GOVP1200952384

T00205

발 간 등 록 번 호
11-1541002-000070-01

국제공동연구과제 완결 연구보고서

수포성질병 동시진단기법개발 및 현장적용연구

Study on the development and application to the field of multi-diagnostic methods for vesicular diseases

국립수의과학검역원
몽골중앙수의검사소

농림수산식품부
Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries

제 출 문

국립수의과학검역원장 귀하

본 보고서를 "수포성질병 동시진단기법개발 및 현장적용연구" 과제의 완결보고서로 제출합니다.

2009년 4월 29일

국립수의과학검역원	공동연구책임자	해외전염병과	고 영 준
	공동연구참여자	해외전염병과	이 향 심
	공동연구참여자	해외전염병과	허 은 정
	공동연구참여자	해외전염병과	이 광 녕
	공동연구참여자	해외전염병과	김 수 미
	공동연구참여자	해외전염병과	박 종 현
	공동연구참여자	수의생명공학과	정 혜 영
	공동연구참여자	수입위험평가과	권 창 희
	공동연구참여자	질병진단센터	주 이 석
몽골중앙수의연구소	협동연구책임자	소 장	R. Sodnomdarjaa

여 백

요 약 문

Ⅰ. 제 목

수포성질병 동시진단기법개발 및 현장적용연구
(Study on the development and application to the field of multi-diagnostic methods for vesicular diseases)

Ⅱ. 연구목적 및 중요성

1. 제1세부과제: 구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자동시진단법 개발

우리나라는 1933년도에 충청북도와 전라남북도를 제외한 전국에서 구제역이 발생하여 1934년에 종식된 후 66년 만인 2000년에는 15건, 2002년에 16건의 구제역 O형이 발생하여 3,006억원의 직접적인 피해를 입었으며 2002년 구제역 발생으로 인하여 1,434억원의 직접손실을 초래하였다. 두 차례에 걸쳐서 국내에 발생한 구제역은 모두 혈청형 O형이었기 때문에 이에 대한 진단기술을 꾸준하게 준비하였으나 2005년 이후 우리나라 주변국가에서는 구제역 Asia1 혈청형이 다발하고 있는 양상을 보이고 있었다. 특히, 중국에서는 Asia1형이 지속적으로 발생을 하고 있으며 최근에는 A형도 추가 발생하고 있다. 또한, 북한에서도 2007년 1월에 구제역 Asia1형이 발생하였다. 이와 같이 주변국가에서 O형 이외의 여러가지 혈청형의 구제역바이러스가 발생하기 때문에 O형뿐만 아니라 Asia1형과 A형을 포함한 구제역바이러스 혈청형 7종에 대한 유전자를 동시에 검출하는 기법이 요구되었다.

또한, 구제역 의심축에 대한 항원검사를 실시할 경우에는 구제역과 임상증상이 유사한 수포성구내염(Vesicular stomatitis), 돼지수포병(Swine vesicular disease), 바이러스성 설사병(Bovine viral diarrhea disease), 소 유두종(Bovine papilloma), 소 전염성 비기관염(Infectious bovine rhinotracheitis)에 대해서도

동시에 감별진단을 해야 한다.

한편, 구제역 7종 혈청형과 구제역 유사질병 각각에 대한 진단법은 구축되어있으나 구제역 발생이 의심되는 상황에서 신속하게 감별진단을 하기위해서는 이들 질병 원인체에 대한 동시진단기법 개발이 요구되었다. 특히, 최근에 많이 사용하는 실시간 RT-PCR법은 고가의 장비를 필요로 하기 때문에 고전적인 RT-PCR법을 통한 구제역 유사질병 동시진단기법을 개발할 경우에는 본 과제의 파트너인 몽골 뿐만 아니라 동남아시아 여러 국가에 진단기술을 이전하여 우리나라 주변국으로부터 구제역의 유입을 사전에 차단할 수 있는 기반기술로도 활용하고자 한다.

국내에서 진단법을 개발하더라도 이를 평가할 수 있는 바이러스, 혈청 등 여러 유전자원이 부재하기 때문에 구제역이 다발하는 국가의 수의기관과의 협력연구가 필수적이었고 최근에 주변국가에서 많이 발생하는 Asia1형이 발생한 경험이 있어 해당 유전자원을 확보하고 있는 몽골중앙수의연구소와의 국제공동연구를 통하여 국내에서 개발한 유전자 동시진단기법의 유효성을 현지에서 적용하여 평가하고자 하였다.

2. 제2세부과제: 수포성구내염 뉴저지형 항체진단법 개발연구

구제역과 유사한 해외가축전염병 수포성구내염과 돼지수포병이다. 이들은 임상적으로 구제역과 유사하기 때문에 국제수역사무국에서 구제역과 마찬가지로 매우 중요한 질병으로 다루고 있다. 특히, 수포성구내염은 혈청학적으로 크게 뉴저지(New Jersey)형과 인디아나(Indiana)형으로 대별된다. 이중에서 돼지수포병 항체진단법('02-'04)과 수포성구내염 인디아나형('99-'01) 항체진단법은 이미 수의과학기술개발 연구사업을 통하여 이미 개발되었으나 수포성구내염 뉴저지형만은 아직 개발이 안된 상황이었다. 특히, 수포성구내염 혈청형중에서 뉴저지형은 전체 수포성구내염 임상증상의 80%를 차지할 정도로 전체 수포성구내염 바이러스 중 가장 병원성이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 과제를 통하여 수포성구내염 뉴저지형 항체를 신속하게 검출할 수 있는 진단법을 개발하여 궁극적으로는 국내예찰에 활용하고자 하였다.

Ⅲ. 연구내용 및 결과요약

1. 연구내용

가. 제1세부과제: 구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법 개발연구

(1) 1차년도: 질병특이 유전자 검색 및 다중 RT-PCR 조건확립
- 구제역바이러스 7종 혈청형 및 국내외 유사바이러스 확보
- 질병별 특이유전자 primer 제작 및 반응성 확인
- 구제역 혈청형 및 sublineage별 primer 제작 및 반응성 확인
- 구제역 및 유사질병별 RT-PCR 조건 확립
- 가검물의 기존진단법 검사
- 검사성적확인 가검물에 대한 패널 구축

(2) 2차년도: 질병특이유전자 검색 및 다중 RT-PCR 조건확립
- 혈청형별, 질병군별 최적 반응조합 설정
- 국내보유주를 이용하여 개발 진단법의 유효성평가
- 몽골 야외가검물에 대한 지속적인 표준패널 구축
- 몽골 가검물패널을 적용한 개발진단법의 유효성 평가 및 현장적용시험
- 베트남 가검물을 적용한 개발 진단법의 유효성 평가 및 현장 적용시험

나. 제1세부과제: 수포성구내염 뉴저지형 항체진단법 개발연구

(1) 1차년도: 특이진단항원 발현 및 진단용 단클론항체 제작
- 수포성구내염바이러스 뉴저지형 당단백질 추출
- 마우스를 대상으로 당단백질 면역하여 단클론항체 제작 및 중화항체 선발
- 유전자재조합 당단백질 발현 및 항혈청 제조

- 야외수집혈청에 대한 항체검사법 적용
- 검사성적확인 혈청에 대한 패널 구축

(2) 2차년도: 혈청형 특이 진단법 개발 및 유효성 평가
- 바이러스 추출 당단백질과 중화단클론항체를 이용한 진단법 최적조건 설정
- 진단법의 유효성 평가(민감도, 특이도)
- 유전자재조합 당단백질과 단클론항체를 이용한 진단법 최적반응조건 설정
- 진단법의 유효성 평가(민감도, 특이도)
- 몽골 야외 혈청에 대한 지속적인 표준패널 구축
- 몽골 혈청패널을 적용한 진단법 유효성 평가 및 현장적용시험

2. 결과요약

가. 제1세부과제: 구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법 개발연구

최근에 구제역 국제표준연구소에서 평가된 혈청형 특이적 프라이머도 자체 평가해 본 결과 비특이적 밴드가 검출되는 문제점이 있었으며, 이러한 프라이머는 보고된 지 이미 10년 이상이 경과되었기에 새로운 유전형을 반영한 신규 혈청형 프라이머의 도입이 필요한 상황이었다. 본 연구에서는 구제역 혈청형 감별과 구제역 유사질병의 진단을 동시에 가능하도록 한 전략을 마련하고 검출한계 및 특이도를 측정하였다. 즉, 프라이머를 섞어 적용할 경우에 생길 수 있는 간섭 현상을 최소화하기 위하여 몇 개의 프라이머를 세트로 묶고, 동일한 온도 조건에서 튜브를 반응시키도록 조정하였다. 또한 Asia1/O 형, A/C 형 감별 프라이머에 대해서 몽골과 베트남에서의 야외 시료에 적용함으로써 야외 적용 가능성을 증명하였다. 특히 베트남 야외시료 적용시에는 항원 ELISA 결과에서 음성으로 판정되었던 1개 시료가 universal primer와 O/Asia 1형 혈청형 감별 프라이머에서 모두 양성으로 판

정되어 보다 높은 특이도를 나타내었다. 개발된 유전자 진단법은 구제역의 진단과 혈청형 감별, 유사질병 진단을 간편한 방법으로 한번에 해결할 수 있다.

나. 제2세부과제: 수포성구내염 뉴저지형 항체진단법 개발연구

수포성구내염 혈청검사를 위한 표준진단법은 중화시험법이나 생바이러스를 취급해야 하는 관계로 차폐실험실을 사용해야하고 2-3일의 반응시간이 소요되는 단점이 있어서 대량의 혈청을 검사하기에는 부적합하였다. 이를 대체하기 위하여 재조합뉴클레오캡시드 단백질을 진단항원으로 사용한 진단법이 국제수역사무국 매뉴얼에 권장진단법으로 사용되어지는데 중화시험과의 상관성이 낮아서 중화시험에서 양성인 혈청이 음성이 나올 수 있는 개연성이 있다. 따라서 본 사업을 통하여 수포성구내염바이러스 중화에피톱을 보유한 당단백질을 진단항원으로 사용함으로써 중화시험법을 대체할 수 있는 신규 진단법을 개발하고자 하였다. 수포성구내염 뉴저지형에서 당단백질을 일반적으로 공지된 방법으로 추출하였다. 수포성구내염은 감수성 동물의 수가 매우 많기 때문에 경쟁방식의 진단법을 개발함으로써 축종에 상관없이 동일한 방식으로 검사할 수 있는 체계가 요구되었다. 이를 위해서는 진단항체로서 단일클론항체를 제작하였다. 추출 당단백질과 중화단일클론항체 1G11을 이용하여 경쟁방식의 ELISA (nGP ELISA)를 구축하였고 검출한계를 측정해보니, 반응저해도 40%를 기준으로 했을 때, 중화시험법 판정기준인 32배에 해당하였다. 국내에서 사육하는 소, 돼지, 말 혈청을 검사하였을 때 99.6% 특이도를 나타내었다. 축종별로 차이가 없어서 모든 축종에 대해서도 검사가 가능할 것으로 추정된다. 기존 진단법인 NC ELISA가 중화시험법 양성혈청 19점 중 5점을 음성으로 판정한 반면에 nGP ELISA는 19점 모두를 양성으로 정확하게 판정하였다.

이렇게 당단백질을 이용한 진단법의 유효성이 확인되었기 때문에 이번에는 수포성구내염바이러스를 취급 시 발생할 수 있는 위험요인을 제거하기 위하여 유전자재조합 방법으로 진단항원을 제작하고자 하였다. 이를 위

하여 수포성구내염바이러스 뉴저지형 유전자를 바탕으로 하여 재조합 배큘로바이러스를 제작하였고 이를 곤충세포에 접종하여 재조합단백질을 발현하였다. 돼지에서 유전자재조합 당단백질의 면역원성을 보면 불활화한 수포성구내염바이러스를 접종하였을 때와 대등한 중화항체역가를 나타내었고 소에서도 기존에 보고된 중화역가이상의 결과를 나타내었기 때문에 기존의 추출 당단백질 대체 가능성을 확인하였다. 이전에 선발한 중화단일클론항체를 함께 적용하여 재조합당단백질을 이용한 항체진단법의 최적반응조건을 설정하였다. 미국 농무부산하 NVSL에서 구입한 수포성구내염 중화시험법 양성혈청패널을 적용해 본 결과 기존의 nGP ELISA에서 음성 판정된 1두까지도 양성 판정할 정도로 높은 민감도를 나타내었다. 바이러스 중화역가 16배 혈청을 cutoff 수준으로 판정하였기 때문에 중화시험법보다 민감도가 우수하여 대량의 혈청검사를 위해 중화시험법을 대체할 수 있는 신규진단법으로서의 활용가능성을 제시하였다. 국내에서 사육하는 소와 말 혈청에 대해서 특이도 99%를 나타내었다.

Ⅳ. 우리원 단독수행시 미해결 분야의 해결된 기술 요약

현재 우리나라는 구제역 바이러스 혈청형 O형 3종, Asia1 2종, A형, SAT 1,2,3 각 1종만을 보유하고 있다. 구제역 유전자 검사법의 유효성을 평가하는 데에 필요한 다양한 야외시료를 보유하고 있지 못한 실정이다. 따라서 몽골 중앙수의연구소에서 보유하고 있는 O형과 Asia1형 구제역 야외시료를 사용하여 항원시료패널(45점, 아래 표 참조)을 구축하였다. 이러한 시료를 대상으로 본 과제에서 구제역 혈청 특이적 프라이머 세트를 적용하여 진단 민감도와 특이도를 검증하였다.

▶ 몽골에서 수집한 항원시료 목록

연번	시료채취장소	등록일자	축종	채취조직
1	Bayan-Ulgii	2002.08	Cattle	epithelium
2	Bayan-Ulgii	2002.08	Cattle	epithelium
3	Hovd Erdeneburen	2002.	Cattle	epithelium
4	Dornogovi Sainshand	2004.02	Cattle	epithelium
5	Dornogovi Sainshand	2004.02	Cattle	epithelium
6	Dornogovi Sainshand	2004.02	Gazella	heart tissue
7	Dornod Bayantumen	2005.08	Cattle	epithelium
8	Dornod Bayantumen	2005.08	Cattle	epithelium
9	Dornod Bayantumen	2005.08	Cattle	epithelium
10	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
11	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
12	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
13	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
14	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
15	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
16	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
17	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
18	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue

19	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
20	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
21	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
22	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
23	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
24	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
25	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
26	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
27	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
28	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
29	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
30	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
31	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
32	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
33	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
34	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
35	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
36	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
37	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
38	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
39	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
40	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
41	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
42	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium
43	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium
44	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium
45	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium

※ 회색표시: RT-PCR 결과, 양성판정샘플

(구제역 공통부위양성: 3-6, 8-10, 구제역 O형 양성: 3-4, 구제역 Asia1형 양성: 8-10)

▶ 야외시료 적용 결과

국가	비교진단법	프라이머	serotype	혈청형별 진단결과(시료 수)[c]		
				O(4)	Asia(3)	음성(38)
몽골	유전자 동시진단법	set 1	universal	4[b]	3	0
		set 2	O[a]	2[b]	0	0
			Asia 1[a]	0	3	0
		set 3	A[a]	0	0	0
			C[a]	0	0	0

[a] 혈청형 감별 특이도 100%
[b] set 1(universal & monoplex)의 민감도가 set 2(type specific & dualplex)보다 높음
[c] 양성, 음성 판정은 real-time PCR 결과를 토대로 하였음

V. 연구결과 활용에 대한 건의 및 경제성 분석

1. 연구결과 활용

가. 학술발표

(1) Characterization of recombinant glycoprotein and monoclonal antibodies for serological diagnosis of vesicular stomatitis. Hyang-Sim Lee, Young-Joon Ko, Hey-Young Jeoung, Jong-Hyeon Park, Kwang-Nyeong Lee, Su-Mi Kim, Yi-Seok Joo. Europe Virology Conference, Germany, 2009. 9.

(2) Diagnosis and molecular epidemiological study with serotype O and Asia specific primers of foot and mouth disease for the field samples from Asia 1. Kwang-Nyeong Lee, Su-Mi Kim, Seo-Yong Le, Dashzveg Bold, Ulziibat Gerelmaa, Nguyen Tung, Young-Joon Ko, Hyang-Sim Lee, Eun-Jeong Heo , Chang-Hee Kweon, Jong-Hyeon Park, 대한수의학회. 2008. 9

(3) Development of ELISA to detect antibodies against vesicular stomatitis virus glycoprotein. Young-Joon Ko, Hyang-Sim Lee, Hey-Young Jeoung, Eun-Jeong Heo, Chang-Hee Kweon. 대한수의학회. 2008. 9

(4) Detection of viral RNAs in field samples from Mongolia using foot-and mouth disease serotype O and Asia1 specific primers. Kwang-Nyeong Lee, Su-Mi Kim, Jong-Hyeon Park, Yi-Seok Joo, Chang-Hee Kweon, Dashzeveg B, Gerelmaa U, Sugar. S. SCVL-Proceedigs. 2008. 9

(5) Sequence analysis of a complete genome of foot-and-mouth disease virus isolated from Mongolian clinical samples. Kwang-Nyeong Lee, Jae-Ku Oem, Su-Mi Kim, Seo-Yong Le, R. Sodnomdarjaa, Sh. Tserendorj, S. Sugar, Yi-Seok Joo, Moon-Il Kang and Jong-Hyeon Park. SCVL-Proceedings. 2007.9

나. 논문게재

(1) Enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein and monoclonal antibody for detection of antibodies against vesicular stomatitis virus serotype New Jersey. Hyang-Sim Lee, Eun-Jeong Heo, Hey-Young Jeoung, Hyo-Rim Ko, Chang-Hee Kweon. Hee-Jeong Youn, Young-Joon Ko. Clinical and Vaccine Immunology. 2009, 16(5), in press.

