass, R. I. and Gentsch, J. R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. *Arch. Virol.* 1996, 141, 2365-2374.
- Liprandi, F., Gerder, M., Bastidas, Z., Lopez, J. A., Pujol, F. H., Ludert, J. E., Joelsson, D. B. and Ciarlet, M. A novel type of VP4 carried by a porcine rotavirus strain. *Virology* 2003, 315, 373-380.
- Martella, V., Bányai, K., Lorusso, E., Bellacicco, A.L., Decaro, N., Camero, M., Bozzo, G., Moschidou, P., Arista, S., Pezzotti, G., Lavazza, A., Buonavoglia, C., 2007a. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet. Microbiol.* 123, 26-33.
- Martella, V., Bányai, K., Lorusso, E., Decaro, N., Bellacicco, A., Desario, C., Corrente, M., Greco, G., Moschidou, P., Tempesta, M., Arista, S., Ciarlet, M., Lavazza, A., Buonavoglia, C., 2007b. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. *Virology* 367, 358-366.
- Martella, V., Bányai, K., Ciarlet, M., Iturriza Go'mara, M., Lorusso, E., de Grazia, S., Arista, S., Decaro, N., Elia, G., Cavalli, A., Corrente, M., Lavazza, A., Baselga, R., Buonavoglia, C., 2006. Relationships among porcine and human P[6] rotaviruses: evidence that the different human P[6] lineages have originated from multiple interspecies transmission events. *Virology* 344, 509-519.
- Matthijnssens, J., Rahman, M., Martella, V., Xuelei, Y., de Vos, S., de Leener, K., Ciarlet,

- M., Buonavoglia, C., Van Ranst, M., 2006. Full genomic analysis of human rotavirus strain B4106 and lapine rotavirus strain 30/96 provides evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 80, 3801-3810.
- Mawatari, T., Taneichi, A., Kawagoe, T., Hosokawa, M., Togashi, K., Tsunemitsu, H., 2004. Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 887 - 890.
- McNeal, M. M., Sestak, K., Choi, A. H., Basu, M., Cole, M. J., Aye, P. P., Bohm, R. P. and Ward, R. L. Development of a rotavirus-shedding model in rhesus macaques, using a homologous wild-type rotavirus of a new P genotype. *J. Virol.* 2005, 79, 944-954.
- Mebus, C.A., Rhodes, M.B., Underdahl, N.R., 1978. Neonatal calf diarrhea caused by a virus that induces villous epithelial cell syncytia. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1223-1228.
- Medici, M.C., Abelli, L.A., Martinelli, M., Martella, V., Dettori, G., Chezzi, C., 2009. Molecular characterization of group C rotaviruses detected in children in Italy. *J. Clin. Virol.* 44, 62-65.
- Morin, M., Magar, R., Robinson, Y., 1990. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. *Can. J. Vet. Res.* 54, 385-389.
- Nagashima, S., Kobayashi, N., Ishino, M., Alam, M.M., Ahmed, M.U., Paul, S.K., Ganesh, B., Chawla-Sarkar, M., Krishnan, T., Naik, T.N., Wang, Y.H., 2008. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus Rotavirus. *J. Med. Virol.* 80, 2023-2033.
- Nishimura, S., Ushijima, H., Shiraishi, H., Kanazawa, C., Abe, T., Kaneko, K. and Fukuyama. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev.* 1993, 15, 457-459.
- Nuovo, G. J., Owor, G., Andrew, T. and Magro, C. Histological distribution of fatal rotaviral pneumonitis: an immunohistochemical and RT in situ PCR analysis. *Diagn. Mol. Pathol.* 2002, 11, 140-145.
- Otto, P., Schulze, P., Herbst, W., 1999. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. *Arch. Virol.* 144, 2467 - 2473.
- Park, S.J., Jeong, C., Yoon, S.S., Choy, H.E., Saif, L.J., Park, S.H., Kim, Y.J., Jeong, J.H., Park, S.I., Kim, H.H., Lee, B.J., Cho, H.S., Kim, S.K., Kang, M.I., Cho, K.O., 2006. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult

- cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3178 - 3188.
- Park, S. J., Kim, G. Y., Choy, H. E., Hong, Y. J., Saif, L. J., Jeong, J. H., Park, S. I., Kim, H. H., Kim, S. K., Shin, S. S., Kang, M. I. and Cho, K. O. Dual enteric and respiratory tropism of winter dysentery bovine coronavirus in calves. *Arch. Virol.* 2007, 152, 1885-1900.
- Park, S. H., Saif, L. J., Jeong, C., Lim, G. K., Park, S. I., Kim, H. H., Park, S. J. Kim, Y. J. Jeong, H. H., Kang, M. I. and Cho, K. O. Molecular characterization of novel G5 bovine rotavirus strains. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44, 4101-4112.
- Palombo, E., Clark, R., Bishop, R.F., 2000. Characterization of a "European-like" serotype G8 human rotavirus isolated in Australia. *J. Med. Virol.* 60, 56-62.
- Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K., Chiwakul, M., Urasawa, T., Wahasugi, F., Jayavasud, C., Urasawa S., 1996. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2010-2015.
- Qian, Y., Jiang, B., Saif, J.J., Kang, S.Y., Ishimaru, Y., Yamashita, Y., Oseto, M., Green, K.Y., 1991. Sequence conservation of gene 8 between human and porcine group C rotaviruses and its relationship to the VP7 gene of group A rotaviruses. *Virology* 182, 562-569.
- Ra'cz, M. L., Kroeff, S. S., Munford, V., Caruzo, T. A. R., Durigon, E. L., Hayashi, Y., Gouvea, V. and Palombo, E. A. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 2443-2446.
- Rahman, M., Banik, S., Faruque, A. S., Taniguchi, K., Sack, D. A., Van Ranst, M., Azim, T., 2005. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4460-4465.
- Rahman, M., Matthijnsens, J., Nahar, S., Podder, G., Sack, D. A., Azim, T. and Van Ranst, M. Characterization of a novel P[25],G11 human group a rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 208-212.
- Rodger, S.M., Bishop, R.F., Holmes, I.H. 1982. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J. Clin. Microbiol.* 16, 724-726.
- Saif, L.J., Jiang, B., 1994. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185, 339-371.
- Saif, L.J., Bohl, E.H., Theil, K.W., Cross, R.F., House, J.A., 1980. Rotavirus-like,

- calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12, 105-111.
- Sanchez-Fauquier, A., Roman, E., Colomina, J., Wilhemi, I., Glass, R.I., Jiang, B., 2003. First detection of group C rotavirus in children with acute diarrhea in Spain. *Arch Virol.* 148, 399-404.
- Sanekata, T., Kuwamot, Y., Akamatsu, S., Sakon, N., Oseto, M., Taniguchi, K., Nakata, S., Estes, M.K., 1996. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 34, 759 - 761.
- Santos, N. and Hoshino, Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005, 15, 29-56.
- Sigolo de SanJuan, C., Bellinzoni, R.C., Mattion, N., LaTorre, J., Scodeller, E.A., 1986. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pigherds. *Res. Vet. Sci.* 41, 270-272.
- Singleton, R. J., Holman, R. C., Yorita, K. L., Holve, S., Paisano, E. L., Steiner, C. A., Glass, R. I. and Cheek, J. E. Diarrhea-associated hospitalizations and outpatient visits among American Indian and Alaska native children younger than five years of age, 2000-2004. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007, 26, 1006-1013.
- Smiley, J.R., Hoet, A.E., Traven, M., Tsunemitsu, H., Saif, L.J., 2003. Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3089 - 3099.
- Snodgrass, D.R., Herring, A.J., Campbell, I., Inglis, J.M., Hargreaves, F.D., 1984. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglet, lamb and man. *J. Gen. Virol.* 65, 909 - 914.
- Steyer, A., Poljsak-Prijatelj, M., Bufon, T., Sedmak, M., Vidmar, L., Mijovski, J.Z., Marin, J., 2006. First detection of group C rotavirus in patients with gastroenteritis in Slovenia. *J. Med. Virol.* 78, 1250-1255.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Taniguchi, K., Urasawa, T., Pongsuwanna, Y., Choontanom, M., Jayavas, C. and Urasawa, S. Molecular and antigenic analyses of serotypes 8 and 10 of bovine rotaviruses in Thailand. *J. Gen. Virol.* 1991, 72, 2929-2937.

- Terrett, L.A., Saif, L.J., Theil, K.W., Kohler, E.M., 1987. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* 25, 268-272.
- Timenetsky, M. D. C., Santos, N. and Gouvea, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in Sao Paulo, Brazil, from 1986 to 1992. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 2622-2624.
- Torres-Median, A., 1987. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. *Lab. Anim. Sci.* 37, 167-71.
- Tsunemitsu, H., Jiang, B., Saif, L.J., 1996. Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch. Virol.* 141, 705-713.
- Tsunemitsu, H., Jiang, B., Saif, L.J., 1992a. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2129 - 2134.
- Tsunemitsu, H., Jiang, B., Yamashita, Y., Oseto, M., Ushijima, H., Saif, L.J., 1992b. Evidence of serologic diversity within group C rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3009 - 3012.
- Tsunemitsu, H., Saif, L.J., Jiang, B.M., Shimizu, M., Hiro, M., Yamaguchi, H., Ishiyama, T., Hirai, T., 1991. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J. Clin. Microbiol.* 29, 2609-2613.
- Unicomb, L. E., Podder, G., Gentsch, J. R., Woods, P. A., Hasan, K. Z., Faruque, A. S. G., Albert, M. J. and Glass, R. I. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 1885-1891.
- Will, L.A., Paul, P.S., Proescholdt, T.A., Aktar, S.N., Flaming, K.P., Janke, B.H., Sacks, J., Lyoo, Y.S., Hill, H., Hoffman, L.J., Wu, L.L., 1994. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 416-422.
- Winiarczyk, S., Paul, P. S., Mummidi, S., Panek, R. and Gradzki, Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and in the United States using RT-PCR. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2002, 49, 373-378.
- Xu, L., Harbour, D., McCrae, M.A., 1990. The application of polymerase chain reaction to

the detection of rotaviruses in faeces. *J. Virol. Methods.* 27, 29-38.

Yang, H., Makeyev, E.V., Kang, Z., Ji, S., Bamford, D.H., van Dijk, A.A., 2004. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A, B, C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. *Virus Res.* 106, 15-26.

Yuan, L., Stevenson, G. W. and Saif, L. J. Rotavirus and Reovirus in DISEASE OF SWINE, p.435-454, 9th ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.