(2) Expression of a recombinant glycoprotein in insect cells and its application for serological diagnosis of vesicular stomatitis virus serotype New Jersey. 2009. 예정.

다. 특허출원

(1) 수포성구내염바이러스 뉴저지형의 당단백질에 결합하는 단일클론항체 및 그의 용도. 고영준, 이향심, 허은정, 권창희. 2009. 3.

(2) 구제역 7가지 혈청형을 감별하는 PCR법. 김수미 외 6인 2009. 예정.

라. 표준기술활용

(1) 수포성구내염 뉴저지형 항체진단법. 고영준 외 7인. 가축질병병성감정실시요령. 2009. 3.

(2) 구제역 바이러스 7종 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법. 김수미 외 7인. 가축질병병성감정실시요령, 2009. 3.

2. 경제성 분석

가. 제1세부과제: 구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법 개발

(1) 본 연구에서 사용한 진단법인 유전자 진단법은 구제역 항원 진단법인 항원 ELISA, 실시간 유전자 진단법, 염기서열 분석법에 비하여 낮은 비용으로 신속한 진단이 가능하다는 장점이 있으므로 몽골과 같은 기술낙후 지역에 적용하기에 적합함

(2) 여러 형태의 시료를 준비할 필요 없이 한번의 핵산 추출(RNA/DNA 동시추출)로 여러 가지 질병의 진단이 가능하도록 설계됨

(3) 각각의 튜브에 동일한 핵산 추출시료를 넣고 동일한 annealing 온도(55℃)에서 one step RT-PCR 하도록 조건을 확립하였으므로 여러 번의 반복적인 PCR 장비 사용없이 한번의 운용으로 진단이 가능함

나. 제2세부과제: 수포성구내염 뉴저지형 항체진단법 개발연구

(1) 기존의 뉴클레오캡시드 단백질을 이용한 항체진단법은 표준진단법인 중화시험법과의 상관성이 낮은 반면에 본 과제에서 구축한 당단백질 이용 신규진단법은 중화시험법과 높은 상관성을 보이는 데에 그 가치가 크다.

(2) 중화시험법 방법상의 번거로움을 극복한 진단법으로서 수 시간 만에 결과

판독이 가능하고 전문역량에 무관하게 검사를 수행할 수 있는 간편하고 신속한 진단법이다.

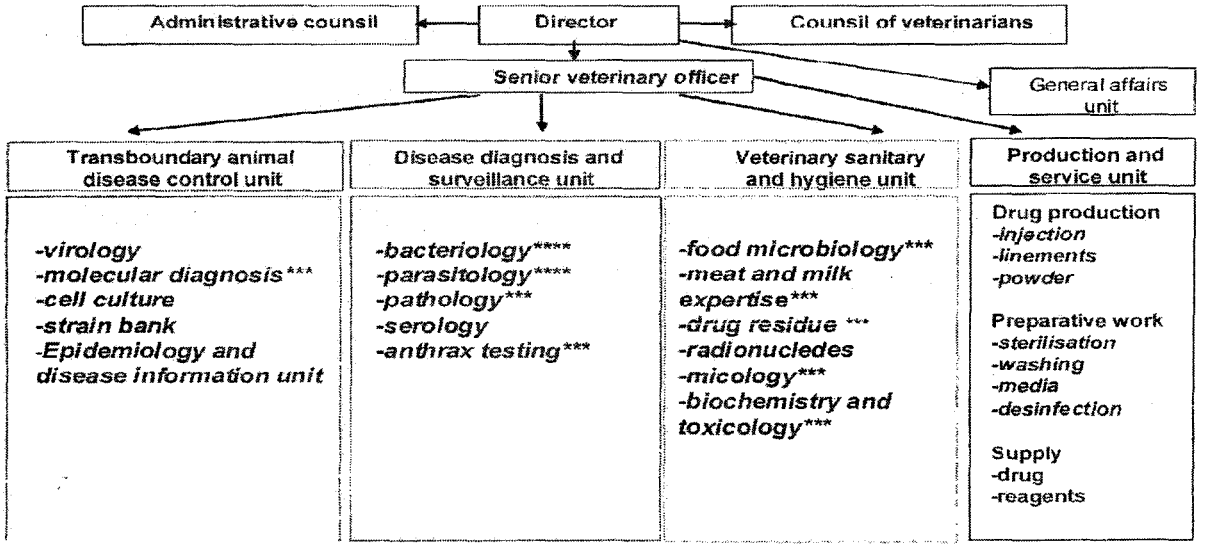
(3) 유전자재조합 당단백질을 이용하여 구축한 항체진단법은 수포성구내염바이러스를 취급하지 않고서도 일반실험실에서 손쉽게 진단할 수 있기 때문에 긴급방역상황에서 신속한 진단액의 생산이 가능하다.

(4) 수입에 의존하던 진단액을 자체개발하여 예산절감효과를 거양하고 진단키트의 해외수출시, 수포성구내염 상재지역인 아메리카대륙에서 사육하는 말과 소가 약 3억8천두이고 연간 국내예찰비율 1%, 검사비용을 두당 3천원으로 계산하여 약 110억원의 시장규모에서 10%를 점유한다고 가정하면 11억원의 경제적 수익을 예측할 수 있다.

Ⅵ. 공동연구 수행연구기관 현황

1. 몽골중앙수의연구소 조직

1947년에 설립된 정부기관으로서 총 인원은 47명이고 이중 수의사가 27명이며 전체 조직도는 아래 그림과 같다.



이 중 수의사들의 근무상황을 살펴보면 ▲ 전염병검사실(8명): 조류인플루엔자(2명), 구제역(2명), 생물공학(2명), 질병역학(2명) ▲ 질병진단실(9명): 혈청검사(4명), 바이러스 검사(2명), 세균검사(2명), 기생충검사(1명) ▲ 위생잔류실(6명) ▲ 약품생산(4명)으로 구성되어 있다.

2. 몽골중앙수의연구소 역할

- 몽골에서 발생하는 동물질병에 대한 검사와 더불어 수출입관련 전염병 검사 실시
- 식품안전과 관련하여 농약, 중독, 잔류물질검사 등을 실시하고 수출입 관련 고기와 우유에 대한 위생검사도 병행하고 있음
- 몽골에서 사용하는 생리식염수, 완충용액, 소 백선치료제, 인산보정제 등을 생산하여 소비자에게 판매

- 연구사업으로는 인도산 구제역 백신을 낙타, 소, 양, 염소에 접종 후 일자별로 채혈한 혈청을 대상으로 백신에 의한 축종별 방어항체가를 비교하는 실험 진행 중

3. 몽골 축산현황

- 주요가축 사육현황: 2007년도 기준으로 총 40.3백만두로서 낙타 0.3백만두, 말 2.2백만두, 소 2.4백만두, 양 17백만두, 염소 18.3백만두이다.

4. 몽골 가축방역 현황

- 주로 발생하는 전염병은 탄저, 광견병, 브루셀라, 말비저이고 2005년 이후에는 양두, 고병원성조류인플루엔자, 구제역 등이 발생하였다.

여 백

SUMMARY

제1세부과제: Development of RT-PCR methods for detection of foot-and-mouth disease virus and simultaneous detection of symptomatically related viruses

Although several sets of type specific primer for foot-and-mouth disease virus (FMDV) have been developed and validated, the need for more robust type specific primer sets is increasing due to inherent high mutation rate of FMDV. In addition, the diagnosis of FMDV needs simultaneous differentiation from other symptomatically related viruses. Therefore, we developed strategy for detection and typing of FMDV (7 serotypes) and detection of clinically related viruses(vesicular stomatitis virus, bovine viral diarrhea etc.). We determined 55℃ of annealing temperature in the condition of RT-PCR without non-specific results between other serotypes or viruses. The detection limits of the universal primer and the primer for FMDV typing was 5×10^2 and 5×10^2-5×10^3 copy numbers respectively. In validation tests in Vietnam, the primers designed to be specific for type O or Asia 1 of FMDV could detect 25 samples of O type and 6 samples of Asia 1 type in type specific manner. In addition, one out of the six samples which had been negative by antigen ELISA turned out to be positive, which is supposed to be due to the higher sensitivity of PCR than the antigen ELISA. In the field test in Mo ngolia, type specific primers of O and Asia 1 could detect 5 samples type-specifically and there was no cross-reactivity when we used type A and C specific primers on the same samples. All the 38 negative samples had no positive results with any primer set. Consistently, the primer set for amplifying FMDV genome on IRES region irrespective of serotypes was more sensitive than typing primer sets. These series of mutiplex PCR sets on vesicular diseases can be used as an integrative and rapid method for FMD diagnosis.

제2세부과제: Development of ELISA using a glycoprotein and monoclonal antibody for detection of antibodies to vesicular stomatitis virus serotype New Jersey

In this study, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using glycoprotein and monoclonal antibody (Mab) was developed for detection of antibodies against vesicular stomatitis virus (VSV) serotype New Jersey (NJ). The glycoprotein as a diagnostic antigen was extracted from partially purified VSV and the neutralizing Mab to VSV-NJ was incorporated to compete with antibodies in a blocking ELISA using glycoprotein (GP ELISA). The cutoff of the GP ELISA was set at percentage inhibition (PI) 40 which corresponded to the virus neutralization test (VNT) titer 32. With this threshold, the GP ELISA exhibited 99.6% specificity for naïve sera (n=3,005) from cattle (n=1,040), pigs (n=1,120), and horses (n=845). The GP ELISA did not cross react with positive sera from foot-and-mouth disease and swine vesicular disease as well as VSV serotype Indiana. The GP ELISA were more compatible with VNT than nucleocapsid-based ELISA (NC ELISA) for VSV-NJ positive sera.

To avoid the risk of exposure to the live VSV-NJ in the process of producing diagnostic antigens, a blocking ELISA (rGP ELISA) using a recombinant glycoprotein (rGP) and a neutralizing monoclonal antibody was developed for the detection of neutralizing antibodies to vesicular stomatitis virus serotype New Jersey (VSV-NJ). The rGP was expressed in insect cells by a baculovirus expression system. The rGP ELISA exhibited a specificity of 99% for domestic naive sera consisting of cattle and horses. The rGP ELISA correctly scored VSV-NJ reference sera and did not cross-react with sera from VSV-Indiana serotype and other similar vesicular diseases such as foot-and-mouth disease and swine vesicular disease. In summary, this is the first report that the rGP-based blocking ELISA could be a useful tool as a simple and rapid assay to replace the VNT.

- 목 차 -

제1세부과제 : 구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법 개발

Ⅰ. 서 언 ····· 25

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 27

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 30

Ⅳ. 종합결과 ····· 40

Ⅴ. 적 요 ····· 41

Ⅵ. 인용문헌 ····· 42

제2세부과제 : 수포성구내염 뉴저지형 항체진단법 개발

- 제1장. 바이러스 유래 추출 당단백질 이용한 항체진단법 개발

Ⅰ. 서 언 ····· 47

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 49

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 53

Ⅳ. 종합결과 ····· 61

Ⅴ. 적 요 ····· 62

Ⅵ. 인용문헌 ····· 63

- 제2장. 유전자재조합 당단백질 이용한 항체진단법 개발

Ⅰ. 서 언 ····· 67

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 68

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 72

Ⅳ. 종합결과 ····· 80

Ⅴ. 적 요 ····· 81

Ⅵ. 인용문헌 ····· 82

제1세부과제

구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법 개발

여 백

수포성질병 동시진단기법개발 및 현장적용연구
(제1세부과제: 구제역바이러스 및 유사질병바이러스 유전자 동시진단법 개발)

Ⅰ. 서 언

현재 우리나라 주변의 아시아 국가(몽골, 중국, 동남아시아)에서 구제역이 빈번하게 발생하고 있으므로 구제역 방역상 위험요소가 되고 있다. 이중 대부분의 국가들이 개발도상국인 상황이므로 구제역 항원 진단에 경제적 부담과 전문인력 수급에 어려움을 가지고 있다. 유전자 진단법은 구제역 항원 진단법인 항원 ELISA, 실시간 유전자 진단법, 염기서열 분석법에 비하여 고도의 실험 기술이 필요치 않으면서 낮은 비용으로 신속한 진단이 가능하다는 장점이 있으므로 몽골과 같은 기술낙후지역에 적용하기에 적합하다.
구제역 발생시 백신 정책의 수행을 위해서는 구제역 혈청형의 신속한 판단이 매우 중요하며, 긴급 발생시 뿐 아니라 구제역이 수시로 발생하는 동남아시아 국가들에서도 여러 혈청형이 혼재하는 상황일 때 신속하게 진단할 수 있는 진단법이 필요하다.

기존에 구제역 혈청형 감별에 세계적으로 사용되고 있는 프라이머[1),2),3)] 의 경우 O type 확인 프라이머를 Asia 1 type의 아시아 유행주에 적용하였을 때 비특이 band가 관찰되고 있으므로 새로운 감별 프라이머의 필요성이 제기되었다. 따라서 본 연구에서는 구제역의 아시아 유행주에 대해서도 특이적이며 구제역의 7가지 혈청형을 구별할 수 있는 유전자 검출법을 확립하였고, 아울러 구제역과 감별진단이 필요한 수포성구내염 (Vesicular stomatitis), 돼지수포병 (Swine vesicular disease), 소 바이러스성 설사병 (Bovine viral diarrhea disease), 소 유두종 (Bovine papilloma), 소 전염성 비기관염 (Infectious bovine

rhinotracheitis)의 수포성 질병을 동시진단할 수 있는 전략을 마련하였다.

최근에 주변국가에서 많이 발생하는 Asia1형이 발생한 경험이 있고 해당 유전자원을 확보하고 있는 몽골 중앙수의연구소와의 국제공동연구를 통하여 국내에서 개발한 유전자 동시진단기법의 유효성을 현지에서 적용하여 평가하고자 하였다. 또한 추가적으로 베트남 현지평가를 통하여 유효성을 재확인하였다. 향후 우리나라 주변의 구제역 발생국 및 위험국의 본 유전자 진단법의 지원을 통하여 능동적인 구제역 차단효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다.

II. 재료 및 방법

1. 바이러스와 세포

구제역 바이러스 7종 중 O/SKR/2002는 우리나라 분리주이며, 5종 (O1 Manisa, Asia1/CAM/9/80, A22/IRQ 24/64, C3/Resende, SAT1/BOT 1/68, SAT2/ZIM 5/81 and SAT3/ZIM 4/81)은 영국 퍼브라이트 연구소에서, Asia1/MOG/05는 몽골중앙수의연구소로부터 도입되었다. 수포성구내염 바이러스는 미국 National Veterinary Services Laboratories (NVSL)에서, 돼지수포병 바이러스는 네덜란드의 Institute of Animal Science and Health(IDDLO)에서 도입되었고, 그 외 소 바이러스성 설사병, 소 유두종, 소 전염병 비기관염 바이러스는 국립수의과학검역원 바이러스과와 병리과 협조를 통하여 확보하였다 (표4). 바이러스 역가검사와 증식을 위해 IBRS-2 (FMDV, SVD, VSV), MDBK(BVD, IBRV) cell이 사용되었다. 이들 세포는 10% fetal bovine serum과 항생제를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)의 배지로 5% 이산화탄소를 유지하는 37℃ 배양기에서 증식시켰다. 바이러스 역가는 formula of Reed and Muench방법을 사용하여 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$)[4]을 계산하였다.

2. 프라이머 디자인 및 제작

구제역 유무를 진단하는 프라이머는 이전에 발표되었던 IRES 부분을 증폭하는 시퀀스[5]로 디자인하였고, 구제역 혈청형 감별을 위한 프라이머는 Blast(NCBI)와 Bioedit program[6]을 사용하여 프라이머를 디자인하였다. SVD[7], VSV[8], BVD[9], IBR[10], BPV[11] 는 이전에 발표되었던 논문의 프라이머 정보를 사용하여 디자인하였다. 디자인된 프라이머 시퀀스를 Bioneer corporation (Republic of Korea)에 의뢰하여 oligonucleotide를 제작하였다.

3. 바이러스 핵산 추출 및 One-step RT-PCR

FMDV, SVD, VSV, IBRV, BVDV는 세포에서 증식 후 바이러스를 수확한다. BPV는 양성시료 상층액을 준비하였다. RNA/DNA extraction kit(Intron)을 사용하여 각 바이러스의 핵산을 추출하고 -70℃에 보관하였다. 추출 과정은 kit의 매뉴얼을 따랐다. -70℃에서 꺼내 녹인 RNA(또는 DNA)를 Maxime RT-PCR Premix kit(Intron)을 사용하여 One-step RT-PCR 과정을 진행하였다. 간단히 설명하면, RT-PCR Premix에 5 pmol의 forward 와 Reverse primer를 각각 1 ul, RNA template 3 ul, RNase-free water를 16 ul 넣어 total 20 ul를 맞춘다. 조성을 맞춘 튜브를 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystem)를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. RT-PCR 조건은 표 1과 같다. RT-PCR 시행 후 전기영동하여 band를 확인하였다.

표 1. RT-PCR 반응조건

RT-PCR cycle		temperature (℃)	Time
1 cycle	RT-reaction	45	30 min
	Inactivation of RTase	94	5 min
40 cycle	Denaturation	94	30 s
	Annealing	55	30 s
	Extension	72	1 min

4. 민감도 시험

FMDV는 혈청형별로 3×10^5 TCID 바이러스 상층액을 RNA/DNA extraction kit (Intron)를 이용하여 RNA 추출하였다. 추출된 RNA를 2배 단계희석한 후 FMDV의 copy 수 계산을 위하여 one step Primescript RT-PCR kit (TAKARA, Japan)와 ABI 7500 Real-time PCR System

(Applied Biosystem, USA)를 사용하여 real-time PCR을 시행하였다. 구제역 7가지 혈청형을 모두 확인하기위한 프라이머로서는 3D 부분을 목적으로 하는 프라미어 sense 5′-GGA ACY GGG TTT TAY AAA CCT GTR AT-3′ 와 antisense 5′-CCT CTC CTT TGC ACG CCG TGG GA-3′를 사용하였다. Probe는 5'말단에는 FAM을 3'말단에는 TAMRA를 라벨링한 5′-CCC ADC GCA GGT AAA GYG ATC TGT A-3′를 사용하였다. SVD, VSV, BVDV는 $10^{5.3-5.7}$로, IBRV는 $10^{6.5}$으로 역가검정된 바이러스 상층액을 10배 단계희석한 뒤 RNA/DNA extraction kit(Intron)를 이용하여 RNA 및 DNA를 추출한다. BPV는 표 3의 BPV 진단 프라이머를 사용하여 PCR 한 뒤 전기영동 후 elution 하여 PGEM-T vector (Promega)로 클로닝 하였다. 클로닝된 plasmid를 DNA copy number를 계산하여 5.5×10^{7}부터 10배 단계희석 하였다. 단계희석되어 copy수 및 역가가 결정된 FMDV, VSV, SVD, BVD, BPV 바이러스 핵산을 각 프라이머 세트에 적용하여 One-step RT-PCR을 이전과 같은 조건으로 시행하였다. RT-PCR 시행후 전기영동하여 민감도를 확인하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 구제역 및 유사질병의 동시진단 전략 확립

구제역 및 유사질병 진단을 위한 프라이머를 조합하여 간섭현상을 최소화하면서 동시 진단이 가능하도록 하였다 (표 2). set 1을 포함한 튜브에서 구제역 유무를 판단하고 set 2, 3, 4를 포함한 각각의 튜브에서 혈청형을 감별한다. 또한 set 5와 6을 적용하여 구제역이 아닐 경우 구제역 유사질병을 동시에 알아낼 수 있는 전략을 수립하였다.

표 2. 동시 진단을 위한 프라이머 조합

프라이머 No.	진단 바이러스	사용목적
Set 1	FMD[a] Universal	구제역 유무 판단
Set 2	FMD O, Asia 1	구제역 혈청형 감별
Set 3	FMD A, C	
Set 4	FMD SAT 1, 2, 3	
Set 5	SVDV[b], VSV[c], BVDV[d]	구제역유사질병 진단 (RNA virus)
Set 6	BPV[e], IBRV[f]	구제역유사질병 진단 (DNA virus)

[a] FMD (Foot-and-mouth disease virus)

[b] SVD (Swine vesicular disease)

[c] VSV (Vesicular stomatitis virus)

[d] BVDV (Bovine viral diarrhea virus)

[e] BPV (Bovine papilloma virus)

[f] IBRV (Infectious bovine rhinitis virus, Bovine herpes virus)

2. 구제역 7종 혈청형과 유사질병 진단에 사용되는 프라이머 디자인

동시 진단을 위한 프라이머 조합을 바탕으로 O, A, Asia, C형은 전기영

동상의 band 사이즈를 통해 혈청형을 구별하도록 디자인하였다 (표3). 아시아에서 중요도가 비교적 떨어지고 strain 간의 유전자 상동성이 낮은 SAT type의 경우 SAT 1, 2, 3형은 하나의 band로 진단하도록 하였다. 구제역 이외의 수포성 질병들 역시 전기영동상의 band 사이즈를 통해 진단이 가능하도록 하였다 (표3).

표 3. 본 연구에 사용된 진단 프라이머

No.	Name	Specificity	Direction	Sequence (5'-3')	size bp (type)
1	IRES-F	Universal	Forward	GCCTGGTCTTTCCAGGTCT	310(All)
	IRES-R		Reverse	CCAGTCCCCTTCTCAGATC	
2	O-F1a	O, Asia type multiplex	Forward	GGTGCCATCAAGGCAACTCGTGT	190(O)
	O-F1b		Forward	GTGCCATCAAAGCCACTCGGGT	
	O-F1c		Forward	GCCATCAAAGCGACCCGGGT	
	Asia1_F1		Forward	CGACTGCCTACCAGAAGMARCCCA	390(Asia 1)
	All7_2AbR		Reverse	AARAAGAARGGYCCRGGGTT	
3	All4_VP1 F	A, C type multiplex	Forward	TGCCACNGTNGARAACTAYGGHGG	540(A)
	A_R		Reverse	TCATGCGCACGAGRAAGCTCGTG	
	C_R		Reverse	GGGATTGGTTGTGTTGTYAAGTGCAGAAAC	270(C)
4	SAT common F1	SAT 1,2,3 common	Forward	ACACTTYCGYGACACCATGAA	496(SAT)
	SAT common R		Reverse	CCTYCGTTCAGGCGYTTGT	
5	SVD F	RNA virus multiplex	Forward	TTCAGAATGATTGCATATGGGG	
	SVD R		Reverse	TCACGTTTGTCCAGGTTACC	154(SVD)
	VSV F		Forward	AATGACGAYGAGACYATGCAATC	
	VSV R		Reverse	CAAGTCACYCGTGTGACCATCT	110(VSV)
	BVD F		Forward	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC	
	BVD R		Reverse	ACTCCATGTGCCATGTACAGC	290(BVD)
6	BPV F	DNA virus multiplex	Forward	GCTAAGCAACAGATTCTGTTGC	
	BPV R		Reverse	TCAGCCATTTTGAGGTAGTCTGG	266(BPV)
	IBRV F		Forward	ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG	
	IBRV R		Reverse	GTCGACTATGGCCTTGTGTGC	425(BHV)

3. 특이적 진단 결과 확인

구제역에서 프라이머 세트를 적용하였을 때 혈청형간 비특이가 관찰되지 않았으며, 의도한 size의 band를 확인할 수 있었다. 또한 여러 혈청형이 혼재하여 존재할 때에도 각 혈청형 구별이 가능함이 증명되었다 (그림 1). 구제역 이외의 수포질병의 적용 시에도, 바이러스 간 비특이 반응은 관찰되지 않았으며 의도한 size의 band를 관찰할 수 있었다 (그림 2).

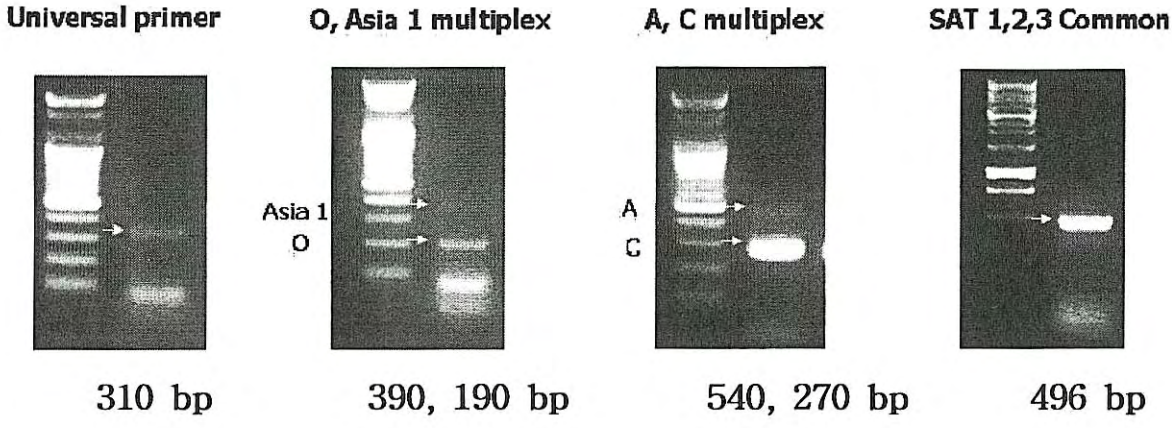


그림 1. 프라이머 조합(1-4)에서의 구제역 동시진단 PCR 결과

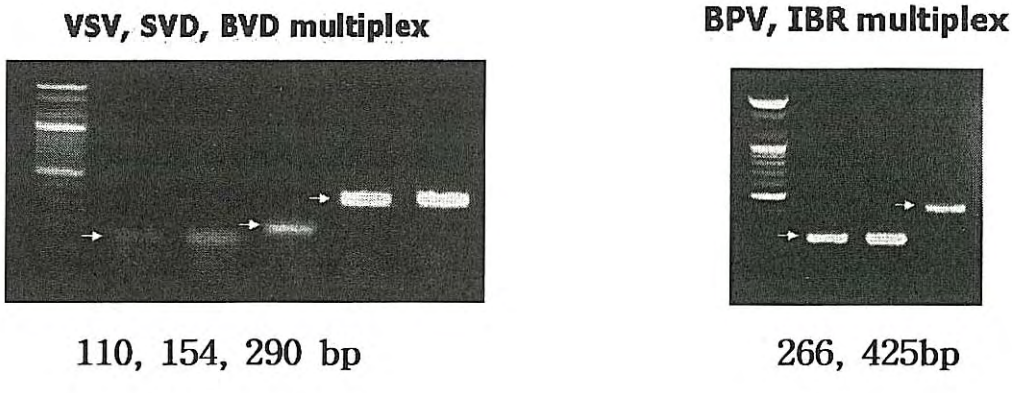


그림 2. 각 프라이머 조합(set 5,6)에서의 유사질병 동시진단 PCR 결과

4. 진단 프라이머의 민감도 측정 및 특이도 확인

구제역바이러스 확인을 위한 set 1 (universal primer) 적용시 SAT 2를 제외하고 모두 500 copy 까지는 전기영동상에서 확인이 가능하였다 (그림 3). 구제역 혈청형 감별을 위한 set 2, 3을 적용하였을 때는 10^2-10^3 copy 까지 확인이 가능하였고, set 4를 사용하여 SAT type에 적용하였을 때는 10^3-10^4 까지 확인이 가능하였다(그림 4). 구제역에 있어서는 universal primer의 민감도가 혈청형 감별 프라이머인 set 2, 3, 4를 적용했을 때보다 뛰어난 민감도를 보였다 (표4). 구제역 이외의 수포성 질병중 RNA virus 확인을 위한 set 5의 경우에는 질병마다 민감도에 약간의 차이를 보였다 (그림 5). VSV 의 검출 한계가 다소 낮았으며 그에 비해 BVD의 민감도가 높았다. set 6의 경우에는 각 바이러스 역가와 copy number를 기준으로 측정하였으므로 검출한계의 단순비교는 어려웠다 (그림 5, 표 4).

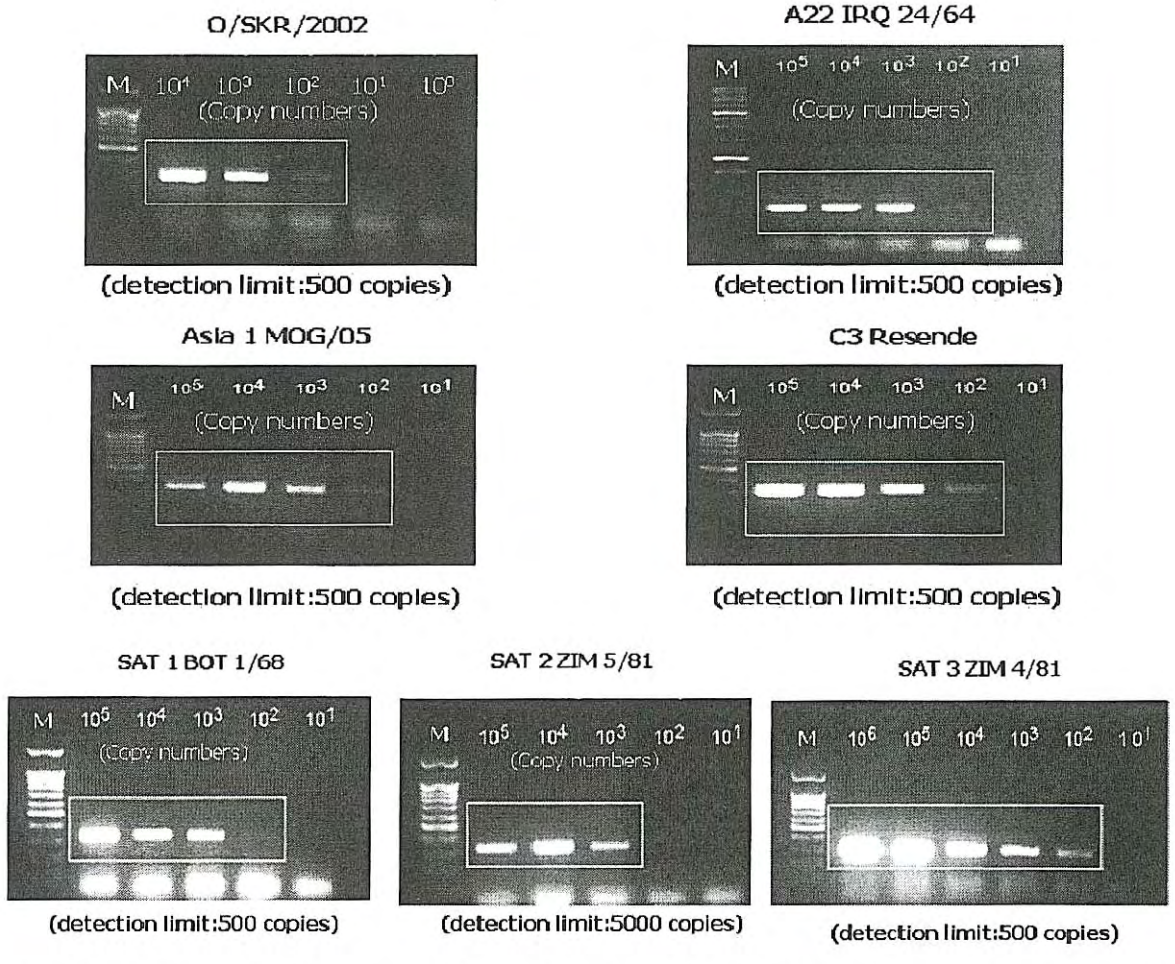


그림 3. Set 1(Universal primer)의 구제역 바이러스에서의 민감도 검사

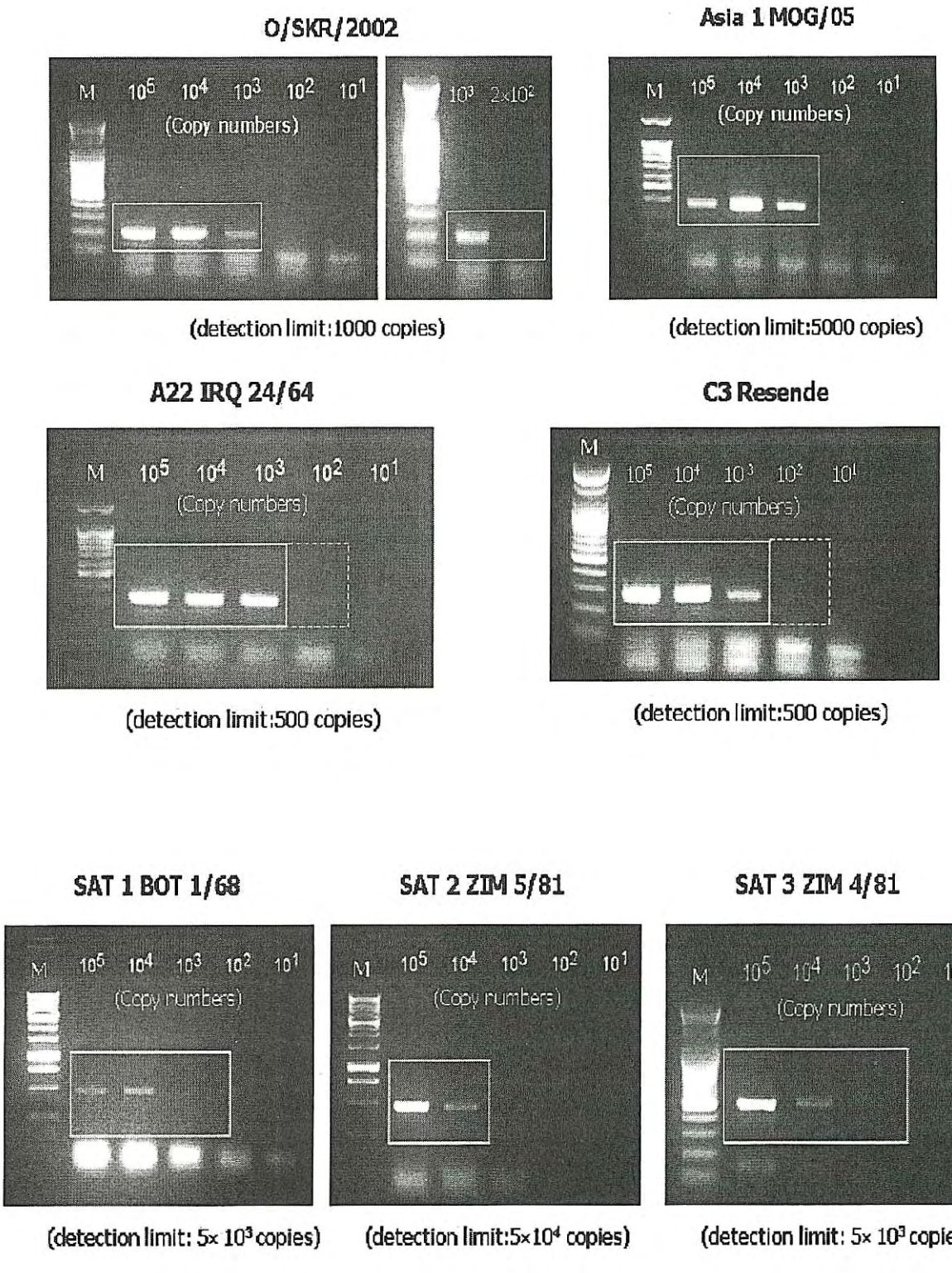


그림 4. set 2, 3, 4의 구제역 바이러스에서의 민감도 검사

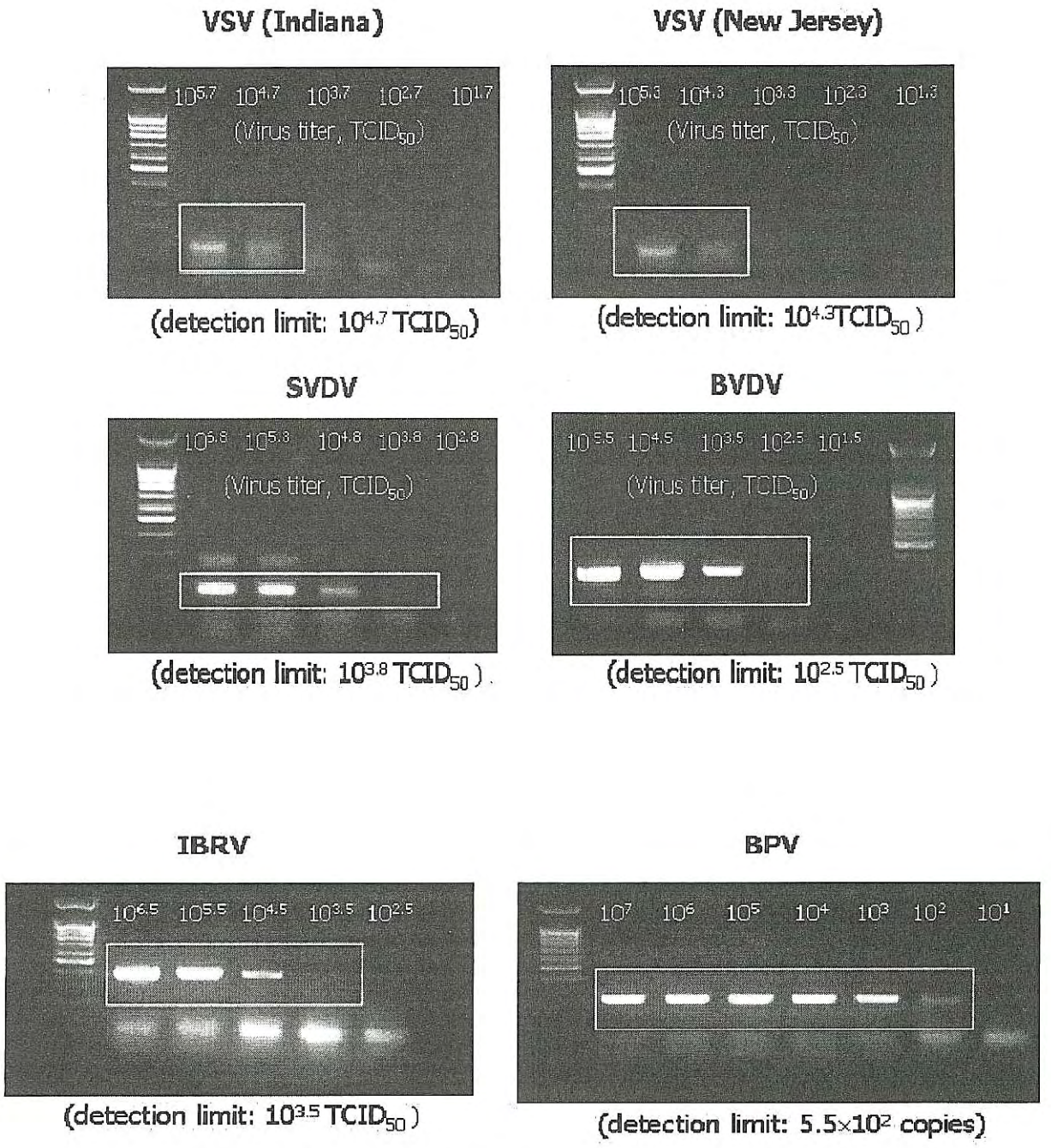


그림 5. set 5, 6 의 수포성질병 바이러스에서의 민감도 검사

표 4. 프라이머 세트별 검출 한계

No.	진단대상	적용 바이러스 strain	검출한계 (RNA copy no.)
Set 1	FMD universal	O/SKR/2002	5×10^2
		A22/IRQ 24/64	5×10^2
		Asia 1/MOG/05	5×10^2
		C3 Resende	5×10^2
		SAT 1/BOT 1/68	5×10^2
		SAT 2/ZIM 5/81	5×10^3
		SAT 3/4/81	5×10^2
Set 2	O, Asia 1	O/SKR/2002	1×10^3
		Asia 1/MOG/05	5×10^3
Set 3	A, C	A22/IRQ/24/64	5×10^2
		C3/Resende	5×10^2
Set 4	SAT 1, 2, 3	SAT 1/BOT 1/68	5×10^3
		SAT 2/ZIM 5/81	5×10^4
		SAT 3/4/81	5×10^3
Set 5	VSV, SVDV, BVDV	VSV Indiana	$10^{4.7}$ ($TCID_{50}$)
		VSV New Jersey	$10^{4.3}$ ($TCID_{50}$)
		SVDV UKG 27/72	$10^{3.8}$ ($TCID_{50}$)
		BVDV type I	$10^{2.5}$ ($TCID_{50}$)
Set 6	BPV, IBRV	BPV type I	$10^{3.5}$ ($TCID_{50}$)
		BHV type I	5.5×10^2

5. 몽골과 베트남 구제역 야외시료 적용을 통한 실증 시험

확립된 구제역 진단세트 중 set 1, 2, 3에 대하여 베트남과 몽골의 야외시료를 사용한 실증시험을 실시하였다. 베트남에서는 항원 ELISA

결과가 있는 패널을 사용하여 그 결과를 비교하였다 (표 5). 항원 ELISA 양성시료에서 동일한 혈청형으로 판정되었고 (특이도 100%) 특히, 항원 ELISA에서 음성으로 판정한 시료에 대하여 Universal primer와 O형 특이적 primer에서 모두 양성으로 판정된 1개의 시료가 존재하였다 (표 5).

몽골의 야외 가검패널 (표 6)을 사용하였을 때도 역시 혈청형 감별 특이도는 100%를 보였다. 그러나 Universal primer에서 확인된 시료 2개가 혈청감별 primer에서는 확인되지 않았다 (표 6). 이것은 Universal primer(set 1)의 민감도가 O/Asia 1 감별 primer 보다 약 1log 정도 높은 민감도를 보여준 표 4의 결과와 일치한다. 베트남과 몽골에서의 Set 1, 2, 3 의 야외 실증 시험 결과 항원 ELISA보다 뛰어난 민감도와 100%의 혈청형 감별 특이도를 보여주었다.

표 5. 베트남에서의 야외시료 적용 결과

국가	진단법	프라이머	serotype	혈청형별 진단결과 (시료 수)[c]			
				O(25)	Asia1(6)	음성(5)	의음성(1)[b]
베트남	유전자 동시진단법	set 1	universal	25	6	0	1
		set 2	O[a]	25	0	0	1
			Asia 1[a]	0	6	0	0
		set 3	A[a]	0	0	0	0
			C[a]	0	0	0	0

[a] 혈청형 감별 특이도 100%

[b] 민감도는 항원 ELISA보다 뛰어남. 항원 ELISA 음성시료가 set 1과 2에서 양성 판정

[c] 양성, 음성 및 혈청형 감별은 항원 ELISA 결과와 비교하였음

표 6. 몽골에서 제공한 가검시료 패널

연번	시료채취장소	등록일자	축종	채취조직
1	Bayan-Ulgii	2002.08	Cattle	epithelium
2	Bayan-Ulgii	2002.08	Cattle	epithelium
3	Hovd Erdeneburen	2002.	Cattle	epithelium
4	Dornogovi Sainshand	2004.02	Cattle	epithelium
5	Dornogovi Sainshand	2004.02	Cattle	epithelium
6	Dornogovi Sainshand	2004.02	Gazella	heart tissue
7	Dornod Bayantumen	2005.08	Cattle	epithelium
8	Dornod Bayantumen	2005.08	Cattle	epithelium
9	Dornod Bayantumen	2005.08	Cattle	epithelium
10	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
11	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
12	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
13	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
14	Ulaanbaatar Zaisan	2006.04	Cattle	Probang samples
15	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
16	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
17	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
18	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
19	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
20	Dornod Bayantumen	2007.10.08	Gazella	pharyngeal tissue
21	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
22	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
23	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
24	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
25	Cuhbaatar Asgat	2007.10.09	Gazella	pharyngeal tissue
26	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
27	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
28	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
29	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue

30	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
31	Dornogovi Sainshand	2007.10.11	Gazella	pharyngeal tissue
32	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
33	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
34	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
35	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
36	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
37	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
38	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
39	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
40	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
41	Dundgovi Deren	2007.10.14	Gazella	pharyngeal tissue
42	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium
43	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium
44	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium
45	Ulaanbaatar	2007.10.17	Cattle	tongue epthelium

※ 회색표시: RT-PCR 결과, 양성판정샘플

(구제역 공통부위양성: 3-6, 8-10, 구제역 O형 양성: 3-4, 구제역 Asia1형 양성: 8-10)

표 7. 몽골에서의 야외시료 적용 결과

국가	비교진단법	프라이머	serotype	혈청형별 진단결과(시료 수)[c]		
				O(4)	Asia(3)	음성(38)
몽골	유전자 동시진단법	set 1	universal	4[b]	3	0
		set 2	O[a]	2[b]	0	0
			Asia 1[a]	0	3	0
		set 3	A[a]	0	0	0
			C[a]	0	0	0

[a] 혈청형 감별 특이도 100%

[b] set 1 (universal & monoplex) 민감도가 set 2 (type specific & dualplex)보다 높음

[c] 양성, 음성 판정은 real-time PCR 결과를 토대로 하였음

Ⅳ. 종합결과

본 연구에서는 구제역의 혈청형 감별과 동시에 구제역 유사질병을 동시에 진단하는 진단법을 개발함으로써 아시아의 구제역 방역에 도움을 주고자 하였다. 구제역 및 유사질병 진단을 위한 프라이머를 조합하여 간섭현상을 최소화 하면서 동시 진단이 가능하도록 한 전략을 수립하였다 (표 2). Set 1을 포함한 튜브에서 구제역 유무를 판단하고 set 2, 3, 4를 포함한 각각의 튜브에서 혈청형 (O, A, Asia 1, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3)을 감별하며, set 5와 6을 적용하여 구제역 유사질병을 동시에 알아낼 수 있도록 하였다. 또한 각각의 튜브에 동일한 핵산 추출시료를 넣고 동일한 annealing 온도(55℃)에서 RT-PCR 하도록 조건을 확립하였다. 각각의 민감도를 살펴보면, 아시아에서 중요도가 높은 O, A, Asia 1, C type을 확인하는 set 1,2,3 에서는 500에서 5000 copy까지의 구제역 바이러스 검출한계를 보였으며, SAT type 확인을 위한 set 4에서는 5000-50000 copy의 비교적 낮은 검출한계를 보였다 (표 4). 모든 구제역 확인 프라이머는 혈청형간 비특이 밴드는 관찰되지 않았다 (그림 4). 구제역 유사질병을 진단하는 set 5,6의 검출한계는 다양하였으나, 역시 질병간 감별을 방해하는 비특이 밴드는 관찰되지 않았다 (그림 5). 아시아에서 중요도가 높은 O, A, Asia 1, C 형에 대한 진단을 위한 set 1,2,3 에 대한 실증시험을 위하여 몽골과 베트남 현지 가검 시료를 적용하였다. 그 결과 몽골과 베트남 모두에서 혈청형 양성과 음성을 판단하는 진단 특이도와 혈청형 감별 특이도는 100%를 보였고, 민감도에 있어서는 항원 ELISA보다는 높고 (표 5) Real-time PCR보다는 낮은 수준을 보였다 (표 6). 이상의 결과에서 구제역 유무와 혈청형 감별, 유사질병 진단의 동시적용이 가능함을 보여주었으며, 야외시료의 적용을 통하여 중요 혈청형에 대한 진단에 효과적임을 입증하였다. 본 연구의 산물을 통하여 우리나라 주변의 개발도상국에 구제역 진단기술을 지원함으로써 우리나라 구제역 방역에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

V. 적 요

1. 구제역 혈청형 공통부위에 대한 프라이머를 제작하였고 그 유효성을 확인하였다.

2. 구제역 혈청형별 프라이머 세트를 제작하였고 그 유효성을 확인하였다.

3. 모든 프라이머 세트는 혈청형간, 서로 다른 바이러스 간 간섭현상 없이 특이적인 밴드를 확인할 수 있었으며, 아시아에서 특히 중요도가 높은 구제역 O, A, Asia 1, C type을 확인할 경우 500-5000 copy number 까지의 검출한계를 나타내었다.

4. 몽골과 베트남의 야외 시료를 이용한 실증 시험 결과를 통해서도 양성과 음성을 판단하는 진단 특이도와 혈청형 감별 특이도는 100%를 보였다.

5. Real-time RT-PCR 보다는 낮고, 항원 ELISA 보다는 높은 민감도를 확인하였다.

6. 구제역과 임상적으로 구별을 요하는 수포성질병에 대해서도 유전자진단법을 확립하였고 구제역과 동시감별이 가능하였다.

VI. 인용문헌

1. Vangrysperre W, De Clercq K. Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. Arch Virol. 1996. 141(2): 331-44.
2. Reid SM, Hutchings GH, Ferris NP, De Clercq K. Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: evaluation of primers for serotypic characterisation of viral RNA in clinical samples. J. Virol. Metho. 1999. 83(1-2):113-23.
3. Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, De Clercq K, Newman bJ, Knowle NJ, Samuel AR. Diagnosis of foot-and-mouth disease by RT-PCR: use of phylogenetic data to evaluate primers for the typing of viral RNA in clinical samples. Arch. Virol. 2001. 146(12): 2421-2434.
4. Reed, L. I., and H. Muench. A simple method of estimating fifty percent end points. Am.J.Hygiene 1938. 27:493-497.
5. Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Knowles N.J. and Samuel A.R , Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Metho. 2000. 89:167 - 176.
6. Hall, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 1999. Nucleic Acids Symp Ser 41:95-98.
7. Fernandez, J., M. Aguero, L. Romero, C. Sanchez, S. Belak, M. Aris, and J. M. Sanchez-Vizcaubo. Rapid and differential diagnosis of foot-and-mouth disease, swine vesicular disease, and vesicular stomatitis by a new multiplex RT-PCT assay. J. Virol. Metho. 2008. 147: 301-311.
8. Hofner M.C., et al., A hemi-nested PCR assay for the detection and

identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. J. Virol. Methods. 1994. 50: 11-20.

9. Lunardi, M.,S.A. Headley, J.A.N. Lisboa, A.M. Amude, A.A. Alfieri. Outbreak of acute bovine viral diarrhea in Brazilian beef cattle: Clinicopathological findings and molecular characterization of a wild-type BVDV strain subtype 1b. Res. Vet. Sci. 2008.
10. Takiuchi, E., K.C. Medici, A.F. Alfieri, A.A. Alfieri, Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi-nested PCR in Brazilian cattle herds. Res.Vet. Sci. 2005. 79: 85-88.
11. Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R and Stanek C. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines, J.Gen.Virol. 2008. 89:1390-1395.

여 백

제2세부과제

- 제1장. 바이러스 유래 추출 당단백질 이용한 항체진단법 개발

- 제2장. 유전자재조합 당단백질 이용한 항체 진단법 개발

여 백

수포성질병 동시진단기법개발 및 현장적용연구
(제2세부과제: 수포성구내염 뉴저지형 항체진단기법 개발)

제1장. 바이러스 유래 추출 당단백질을 이용한 항체진단법 개발

Ⅰ. 서 언

수포성구내염은 주로 말, 소, 돼지 등에 발생하는 수포성질병이다[15, 20, 22]. 말에서 감염되는 것만 제외하면 구제역이나 돼지수포병과 임상적으로 구분이 불가능하다. 양이나, 염소 뿐만 아니라 다른 야생동물도 감염될 수 있을 정도로 감수성동물이 다양하다. 수포성구내염에 감염된 개체에 있어서 잠복기는 2일에서 8일이다. 보통은 과도하게 침을 많이 흘리는 현상을 보이고 수포형성 전후에 체온이 급상승한다. 소와 말에서 수포가 혀 상피, 잇몸 등 구강에 병변이 발생하여 사료섭취가 곤란하기 때문에 체중감소로 이어진다. 이러한 병변으로 인해서 말의 경우에는 경마산업의 피해로 이어지고 젖소에서는 유두에 병변이 발생하여 착유량이 급감하고 2차 감염으로 인한 유방염 가능성이 높아진다. 결과적으로 무역상의 장애를 통한 경제적인 피해를 초래한다[20]. 수포성구내염은 현재 아메리카 대륙에서만 발생하고 있어서 신대륙 질병이라고도 하는데 미국에서는 1889년부터 거의 10년 주기로 1995년까지 대규모 발병하였다. 이후로는 1997년에 발생하였고 2004년부터 다시 재발한 상태로 지금까지도 매년 발생하고 있다. 멕시코 남부, 중앙아메리카 국가, 남아메리카 북부, 브라질 등은 수포성구내염이 빈번하게 발생하는 대표적인 지역이다. 수포성구내염은 임상적으로 구제역과 유사하기 때문에[8, 20] 국제수역사무국에서 구제역과 마찬가지로 매우 중요한 질병으로 다루고 있다. 그 원인체는 수포성구내염바이러스 (Vesicular stomatitis virus)이며 *Rhabdoviridae* family, *Vesiculaovirus* genus 바이러스로 분류되고 바이러스 입자형태는 탄환모양으로서 길이 100-430nm, 직경 45-100nm이고 외층에 직경 3nm, 길이 5-10nm의 돌기가 있는 피막을 갖고 있다. 핵산은 단일가닥의 negative polarity RNA이며 5종류의 단

백질 (nucleocapsid, phosphoprotein, matrix protein, glycoprotein, large protein)로 이루어져 있다. 바이러스 입자표면의 돌기에 존재하는 당단백질 (glycoprotein)은 바이러스가 세포에 진입시에 세포수용체에 결합하는 부위로서 중화반응 에피톱에 해당하여 혈청형을 결정한다. 수포성구내염은 혈청학적으로 크게 뉴저지 (New Jersey)형과 인디아나 (Indiana)형으로 대별된다[16, 22]. 수포성구내염바이러스에 감염 후 5-8일이 경과하면 숙주동물 혈액에서는 특이항체가 생성되는데 이를 검출하는 방법으로는 중화시험법, 보체결합법, ELISA 등이 있다. 보체결합법은 민감도가 낮은 단점이 있고 중화시험법은 표준시험법이나 바이오안전차폐실험실에서 수행을 해야하는 번거로움이 있고 검사시간이 2-3일 소요되기 때문에 대량의 혈청을 대상으로 검사하기에는 부적합한 검사법이다. 이러한 단점을 극복하기위해서 여러 가지 방식의 ELISA가 개발되었다[1-5, 10, 13, 25, 27]. 국제수역사무국에서 발간하는 매뉴얼에 등재된 검사법은 유전자재조합 nucleocapsid를 진단항원으로 사용하는 ELISA이다. 그런데 이 검사법은 중화시험법과 상관성이 낮은 단점이 보고되었다[5]. 즉, 중화항체를 검출하는 것이 아니기 때문에 중화시험법 양성혈청을 음성으로 판정하는 경우가 발생하였다. 이를 극복하려면 중화시험법과 마찬가지로 중화항체를 검출할 수 있는 진단법의 개발이 요구되었다. 수포성구내염바이러스에 대한 중화항체는 수포성구내염바이러스의 외피단백질인 당단백질 (glycoprotein)에 의해서 형성되기 때문에 당단백질을 진단항원으로 하는 ELISA 개발이 필요하였다[2, 4]. 다만, 기존에 보고된 ELISA는 다클론항체를 이용하였기 때문에 안정적으로 일정한 품질의 진단시약 생산이 곤란하였기 때문에 [26] 본 연구에서는 당단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 적용하여 진단법을 구축하고자 하였다. 물론, 수포성구내염 인디아나형에 대한 유전자재조합 당단백질과 단일클론항체를 이용한 진단법이 보고되었으나 [13] 수포성구내염 뉴저지형이 인디아나형보다 병원성이 높아서 피해가 상대적으로 크고, 발생빈도도 높기 때문에 [16, 22] 뉴저지형에 대한 항체진단법 개발이 시급하게 요구되었다. 따라서 본 과제에서는 수포성구내염바이러스에서 추출한 당단백질과 중화단일클론항체를 사용하여 blocking 형태의 ELISA (native GP ELISA; nGP ELISA)를 개발하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

수포성구내염 뉴저지형 바이러스는 미국 농무부 수의국 (National Veterinary Service Laboratory; NVSL, Ames, Iowa)으로부터 입수하였다. 바이러스 증식과 중화시험을 위한 세포로서 BHK-21 세포주를 사용하였다. 이들 세포주는 항생제와 10% 우태아혈청을 함유한 알파엠이엠 배지로 5% 이산화탄소를 유지하는 37℃ 배양기에서 배양하였다.

2. 수포성구내염바이러스 (뉴저지형) 당단백질 추출

기존에 알려진 방법을 다소 변형하여 수포성구내염바이러스(뉴저지형)으로부터 수포성구내염 당단백질을 추출하였다. BHK-21 세포를 배양하여 0.001 MOI (multiplicity of infection) 농도로 수포성구내염바이러스 뉴저지형을 접종하였고 세포변성효과가 최대로 나타났을 때 10,000 × g로 30분 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 여기에다가 1 mM binaryethyleneimine (BEI) 37℃에서 24시간 반응하여 수포성구내염바이러스를 완전히 불활화한 후에 10 mM 치오황산나트륨을 첨가하여 37℃에서 1시간동안 반응하여 BEI를 약독화시켰다. 이 상층액을 7.5% polyethyleneglycol 8000을 넣고 4℃에서 16시간동안 농축하였다. 이후에 10,000g × 30분 원심분리하여 펠렛을 회수하여 TEN 완충용액(50mM Tris, 1mM EDTA, 1M NaCl, pH7.8)에 현탁시킨 다음에 insoluble 부분은 3,500 × g에서 20분간 원심분리하여 제거하고 상층액만을 회수하였다. 이 상층액에 0.03 M octyl beta-D-glucopyranoside를 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시켜서 바이러스 입자에서 당단백질만을 용출하였다. 수포성구내염바이러스 뉴저지형의 다른 단백질을 제거하기 위하여 85,000 × g 에서 2시간동안 초고속원심분리를 통하여 당단백질만을 함유하는 상층액을 확보하였다. 이 상층액은 다시 TEN 완충용액을 사용하여 투석하였고 이렇게 확보한 상층액은 소량씩 분주하여 -40℃에 보관하였다. 이 상층액의 농도는 BCA protein assay 키트를 사용하여 측정하였다.

단백질 발현여부를 확인하기 위하여 단백질 샘플을 Xcell SureLock mini-cell 장치(Invitrogen)를 이용하여 NuPAGE Novex Bis-Tris gels에서 사용자 매뉴얼에 따라서 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질들을 nitrocellulose membrane에 전이하였고 샘플희석용액 [Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) & 5% skim milk] 으로 실온에서 1시간동안 블록킹한 후에 단일클론항체를 샘플희석용액으로 1 ㎍/㎖ 되도록 희석하여 첨가한 후에 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 세척액 (Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20) 으로 3회세척 후에 alkaline phosphatase가 결합된 염소 항마우스 항체를 샘플희석용액으로 2 ng/㎖ 농도로 희석하여 첨가하였다. 실온에서 1시간동안 반응시킨 후에 세척액으로 5회 세척하였고, 발색은 BCIP/NBT 용액으로 실시하였다.

3. 단일클론항체

기존에 알려진 방법을 다소 변형하여 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마를 제작하였다. 수포성구내염 뉴저지형 바이러스에서 추출한 당단백질 100㎍을 incomplete Freund's adjuvant에 혼합하여 발브씨 마우스에 2주 간격으로 2회 footpad로 접종하였다. 면역한 마우스의 lymphocyte와 SP2/O 세포를 융합하였고 당단백질에 대한 단일클론항체 여부는 indirect ELISA와 형광항체법으로 스크리닝하였다. 여기서 선발한 단일클론항체는 중화시험법으로 바이러스 중화역가 보유여부를 통하여 다시 분류하였다. 중화역가를 나타내는 단일클론항체 중에서 항혈청내 항체와의 경쟁반응성을 통하여 본 과제의 native GP ELISA에 사용할 최종 단일클론항체를 선정하였다. Pristane으로 미리 면역한 마우스에 최종선발한 단일클론항체를 분비하는 하이브리도마를 접종하여 복강액을 회수하였고 IgG 정제키트를 사용하여 정제한 후에 BCA protein assay 키트로 단일클론항체를 정량하였다.

4. 혈청

본 과제의 nGP ELISA 검출한계를 측정하기위하여 하나의 소혈청과 두

개의 돼지혈청을 사용하였는데 소 혈청은 미국 NVSL에서 구입하였고 돼지 혈청은 BEI로 불활화한 수포성구내염바이러스(뉴저지형)를 IMS 1313 adjuvant에 동량으로 혼합하여 3ml씩 2주 간격으로 2회 접종하였고 접종 후 20일째 혈청을 채취하였다.

nGP ELISA의 특이도를 평가하기위한 음성혈청은 국내사육중인 소, 돼지, 말로부터 확보하였고 소 혈청 1,040점, 돼지 혈청 1,120점, 말 혈청 845점이다.

수포성구내염 유사질병에 대한 혈청으로서 구제역 양성대조혈청은 구제역 O형, Asia1형, A형 LPB ELISA 키트에 포함된 강양성혈청을 사용하였고 돼지수포병 양성대조혈청은 국제표준혈청인 RS2 혈청(강양성혈청)을 적용하였다.

수포성구내염(뉴저지형) 중화시험법 양성혈청 19점은 모두 말 유래 혈청이며 대부분 바이러스 중화역가가 높은 혈청들로 구성되었다. 미국 NVSL에서 입수하였으며 각 혈청에 대한 중화시험법과 nucleocapsid ELISA (NC ELISA) 결과는 미국 NVSL에서 제공해주었다.

수포성구내염 중화시험법 혈청패널 20점은 소, 말, 돼지에서 유래한 혈청으로서 바이러스 중화역가가 다양한 혈청들을 포함하고 있으며 미국 NVSL에서 입수하였고 각 혈청에 대한 중화시험법과 NC ELISA 결과는 미국 NVSL에서 제공해 주었다.

5. 추출 당단백질을 이용한 ELISA

- 수포성구내염 뉴저지형 바이러스에서 추출한 당단백질을 1 ㎍/㎖ 농도로 마이크로플레이트에 well 당 50 ㎕씩 분주한 후 4℃에서 하룻밤(16시간) 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액(인산완충용액에 0.05% Tween 20 포함)으로 3회 세척하였다.
- 희석용 완충액(5% 스킴밀크를 포함한 세척액)을 상기 plate에 well 당 40 ㎕씩 분주한 후 검사혈청을 각각의 well에 10㎕를 분주한 다음에 37℃에서 1시간동안 약한 속도로 shaking하면서 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액으로 3회 세척하였다.

- 단일클론항체를 희석용 완충액으로 30 ng/㎖ 농도로 희석후 상기 plate에 well 당 50 ㎕씩 분주한 후 37℃에서 1시간동안 약한 속도로 shaking하면서 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액으로 3회 세척하였다.
- HRP 결합 항마우스 염소항체를 160 ng/㎖ 농도로 희석한 다음에 상기 plate에 well 당 50㎕씩 분주한 후 37℃에서 1시간동안 약한 속도로 shaking하면서 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액으로 3회 세척하였다.
- 발색제로서 0.6 ㎎/㎖ O-phenylenedianime을 0.0015% hydrogen peroxide와 혼합한 후에 함께 넣고서 상기 plate에 well 당 50㎕씩 분주한 다음에 실온에서 약 15분간 발색하였고 1.25M 황산용액 50㎕ 첨가하여 발색을 정지시켰다. 흡광도(Optical density)는 492 nm 파장에서 측정하였다.
- 아래 공식으로 구한 반응저해도(percentage inhibition; PI)로 결과를 판정하였다.

PI = 100 × [(대조웰 흡광도 - 검사혈청 흡광도) / 대조웰 흡광도]

※ 이때 대조웰 흡광도는 혈청없이 단일클론항체만 포함한 웰의 흡광도이다.

▶ 양성판정기준 : PI 40 이상

▶ 음성판정기준 : PI 40 미만

6. 중화시험법

중화시험법은 국제수역사무국(OIE)의 manual of standards for diagnostic tests and vaccines에 따라서 실시하였다. 즉, 검사혈청를 단계희석하여 1,000 $TCID_{50}$/ml 수포성구내염 뉴저지형 바이러스과 1시간 반응시킨 후에5×10^4 BHK-21 세포주를 첨가하여 2-3일후에 현미경으로 관찰하여 50% CPE 나는 최종혈청희석배수의 역수를 중화역가로 산출하였다. 중화역가 32배 이상인 혈청을 중화시험법 양성으로 판정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 당단백질 추출

수포성구내염바이러스가 세포에 진입할 때 세포막수용체에 결합하는데 이때 관여하는 단백질이 당단백질이기 때문에 수포성구내염바이러스의 생활사에서 아주 중요한 역할을 담당한다[9, 16, 21, 23]. 바이러스 외부로 노출된 부위가 유일하게 당단백질이기 때문에 따라서 바이러스 중화와 관련된 에피톱은 당단백질에 밀집되어있다[12]. 따라서 수포성구내염 뉴저지형 바이러스의 당단백질을 추출하여 이를 진단항원으로 이용하였다.

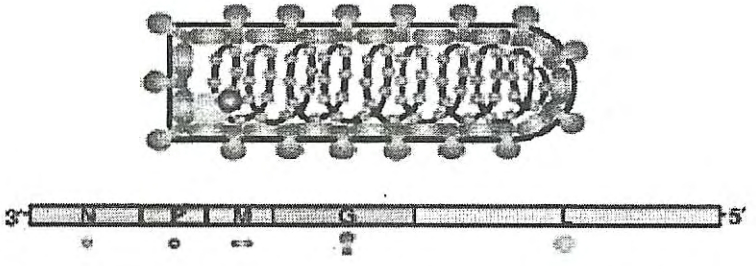


그림 1. 수포성구내염바이러스 구조 및 구성 단백질
(출처: Brian D. Lichty et al, Trends in Molecular Medicine, 2004)

2. 수포성구내염바이러스 뉴저지형 단일클론항체 제작

추출한 당단백질을 마우스에 접종하여 추출 당단백질을 진단항원으로 하는 Indirect ELISA로 1차 스크리닝하였고 이후에 그림 2와 같이 형광항체법(그림2)을 통하여 최종 단일클론항체를 선발하였다.

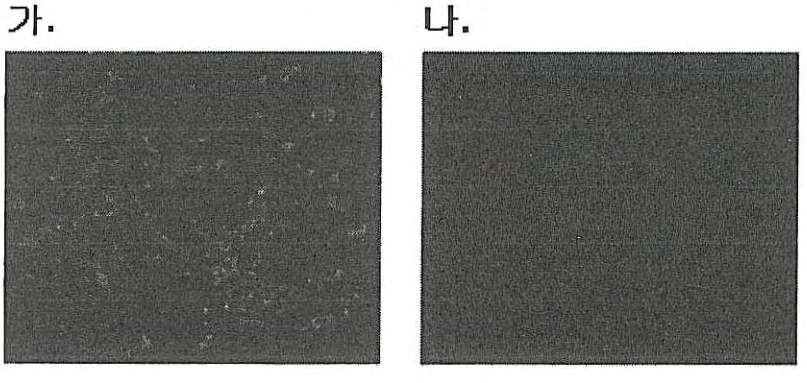


그림 2. 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 감염세포
(가)와 비감염세포 (나)에서의 단클론항체 (1G11) 반응성 비교

추출 당단백질을 접종하여 얻은 단일클론항체들의 특성을 분석하여 아래 표 1에 나타내었다.

표 1. 수포성구내염 뉴저지형 당단백질에 결합하는 단일클론항체들의 특성비교

단일클론항체	Isotype	웨스턴블롯팅	중화역가 (1 ㎍/㎖)
1G11	IgG2b	×	32
A186	IgG2a	○	64
A13	IgG1	○	<16
B18	IgG1	○	32
B24	IgG1	○	128
A38	IgG1	○	512
B41	IgG1	×	90

수포성구내염 항혈청을 적용한 blocking ELISA에서 검출한계농도가 가장 낮은결과를 나타낸 1G11을 최적의 진단용 단일클론항체로서 선발하였다 (data not shown). 또한, 다양한 축종의 혈청들과의 경쟁반응성을 평가하였을 때 1G11이 가장 우수한 반응성을 나타내었기 때문에 이 단일클론항체를 최종적으로 진단항체로서선정하였다. 특히 주목할만한 사실은 다른 단일클론항체가 바이러스중화역가가 1G11보다 높았음에도 불구하고 검사혈청 항체와의 경쟁반응성에서는 1G11이 가장 우수하였다. 이는 검사항체로서의 유효성과 바이러스중화역가와의 상관성이 반드시 일치하는 것은 아님을 보여준다. 다른 단일클론항체들은 축종별로 반응성의 차이를 나타내는 반면에 1G11은 축종에 상관없이 일정한 반응성을 나타내었다. 향후에는 1G11이 결합하는 당단백질의 에피톱 부위를 분석하여 기존에 알려진 에피톱[11, 14, 19] 과 비교하는 일은 향후에 흥미로운 주제가 될 것이다. 다만, 웨스턴블롯팅에서 반응성이 없는 것으로 보아 당단백질의 입체적 에피톱에 결합하는 것으로 추측되었다.

3. 추출 당단백질과 단일클론항체를 이용한 항체진단법 (nGP ELISA) 구축

사실, 뉴클레오캡시드(NC)를 이용한 NC ELISA는 수포성구내염 백신 접종축과 감염축간의 감별을 목적으로 개발된 것이나 현재 수포성구내염 백신이 개발되지 않은상황에서는 그 유용성이 크지 않다. 더군다나 중화시험법과의 낮은 상관성 때문에 양성혈청을 음성으로 판정하는 문제가 대두되었고 이를 해결하고자 중화시험법과 동일한 에피톱을 이용한 ELISA를 개발하고자 하였다. 우선, nGP ELISA 구축을 위한 진단시약별 최적반응조건을 설정하였다. 그 결과, 추출 당단백질은 1 ㎍/㎖, 단일클론항체는 30 ng/㎖이었다. 또한, 불활화한 수포성구내염 뉴저지형 바이러스를 접종하여 얻은 토끼혈청을 음성혈청으로 단계희석하고 이를 중화시험법과 비교한 결과, 32배의 중화역가혈청을 정확하게 양성으로 판정하기 위한 혈청희석배수는 5배가 최적조건이었다.

4. 추출 당단백질을 이용한 nGP ELISA 검출한계 측정

최적조건을 설정한 후에 nGP ELISA의 검출한계를 측정하기위하여 소 감염혈청 1점과 불활화바이러스를 접종한 돼지혈청 2점을 적용하였다. 상기 혈청들을 음성혈청으로 단계희석한 후에 중화시험법과 nGP ELISA를 동시에 실시한 결과, 모든 혈청에서 중화시험법과 nGP ELISA의 양성판정기준에 해당하는 혈청이 동일하였다 (그림 3). 즉, 소 감염혈청에서는 64배, 돼지혈청에서는 400배 희석혈청까지 두 가지 시험법이 동일하게 양성으로 판정하였다. 즉, 중화시험법 판정기준 32배와 nGP ELISA의 판정기준 40% inhibition이 대등함을 보여주었다. 향후에는 보다 많은 혈청에 대한 평가가 이루어져야 하겠지만 중화시험법을 대체할 수 있는 진단법으로서의 가능성을 제시해주었다. 중화시험법과 마찬가지로 당단백질을 타겟으로 하기 때문에 동일한 결과를 나타낸 것으로 보여진다. 물론 중화시험법이 단일클론항체를 이용하는 nGP ELISA보다 많은 에피톱이 관여하겠지만 굳이 검사혈청이 해당 에피톱에 결합하지 않더라도 인근 에피톱에 결합한 항체로 인하여 당단백질이 구조변화를 일으키면 결과적으로 1G11

에피톱이 영향을 받아서 경쟁반응성이 발생하기도 하기 때문에[24] 중화시험법과 대등한 결과를 나타낸 것으로 보인다.

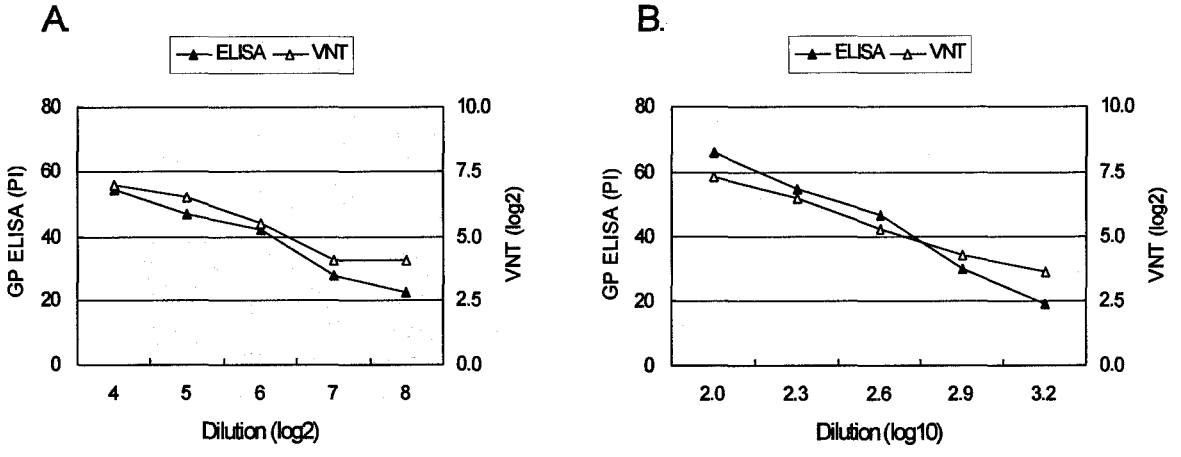


그림 3. 추출 당단백질 이용한 항체진단법 (nGP ELISA)의 검출한계 측정.

5. 추출 당단백질을 이용한 nGP ELISA 특이도 평가

수포성구내염 비발생지역인 국내에서 사육중인 소, 돼지, 말을 대상으로 nGP ELISA의 유효성을 평가한 결과 (표 2), 아래 그림 4에서 보는 바와 같이 nGP ELISA 반응저해도(Percentage inhibition: PI) 평균치는 8이고, 표준편차가 9.8이었기 때문에 양음성 판정기준(cutoff)을 PI 평균값 + 3 × 표준편차를 감안하여 신뢰도 99%구간에서 PI 37.%가 산출되었고, 축종에 상관없이 충분한 특이도를 확보하기 위하여 cutoff PI를 40%로 설정하였다.

표 2. 국내사육 가축혈청에 대한 nGP ELISA 특이도 평가

축종	혈청수	양성판정	음성판정	특이도(%)
소	1,040	4	1,036	99.6
돼지	1,120	7	1,113	99.4
말	845	1	844	99.9
총계	3,005	12	2,993	99.6

이를 기준으로 했을 때, 총 3,005두 중에서 12두에서만 비특이 양성반응을 보여 99.6% 특이도를 나타내었다 (표 2, 그림 4). 특히, 세 가지 축종에서 모두 99%이상의 특이도를 나타내었기 때문에 수포성구내염의 광범위한 숙주영역에 대해서도 적용가능성을 시사하였다.

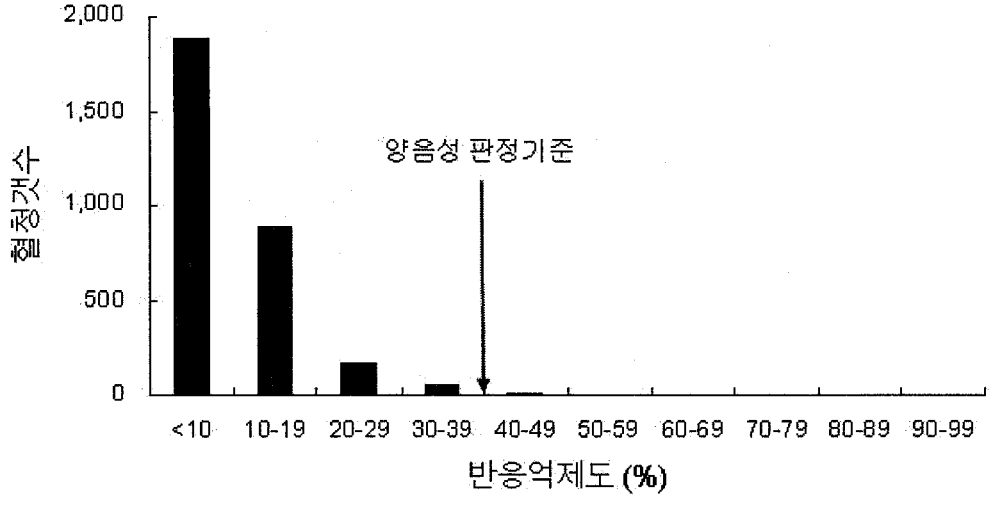


그림 4. 국내 사육 음성혈청에 대한 nGP ELISA 특이도 결과의 PI 분포도

6. 중화시험법 양성혈청에 대한 nGP ELISA 민감도 평가

실험감염혈청이 없어서 중화시험법과의 양성전위시점 (seroconversion)을 비교하지는 못하였지만 미국 NVSL에서 입수한 수포성구내염 뉴저지형 중화시험양성인 말혈청 19점을 대상으로 기존 진단법인 재조합 뉴클로오캡시드 단백질을 사용한 ELISA(NC ELISA)와 국내개발의 nGP ELISA 간의 민감도를 비교하였다. 이 혈청패널에서는 19개의 혈청중 14개의 혈청이 중화역가 512배이상으로서 매우 높은 역가의 중화시험법 양성혈청들이었다. 그 결과, NC ELISA에서는 총 19개중 5개의 혈청 음성으로 판정한 반면에 GP ELISA는 중화시험법과 마찬가지로 19점 모두 정확하게 양성으로 판정하였다. 즉, nGP ELISA는 중화역가 64배이상인 혈청을 양성으로 판정할 수 있었고 이는 앞서서 언급하였던 검출한계에 있어서의 중화역가 32배인 결과와도 부합하는 것이다. 이는 NC ELISA는 중화항체가 아닌 순수하게 NC 단백질에 대한 항체를 검출하는 것이고 중화시험법은

당단백질에 의한 중화항체를 검사하기 때문에 상관성이 낮다는 기존의 기존의 보고와도 일치하는 결과이다[1, 10]. 따라서 nGP ELISA와 중화시험법은 모두가 당단백질에 의해서 유도되는 바이러스 중화항체를 인식하기 때문에 동일한 결과를 나타낸 것으로 보인다.

표 3. 수포성구내염 뉴저지형 중화시험법 양성혈청에 대한 진단법 비교평가

혈청	중화시험법 (역가)	NC ELISA[1] (PI, %)	nGP ELISA[2] (PI, %)
1	128	36	57 ± 0.9
2	>512	49	94 ± 1.6
3	>512	64	83 ± 1.5
4	>512	56	90 ± 0.4
5	>512	57	94 ± 1.7
6	>512	64	94 ± 1.3
7	>512	63	82 ± 1.2
8	256	67	79 ± 3.2
9	>512	52	74 ± 0.8
10	>512	63	87 ± 2.8
11	64	44	69 ± 2.7
12	>512	76	78 ± 0.6
13	128	44	80 ± 0.2
14	>512	59	93 ± 2.5
15	>512	70	89 ± 1.5
16	>512	80	88 ± 0.1
17	>512	76	88 ± 0.3
18	256	34	63 ± 3.0
19	>512	76	68 ± 18.2

[1] NC ELISA는 미국 NVSL 결과이며 양음성판정기준이 50%이다. 회색표시는 양성판정 결과를 나타냄.

[2] nGP ELISA는 본 과제의 결과이며 양음성판정기준이 40%이다.

7. 다양한 중화역가의 수포성구내염 표준혈청패널에 nGP ELISA 유효성 평가

상기 표 3 혈청들은 중화역가가 매우 높은 혈청들로 구성되어있는 관계로 정확한 민감도 평가가 곤란하였다. 따라서 중화역가가 양음성판정기준 수준 (OIE 매뉴얼에서는 32배로 규정하고 있음)의 혈청들(미국 NVSL에서 입수한 수포성구내염 중화시험법 표준패널혈청로서 말, 소, 돼지혈청으로 구성되었으며 중화역가 16부터 128배까지 분포되어 있으며 뉴저지형 양성혈청 6개와 인디아나형 양성혈청 6개로 이루어짐)을 확보하였고 이들 혈청을 대상으로 평가한 결과, 아래 표 4에서 보듯이 뉴저지형에서는 총 6두의 양성혈청중 5두에서 양성판정을 하였고 1두 (12번 혈청)는 음성이었으나 판정기준인 PI 40%에 약간 못 미치는 수준이었다. 그러나 상기 표 3에서의 11번 혈청과 아래 표 4에서의 4번과 13번 혈청은 중화역가가 마찬가지로 64배였으나 nGP ELISA가 정확하게 양성으로 판정하였다. 또한, 바이러스 중화역가 32배인 표 4의 16번 혈청도 양성으로 판정하였기 때문에 표 4의 12번 혈청에서 음성결과가 나온 것은 개체차이로 보여진다. 여기서 특기할 만한 사항은 표 4의 6번 혈청은 중화역가가 16배였고 이를 nGP ELISA는 음성으로 판정하였다. 앞서서 기술한 바와 같이 nGP ELISA cutoff는 중화시험법 32배에 해당하였다. 중화시험법과 정확하게 일치하는 결과이다. 반면에 또다른 혈청형인 수포성구내염 인디아나형 6개의 양성혈청들과는 반응성이 전혀 없었기 때문에 혈청형 특이적인 진단법임을 확인하였다. 뉴클레오캡시드 단백질은 인디아나형과 뉴저지형간의 아미노산 상동성이 69%이기 때문에 NC ELISA를 사용해서는 혈청형간 감별이 곤란한 반면에 수포성구내염 당단백질은 두가지 혈청형간의 아미노산 서열이 50% 동일하기 때문에 상대적으로 혈청형간 감별이 가능하다. 물론, 50%의 상동성으로 인한 혈청형간의 교차반응성도 우려하였으나 본 실험에서는 인디아나형 바이러스 중화역가 128배까지의 혈청에서는 교차반응성이 나타나지 않았다. 아마도 단일클론항체 사용에 기인한 것으로 추정한다. 추후에는 보다 높은 바이러스 중화역가의 인디아나형 혈청들에 대해서도 평가가 이루어져야 할 것이다. 수포성구내염과 유사한 질병으로서 구제역 양성혈청(LPB ELISA 키트내 포함된 O형, A형,

Asia1형 양성혈청)과 돼지수포병 국제표준양성혈청(RS2)을 적용한 결과, 6% ± 1.7%, 4% ± 3.0%, 8% ± 2.1% 그리고 8% ± 2.1%로서 국내 음성 혈청에서 나타난 반응저해도 수치와 유사하였기 때문에 유사질병과의 교차 반응이 없음을 확인하였다. 남미에서는 구제역과 수포성구내염이 동시에 발생하기 때문에 이 지역에서의 본 진단법의 유용성은 클 것이다. 요약하자면, 수포성구내염 당단백질과 단일클론항체를 이용하여 개발한 nGP ELISA는 기존의 표준진단법인 중화시험법을 대체할 수 있는 진단법으로서 학계에는 최초로 보고하는 것이다.

표 4. 수포성구내염 중화역가별 표준혈청패널에 대한 nGP ELISA 검사결과

혈청	중화시험법[1] (인디아나형)	중화시험법[1] (뉴저지형)	nGP ELISA[2] (PI, %)
1	<8	<8	11 ± 13.8
2	<8	<8	1 ± 2.7
3	<8	<8	1 ± 0.7
4	<8	64	56 ± 2.8
5	64	<8	5 ± 3.0
6	<8	16	18 ± 3.6
7	32	<8	5 ± 3.9
8	16	<8	7 ± 4.1
9	64	<8	4 ± 4.4
10	32	<8	3 ± 1.5
11	<8	128	83 ± 4.4
12	<8	64	32 ± 9.4
13	<8	64	73 ± 1.9
14	128	<8	2 ± 2.3
15	64	<8	1 ± 1.3
16	<8	32	48 ± 3.1
17	<8	<8	3 ± 3.4
18	<8	128	41 ± 6.0
19	<8	<8	1 ± 1.5
20	<8	<8	2 ± 2.4

[1] 미국 NVSL에서 제공한 결과이며 양음성판정기준이 32다. 회색표시는 양성 판정 결과를 나타냄.

[2] 양음성판정기준이 40%이며 3회반복실험결과를 평균수치 ± 표준오차로 표시한 것임.

Ⅳ. 종합결과

수포성구내염 혈청검사를 위한 표준진단법은 중화시험법이나 생바이러스를 취급해야 하는 관계로 차폐실험실을 사용해야하고 2-3일의 반응시간이 소요되는 단점이 있어서 대량의 혈청을 검사하기에는 부적합하였다. 이를 대체하기위하여 재조합뉴클레오캡시드 단백질을 진단항원으로 사용한 진단법(NC ELISA)이 OIE 매뉴얼에 권장진단법으로 사용되어지는데 중화시험과의 상관성이 낮아서 중화시험에서 양성인 혈청이 음성이 나올 수 있는 개연성이 있다. 따라서 본 사업을 통하여 수포성구내염바이러스 중화에피톱을 보유한 당단백질을 진단항원으로 사용함으로써 중화시험법을 대체할 수 있는 신규 진단법을 개발하고자 하였다. 특히, 수포성구내염은 감수성 동물의 수가 매우 많기 때문에 경쟁방식의 진단법을 개발함으로써 축종에 상관없이 동일한 방식으로 검사할 수 있는 체계가 요구되었다. 이를 위해서는 진단항체로서 단클론항체 제작이 필수적이었고 당단백질을 마우스에 접종하여 7종의 단클론항체를 개발하였다. 당단백질과 불활화바이러스를 접종하여 제작한 항혈청을 사용하여 검출한계를 측정한 결과, 1G11이 최적의 항체로 선발되었다. 최종 선발된 1G11은 웨스턴블롯에서 당단백질에 결합하지 않았기 때문에 선형에피톱이 아닌 입체적 에피톱을 인식하는 것으로 추정되었다. 추출 당단백질과 중화단클론항체 1G11을 이용하여 경쟁방식의 ELISA를 구축하였고 검출한계를 측정해보니, 반응저해도 40%를 기준으로 했을때, 중화시험법 판정기준인 32배에 해당하였다. 실제로 수포성구내염 표준연구실인 미국 농무부 NVSL에서 구입한 수포성구내염 표준혈청을 적용해 본 결과, 정확하게 32배는 양성으로 16배는 음성으로 판정하였기 때문에 대량의 혈청검사시에 표준진단법인 중화시험법을 대체할 수 있는 신규진단법으로서의 유효성을 확인하였다. 국내에서 사육하는 수포성소, 돼지, 말 혈청을 검사하였을 때 99.6% 특이도를 나타내었다. 축종별로 차이가 없어서 모든 축종에 대해서도 검사가 가능할 것으로 추정된다. 기존 진단법인 NC ELISA가 중화시험법 양성혈청 19점중 5점을 음성으로 판정한 반면에 nGP ELISA는 19점 모두를 양성으로 정확하게 판정하였다. 이상의 결과로 미루어보아 본 과제에서 개발한 nGP ELISA는 기존의 표준진단법인 중화시험법을 대체할 수 있는 새로운 진단법으로서의 가능성을 제시해주었다.

Ⅴ. 적　　요

1. 수포성구내염바이러스로부터 당단백질을 추출하여 진단항원으로 사용하였다.

2. 바이러스 유래 당단백질을 접종하여 수포성구내염바이러스에 중화역가를 나타내는 단일클론항체 제작하였고 이중 수포성구내염 표준혈청과 경쟁반응성이 가장 우수한 단일클론항체를 선발하였다.

3. 추출한 당단백질과 중화단일클론항체를 이용한 ELISA 제조건을 설정하였다.

4. 바이러스 중화시험 32배를 양성으로 판정하는 조건에서 반응억제도 40%를 양음성판정기준으로 국내에서 사육중인 소, 돼지, 말 혈청을 검사한 결과, 99.7% 특이도를 나타내었다.

5. 수포성구내염 양성혈청패널에서 뉴저지형 양성혈청을 정확하게 양성판정하였고, 인디아나형 양성혈청은 음성으로 판정하여 혈청형 특이 항체진단법으로서의 유효성을 확인하였다.

6. 수포성구내염과 임상증상이 유사한 구제역과 돼지수포병 양성혈청에 대해서도 음성판정하였기 때문에 유사질병과의 감별진단법으로서의 활용가능성을 제시하였다.

Ⅵ. 인용문헌

1. Afshar, A., G. C. Dulac, P. F. Wright, and D. Martin. 1993. Application of indirect ELISA for detection of bovine antibodies against vesicular stomatitis viruses. J. Vet. Diagn. Invest. 5:26-32.
2. Afshar, A., N. H. Shakarchi, and G. C. Dulac.1993. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine, ovine, porcine, and equine antibodies to vesicular stomatitis virus. J. Clin. Microbiol. 31:1860-1865.
3. Ahmad, S., M. Bassiri, A. K. Banerjee, and T. Yilma.1993. Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. Virology 192:207-216.
4. Allende, R., L. Sepulveda, A. Mendes da Silva, M. Martins, M. S. Sondahl, and A. Alonso. 1992. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. Prev. Vet. Med. 14:293-301.
5. Alvarado, J. F., G. Dolz, M. V. Herrero, B. McCluskey, and M. Salman. 2002. Comparison of the serum neutralization test and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to vesicular stomatitis virus New Jersey and vesicular stomatitis virus Indiana. J. Vet. Diagn. Invest. 14:240-242.
6. Coil, D. A., and A. D. Miller.2004. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. J. Virol. 78:10920-10926.
7. Coyle, P. V., D. Wyatt, C. McCaughey, and H. J. O'Neill.1992. A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. J. Immunol. Methods 153:81-84.

8. Ferris, N. P., and A. I. Donaldson.1988. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. Vet. Microbiol. 18:243-258.
9. Gallione, C. J., and J. K. Rose.1983. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus. J. Virol. 46:162-169.
10. Katz, J. B., A. L. Shafer, and K. A. Eernisse.1995. Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. J. Virol.Methods 54:145-157.
11. Keil, W., and R. R. Wagner.1989. Epitope mapping by deletion mutants and chimeras of two vesicular stomatitis virus glycoprotein genes expressed by a vaccinia virus vector. Virology 170:392-407.
12. Kelley, J. M., S. U. Emerson, and R. R. Wagner.1972. The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody. J. Virol. 10:1231-1235.
13. Kweon, C. H., B. J. Kwon, I. J. Kim, S. Y. Lee, and Y. J. Ko. 2005. Development of monoclonal antibody-linked ELISA for sero-diagnosis of vesicular stomatitis virus (VSV-IN) using baculovirus expressed glycoprotein. J. Virol. Methods 130:7-14.
14. Lefrancois, L., and D. S. Lyles. 1983. Antigenic determinants of vesicular stomatitis virus: analysis with antigenic variants. J. Immunol. 130:394-398.
15. Letchworth, G. J., L. L. Rodriguez, and J. Del cbarrera. 1999. Vesicular stomatitis. Vet. J. 157:239-260.
16. Martinez, I., J. C. Barrera, L. L. Rodriguez, and G. W. Wertz.2004. Recombinant vesicular stomatitis (Indiana) virus expressing New Jersey and Indiana glycoproteins induces neutralizing antibodies to each serotype in swine, a natural host. Vaccine 22:4035-4043.

17. Martinez, I., and G. W. Wertz. 2005. Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity. J. Virol. 79:3578-3585.
18. Miller, D. K., B. I. Feuer, R. Vanderoef, and J. Lenard. 1980. Reconstituted G protein-lipid vesicles from vesicular stomatitis virus and their inhibition of VSV infection. J. Cell Biol. 84:421-429.
19. Nagata, S., Y. Okamoto, T. Inoue, Y. Ueno, T. Kurata, and J. Chiba. 1992. Identification of epitopes associated with different biological activities on the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by use of monoclonal antibodies. Arch. Virol. 127:153-168.
20. Rainwater-Lovett, K., S. J. Pauszek, W. N. Kelley, and L. L. Rodriguez. 2007. Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004-2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains. J. Gen. Virol. 88:2042-2051.
21. Roche, S., A. A. Albertini, J. Lepault, S. Bressanelli, and Y. Gaudin. 2008. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. Cell Mol. Life Sci. 65:1716-1728.
22. Rodriguez, L. L.2002. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. Virus Res. 85:211-219.
23. Schlegel, R., and M. Wade.1985. Biologically active peptides of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. J. Virol. 53:319-323.
24. Sugiyama, M., R. Yoshiki, Y. Tatsuno, S. Hiraga, O. Itoh, K. Gamoh, and N. Minamoto. 1997. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:727-730.

25. Vernon, S. D., and P. A. Webb.1985. Recent vesicular stomatitis virus infection detected by immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin.Microbiol. 22:582-586.

26. Yang, M., A. Clavijo, R. Suarez-Banmann, and R. Avalo.2007. Production and characterization of two serotype independent monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. Vet. Immunol.Immunopathol. 115:126-134.

27. Zhou, E. M., J. Riva, and A. Clavijo.2001. Development of an immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine and swine IgM antibodies to vesicular stomatitis virus. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:475-481.

제2장. 유전자재조합 당단백질을 이용한 항체진단법 개발

Ⅰ. 서 언

수포성구내염은 주로 말과 소 등에 발생하는 수포성질병으로서 아메리카대륙에 한정되어 발생하고 있다[1, 2]. 수포성구내염 임상증상은 입과 제관부, 유두에 수포가 형성되면 말에서 감염되는 것만 제외하면 구제역이나 돼지수포병과 임상적으로 구분이 불가능하다. 병원체는 수포성구내염바이러스이고 11Kb (-) 극성의 단일가닥 RNA를 함유하고 있다. 이 바이러스를 구성하는 단백질은 5종이며 대표적인 단백질은 뉴클레오캡시드(nucleocapsid; NC)와 당단백질(glycoprotein; GP)이다[3]. 두가지의 혈청형으로서 인디아나형과 뉴저지형으로 대별된다[1, 4, 5]. 수포성구내염은 구제역이나 돼지수포병과 임상적으로 구별이 안되기 때문에 실험실적인 정밀검사가 필요하고[6] 항원검사용 시료가 없는 상황에서는 감염 후 숙주동물에서 형성되는 항체검사를 수행해야 한다. 현재 중화시험법이 표준진단법으로 규정되어있으나 2-3일정도가 소요되고 차폐실험실에서 실시해야 하는 등 대량의 시료를 검사하기에는 어려움이 있어서 이를 극복하고자 ELISA법이 개발되어져 왔다[7-15]. 수포성구내염바이러스의 감염숙주는박쥐, 사슴, 원숭이 등의 야생동물을 비롯하여 매우 다양하기 때문에[2] 이를 진단하는 검사법은 경쟁방식의 ELISA가 바람직하다. 이전에는 NC ELISA가 개발되었으나[7] 중화시험법과의 상관성이 낮아서[11] 중화시험법과 동일한 바이러스중화항체를 검출할 수 있는 진단법으로서 수포성구내염 뉴저지형 바이러스에서 추출한 당단백질을 진단항원으로 nGP ELISA를 개발하였다[16]. 전술한 바와 같이 nGP ELISA가 중화시험법과 높은 상관성을 나타내었기 때문에 본 과제에서는 기존의 추출 당단백질을 유전자재조합 당단백질로 대체하여 진단항원 제작시에 바이러스를 취급하는 번거로움을 배제하고 사람에도 감염되는 위험성을 회피하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 바이러스 및 세포

수포성구내염 뉴저지형 바이러스는 미국 농무부 수의국(NVSL)으로부터 입수하였다. 바이러스 증식과 중화시험을 위한 세포로서 BHK-21 세포주를 사용하였다. 이들 세포주는 항생제와 10% 우태아 혈청을 함유한 알파엠이엠 배지로 5% 이산화탄소를 유지하는 37℃ 배양기에서 배양하였다. 곤충세포(Sf9)는 유전자재조합 배큘로바이러스의 증식을 위하여 사용하였고, 항생제와 10% 우태아 혈청을 함유한 그레이스 배지로 27℃ 인큐베이터에서 배양하였다.

2. 수포성구내염 당단백질 유전자를 함유하는 재조합배큘로바이러스 제작

수포성구내염 뉴저지형 바이러스를 BHK-21 세포에서 증식하여 RNeasy extraction 키트를 사용하여 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 RNA를 추출하였다. 상보적인 DNA는 AccuPower RT premix를 사용하여 제작하였고, cDNA를 주형으로 nPfu DNA polymerase를 적용하여 유전자를 증폭하였다. *BamHI*과 *XhoI* 제한효소를 부가한 프라이머를 제작하였다. Forward 유전자는 5′-GCG CGG ATC CAT GTT GTC TTA TCT AcT AAT C-3′이고 Reverse 유전자는 5‘-ATC CCT CGA GTT AAC GGA AAT GAG CCA T-3′이다. 유전자 증폭기를 사용하여 상기의 프라이머에 대한 유전자를 증폭하였고 조건은 다음과 같다. 즉, 95℃에서 2분간 변성을 시키고나서 94℃30초, 55℃ 30초, 72℃ 90초를 기본 사이클로 해서 30회 반복하였다. 마지막에는 72℃에서 10분간 연장증폭하였다. 증폭한 유전자는 *BamHI*과 *XhoI* 효소로 절단하여 pBacPAK8 전이벡터에 삽입하였다. 이렇게 제작된 전이벡터는 배큘로바이러스 유전자인 pBacPAK6 유전자와 함께 곤충세포(Sf9)에 주입하여 재조합배큘로바이러스를 제작하였다. 만들어진

바이러스는 냉장온도에서 사용 때까지 보관하였다.

3. 수포성구내염바이러스 (뉴저지형) 당단백질 발현

세포배양 플라스에서 배양한 Sf9 세포에 재조합배큘로바이러스를 접종한 후에 세 포변형이 관찰되면 세포펠렛을 수확하였다. 인산완충용액으로 3회 세척 후에 TEN 완충용액(50mM Tris, 1mM EDTA, 0.1M NaCl, pH7.8)을 세포배양액의 1/20 비율의 부피로 부유시켰다. 초음파파쇄기로 세포를 파쇄하였고 전체 세포파쇄액을 진단항원액으로 사용하였다.

단백질 발현여부를 확인하기 위하여 단백질 샘플을 Xcell SureLock mini-cell 장치 (Invitrogen)를 이용하여 NuPAGE Novex Bis-Tris gels에서 사용자 매뉴얼에 따라서 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질들을 nitrocelulse membrane에 전이하였고 샘플희석용액 **[Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBST) & 5% skim milk]** 으로 실온에서 1시간 동안 블록킹한 후에 단일클론항체(A13)를 샘플희석용액으로 1 ㎍/㎖ 되도록 희석하여 첨가한 후에 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 세척액 **(Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20)** 으로 3회세척 후에 **alkaline phosphatase**가 결합된 염소 항마우스 항체를 샘플희석용액으로 2 ng/㎖ 농도로 희석하여 첨가하였다. 실온에서 1시간동안 반응시킨 후에 세척액으로 5회 세척하였고, 발색은 **BCIP/NBT** 용액으로 실시하였다

4. 유전자재조합 당단백질의 면역원성 평가

재조합 당단백질의 면역원성을 평가하기 위하여 재조합 배큘로바이러스를 감염시킨 곤충세포 파쇄액을 14,000 x g, 20분간 원심분리한 상층액을 적용하였다.

두 마리의 돼지와 네 마리의 소에 상기 수용성 재조합당단백질을 IMS 1313와 혼합하여 0.2 mg을 근육접종하였다. 두 마리의 돼지에는 binaryethylenimine (BEI)로 불활화한 수포성구내염 뉴저지형 바이러스를 접종하였다. 모든 개체에 있어서 접종후 22일째에 추가 접종하였고 1회접종

후 22일째, 2회접종후 19, 31, 38일째 채혈하여 중화시험법으로 수포성구내염 뉴저지형 바이러스에 대한 중화역가를 측정하였다.

5. 혈청

진단법의 특이도를 평가하기위한 음성혈청은 국내사육중인 소 혈청 1,036점과 말 혈청 1,016점으로 구성하였다. 수포성구내염과 유사한 질병으로서 구제역 양성대조혈청은 구제역 O형, Asia1형, A형 LPB ELISA 키트에 포함된 강양성혈청을 사용하였고 돼지수포병 양성대조혈청은 국제표준혈청인 RS2 혈청(강양성혈청)을 적용하였다.

수포성구내염(뉴저지형) 중화시험법 양성혈청 19점은 모두 말유래 혈청이며 대부분 바이러스 중화역가가 높은 혈청들로 구성되었다. 미국 NVSL에서 입수하였으며 각 혈청에 대한 중화시험법과 NC ELISA 결과는 미국 NVSL에서 제공해주었다.

수포성구내염 중화시험법 혈청패널 20점은 소, 말, 돼지에서 유래한 혈청으로서 바이러스 중화역가가 다양한 혈청들을 포함하고 있으며 미국 NVSL에서 입수하였고 각 혈청에 대한 중화시험법과 NC ELISA 결과는 미국 NVSL에서 제공해주었다.

6. 유전자재조합 당단백질을 이용한 ELISA (rGP ELISA)

- 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 재조합 당단백질을 코팅용액에 1:200배 희석하여 마이크로플레이트에 well당 50 ㎕씩 분주한 후 4℃에서 하룻밤(16시간) 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액(인산완충용액에 0.05% Tween 20 포함)으로 3회 세척하였다.
- 희석용 완충액(5% 스킴밀크를 포함한 세척액)을 상기 plate에 well 당 40 ㎕씩 분주한 후 검사혈청을 각각의 well에 10㎕를 분주한 다음에 37℃에서 1시간동안 약한 속도로 shaking하면서 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액으로 3회 세척하였다.

- 단일클론항체를 희석용 완충액으로 2 ㎍/㎖ 농도로 희석 후 상기 plate에 well당 50 ㎕씩 분주한 후 37℃에서 1시간동안 약한 속도로 shaking하면서 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액으로 3회 세척하였다.
- HRP 결합 염소 항마우스 항체를 200 ng/㎖ 농도로 희석한 다음에 상기 plate에 well당 50㎕씩 분주 후 37℃에서 1시간동안 약한 속도로 shaking하면서 반응시켰다.
- 마이크로플레이트를 세척용 완충액으로 3회 세척하였다.
- 발색제로서 0.6 ㎎/㎖ OPD를 0.0015% hydrogen peroxide와 혼합한 후에 함께 넣고서 상기 plate에 well 당 50㎕씩 분주한 다음에 실온에서 약 15분간 발색하였고 1.25M 황산용액 50㎕ 첨가하여 발색을 정지시켰다. 흡광도(Optical density)는 492 nm 파장에서 측정하였다.
- 아래 공식으로 구한 반응저해도(percentage inhibition; PI)로 결과를 판정하였다.

PI = 100 × [(대조웰 흡광도 - 검사혈청 흡광도) / 대조웰 흡광도]

※ 이때 대조웰 흡광도는 혈청없이 단일클론항체만 포함한 웰의 흡광도이다.

▶ 양성판정기준 : PI 70 이상

▶ 음성판정기준 : PI 70 미만

7. 중화시험법

중화시험법은 국제수역사무국(OIE)의 manual of standards for diagnostic tests and vaccines에 따라서 실시하였다. 즉, 검사혈청를 단계희석하여 1,000 $TCID_{50}$/ml 수포성구내염 뉴저지형 바이러스과 1시간 반응시킨 후에5×10^4 BHK-21 세포주를 첨가하여 2-3일후에 현미경으로 관찰하여 50% 웰에서 CPE가 관찰되는 최종혈청희석배수의 역수를 중화역가로 산출하였다. 중화역가 32배 이상인 혈청을 중화시험법 양성으로 판정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 유전자재조합 당단백질 발현

곤충세포에서 발현한 당단백질은 원래 수포성구내염바이러스 당단백질이 가지는 네가지 domains (amino 말단 signal 부위, extracellular 부위, 막투과부위, carboxy 말단부위)을 모두 포함하고 있기 때문에[17-19] 막단백질로서 발현되면 세포융합현상을 나타낼 것으로 예측하였고 실제로 곤충세포에 접종한 후 3-4일이 경과하면 미감염된 곤충세포와는 달리 뚜렷한 세포융합현상(syncytium)을 나타내었다 (그림 1, 가). 수포성구내염바이러스가 산성 pH 환경(pH6.0이하)에서는 이러한 현상이 일어난다는 것은 이미 보고된 바가 있었다[18-21]. 곤충세포는 pH6의 배지에서 성장하기 때문에 재조합 당단백질이 곤충세포의 표면으로 노출되면 낮은 pH에 직면하여 원래 수포성구내염바이러스의 기전과 동일하게 세포간의 융합을 유도하게 되는 것이다. 이는 이전에 보고된 결과와도 일치하는 것이다[18]. 수포성구내염바이러스 당단백질을 포유동물유래세포에서 발현하면 amino 말단의 signal peptide가 절단된 500개의 아미노산으로 이루어진 단백질로발현되면 약 64kDa의 분자량을 나타낸다[19, 22, 23]. 그러나 수포성구내염바이러스 혹은 rabies 바이러스의 당단백질을 곤충세포에서 발현하면 원래의 크기보다 다소 작은 분자량의 당단백질이 발현되는 것으로 보고된 바 있었다[18, 24]. 저자들은 이러한 차이를 glycosylation 차이에 기인하다고 추정하였다. 즉, 곤충세포에서는 glycan complexity에 기여하는 sialyl transferase 활성이 없다는 것이다[18, 24]. 그러나 본 과제에서 발현한 곤충세포 유래의 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 당단백질은 단일크론항체(A13)을 적용하여 웨스턴블롯팅을 한 결과, 바이러스 구성 당단백질과 동일한 분자량의 밴드를 나타내었다 (그림 1, 나). 수포성구내염 인디아나형 바이러스 당단백질을 곤충세포에서 발현한 경우에서도 이번 결과와 마찬가지로 65kDa 크기의 당단백질을 나타내었다[8]. 결과적으로 glycosylation 차이가 분자량의 크기에는 영향을 미치지 않은 것으로 보인다. native 당단백질에서 glycosylation 부위를 제거하면 native 당단백질보다 작은 크기(약 52kDa)의 당단백질이 나타났다 (data not shown).

따라서 앞선 저자들이 주장한 분자량 차이를 보인 원인에 대해서는 향후에 추가연구를 통해서 분석을 해야 할 것이다.

(가) (나)

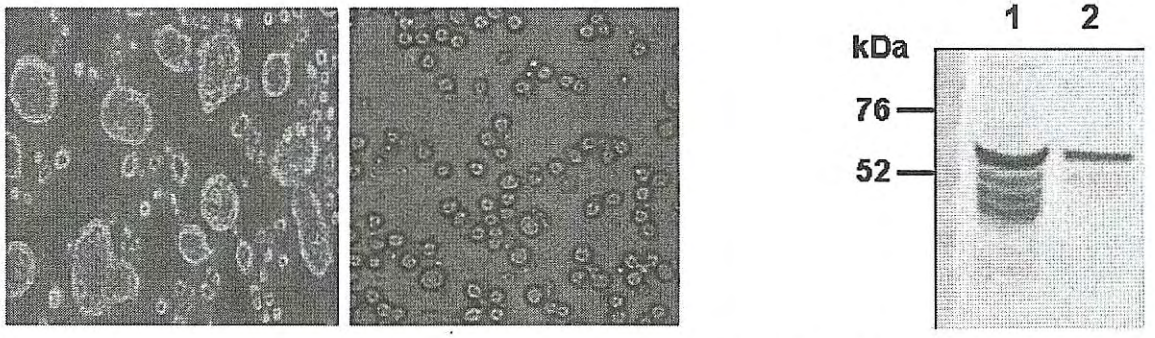


그림 1. 재조합배큘로바이러스를 접종한 세포(가, 좌측)와 정상 곤충세포(가, 우측)에서의 세포형태변화 및 추출 당단백질(나, 1)과 유전자재조합 당단백질(나, 2)을 단일클론항체 A13을 적용하여 실시한 웨스턴블롯팅 결과

2. 유전자재조합 당단백질의 면역원성 평가

수포성구내염바이러스 당단백질은 막단백질로서 표면에 노출되어있기 때문에 숙주동물에서 바이러스 중화항체를 생성한다[26, 27]. 따라서 이러한 특성 때문에 당단백질은 subunit 백신으로서의 활용가능성이 매우 크며 실제로 이를 백신개발로 이용한 몇몇 예가 보고되었다[28, 29]. 본 과제에서도 곤충세포에서 발현한 단백질에 대한 면역원성을 숙주동물에서 평가해 보았다.

우선, 수포성구내염 유전자재조합 당단백질이 포함된 곤충세포 파쇄액중 상층액을 돼지와 소에 접종하였다. 일자별로 채취한 혈청에 대해서 바이러스 중화역가를 비교한 결과, 돼지에서의 1차접종 혈청에서는 불활화바이러스 접종개체 혈청이 재조합단백질 접종개체 혈청보다 중화역가가 10배가량 높았으나 2차접종후 채취한 혈청에서는 오히려 재조합단백질을 접종한 개체 중 한 개체는 불활화바이러스 접종개체와 중화역가가 대등하였고 나머지 한 개체에서는 오히려 4배정도 높은 결과를 나타내었다. 소에서는 재조합단백질만을 접종하였으며 두 개체 (B와 D)에서는 1차접종후 22일째 혈청에서부터 9 log2배 중화역가를 나타내었고 나머지 두 개체(A와 C)에서는

10 log2의 중화역가를 나타내었다. 2차접종후에는 각각 14 log2와 16 log2 값을 나타내었으며 실험종료일까지 13 log2 이상의 높은 중화역가를 유지하였다. 이러한 결과는 이전에 보고된 면역원성 결과와도 일치하며[29] DNA 백신을 접종하여 32배수준의 바이러스 중화역가를 보인 결과보다는 훨씬 우세한 결과이다[28]. 막투과부위가 없는 soluble 상태의 rabies 당단백질을 접종했을 때에는 원래형태의 당단백질을 접종했을 때보다 15배정도의 낮은 면역원성을 나타낸다는 보고에 의하면 본 과제에서 당단백질이 높은 중화역가를 나타낸 것은 아마도 네 가지 domains를 온전하게 보유하고 있기 때문인 것으로 보여진다[30]. 다만, 2차접종후 시간이 경과함에 따라 모든 개체에서 다소의 역가 감소추이를 나타내었다.

(가) (나)

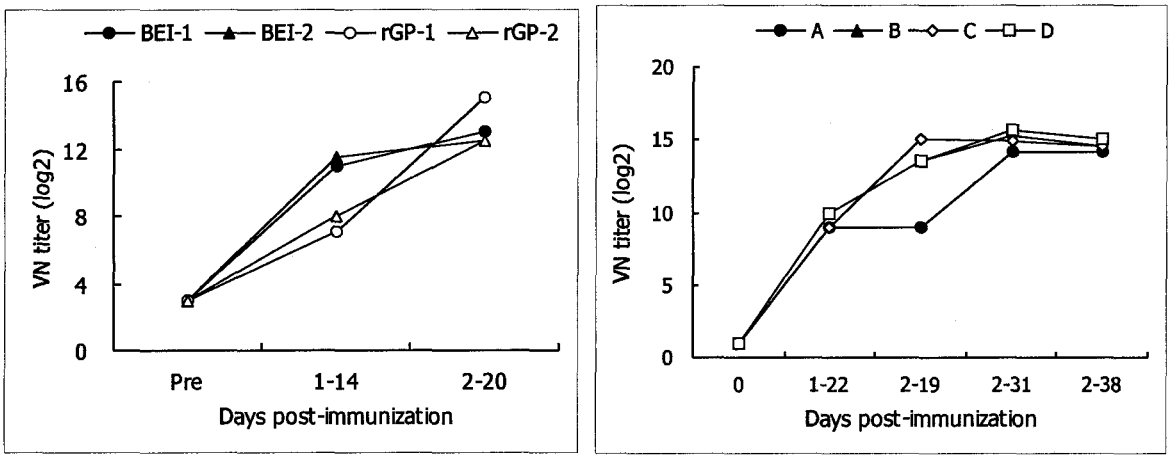


그림 2. 돼지(가)와 소(나)에서의 유전자재조합 당단백질의 면역원성 비교

3. 유전자재조합 당단백질 이용한 항체진단법 (rGP ELISA) 구축

상기 면역원으로 사용한 당단백질 상층액을 진단항원으로 rGP ELISA를 구성하였을 경우에는 cell whole lysate를 진단항원으로 사용한 것보다 반응특이도가 낮았기 때문에 (data not shown) cell whole lysate를 최종 진단항원액으로 적용하기로 하였다. 오히려 부분정제된 것이 유리할 것으로 예측하였으나 막단백질로서 막에 결합되어있는 형태가 원래의 당단백질 형태에

보다 더 근접하기 때문으로 보인다. 비슷한 예가 보고된 바도 있다. 즉, rabies virus 당단백질을 BHK-21 세포에서 발현하였고 cell whole lysate를 진단항원으로 마이크로플레이트에 코팅하여 competitive ELISA를 구성하였다[31]. 수포성구내염 바이러스 외막에 박힌 native 당단백질은 soluble 형태로 추출하였을 때에도 높은 특이도를 나타낸 반면에 본 과제에서의 유전자재조합 당단백질을 진단항원으로 사용할 경우에는 cell whole lysate를 적용해야 한다는 것은 아마도 바이러스 외막에 존재할 때의 당단백질과 곤충세포에서 발현되는 당단백질간의 구조적인 차이가 분명하게 존재할 것으로 추정가능하며 향후 이러한 구조분석을 통해서 근원적인 차이가 발생하는 요인분석을 시도해야 할 것이다.

따라서, cell whole lysate를 진단항원으로 사용하고 진단항체로서 앞서서 선발한 1G11을 사용하여 재조합당단백질을 이용한 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 항체진단법 (rGP ELISA)을 구축하였다. 우선, 개개의 진단액에 대한 최적반응조건을 설정하였다. 그 결과, 재조합 당단백질은 200배희석, 단일클론항체의 최적농도는 2 ㎍/㎖, 적정희석배수는 5배로 설정하였다. 양성판정기준은 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 중화역가 16배 혈청을 양성으로 판정하는 조건으로서 PI 60%로 설정하였다.

4. 유전자재조합 당단백질 항체진단법의 특이도 평가

수포성구내염바이러스에 노출된 적이 없는 국내에서 사육중인 소 1,036두와 말1,016두에서 채취한 혈청을 대상으로 rGP ELISA의 유효성을 평가한 결과, 소 혈청에서는 98.4%, 말 혈청에서는 99.7%의 특이도를 나타내었다. 따라서 총 2,052두 중 39두에서 비특이 양성반응을 보였기 때문에 결과적으로 99% 특이도를 나타내었다 (표 1, 그림 3). 물론 동일한 혈청을 적용하지는 않았으나 nGP ELISA의 특이도 99.6%보다는 다소 낮은 것이다. 아마도 crude cell lysate에 포함된 여러 단백질에 의한 간섭효과에 기인하는 것으로 추정된다. 다른 여러 단백질이 당단백질과 함께 마이크로플레이트에 코팅되면 검사혈청내 여러 항체와 무작위로 반응하여 steric hindrance 현상

으로 1G11이 당단백질의 특정 에피톱에 결합하는 것을 방해할 수 있을 것이다. 따라서 이러한 현상을 방지하기위하여 1G11 이외의 다른 단일클론항체를 capturing 항체로 사용하고 1G11에 HRP 혹은 biotin을 결합한 detector로 활용하는 sandwich 방식의 ELISA를 적용한다면 이종 단백질에 의한 간섭효과를 일정정도 방지할 것으로 예상하고 현재 작업 진행중에 있다. 물론 다소 비특이 현상이 발생하기는 하나 수포성구내염 인디아나형 양성혈청과는 전혀 반응성이 없었기 때문에 혈청형 특이 진단법으로서의 활용가능성이 확인되었다. 또한 수포성구내염 유사질병인 구제역이나 돼지수포병과도 감별진단이 가능하였기 때문에 구제역과 수포성구내염이 다발하는 지역인 남미에서의 효용성이 매우 클 것이다.

표1. 국내사육 소와 말 혈청을 대상으로 실시한 rGP ELISA 특이도 평가

축종	혈청갯수	양성판정갯수	음성판정갯수	특이도(%)
소	956	29	927	97.0
말	1,016	10	1,006	99
총계	1,972	39	1,933	97.4

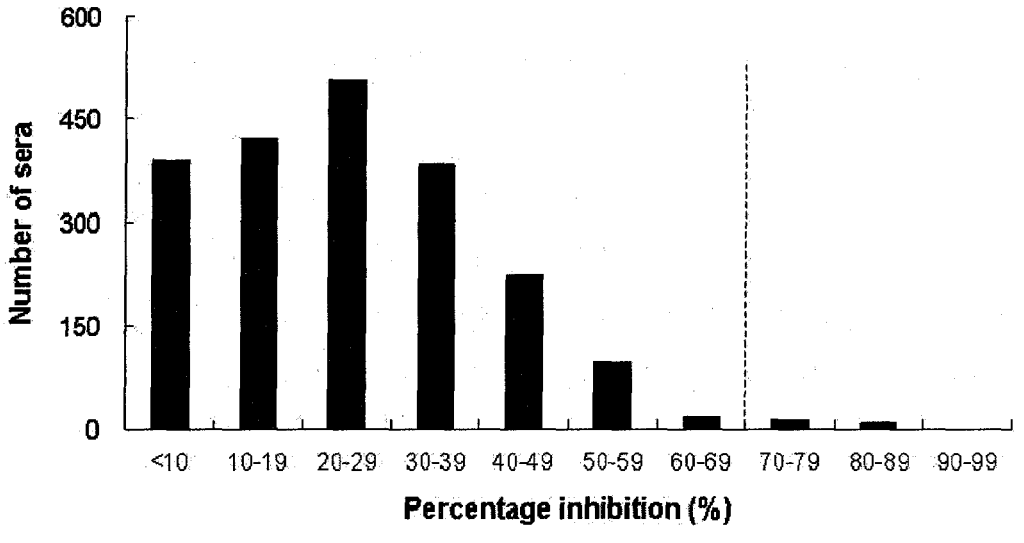


그림 3. 국내 사육 음성혈청에 대한 rGP ELISA 특이도 결과의 PI 분포도
(수직선은 PI 70%로서 rGP ELISA의 cutoff임)

5. 중화시험법 양성혈청에 대한 rGP ELISA 민감도 평가

미국 NVSL에서 입수한 수포성구내염 뉴저지형 중화시험법 양성혈청 19점에 대해서 rGP ELISA의 민감도를 평가한 결과 중화시험법 결과와 마찬가지로 전두수 양성판정하였다 (표 2).

표 2. 수포성구내염 뉴저지형 중화시험법 양성혈청에 대한 진단법 비교평가

혈청	중화시험법 (역가)	NC ELISA[1] (PI, %)	rGP ELISA[2] (PI, %)
1	128	36	78 ± 1.6
2	>512	49	89 ± 4.3
3	>512	64	92 ± 2.2
4	>512	56	87 ± 7.2
5	>512	57	88 ± 5.4
6	>512	64	90 ± 2.9
7	>512	63	86 ± 3.0
8	256	67	88 ± 2.2
9	>512	52	83 ± 4.4
10	>512	63	93 ± 2.3
11	64	44	82 ± 10.7
12	>512	76	84 ± 2.7
13	128	44	89 ± 5.3
14	>512	59	89 ± 2.6
15	>512	70	86 ± 9.7
16	>512	80	87 ± 5.1
17	>512	76	88 ± 7.2
18	256	34	74 ± 4.0
19	>512	76	88 ± 5.1

[1] 미국 NVSL에서 제공한 결과이며 양음성판정기준이 50%이다. 회색표시는 양성판정 결과를 나타냄.

[2] 양음성판정기준이 40%이며 3회반복실험결과를 평균수치 ± 표준오차로 표시한 것임.

6. 수포성구내염 표준혈청패널에 대한 rGP ELISA 진단유효성 평가

중화역가가 높은 혈청에 대해서는 전두수 양성판정하였기 때문에 중화시험법과의 정확한 진단유효성 평가를 비교하기가 곤란하였다. 따라서 cutoff 수준의 혈청들을 미국 NVSL로 부터 확보하여 이를 대상으로 평가하였다. 아래 표 3에서 보듯 총 6두의 양성혈청 모두를 정확하게 양성으로 판정하였다. 특히 12번 혈청에서는 추출 당단백질을 이용한 GP ELISA에서 음성판정한 것과는 달리, rGP ELISA에서는 양성판정을 나타내었다. 그리고 중화역가 16배인 6번 혈청은 cutoff로서 판정하였다. 결과적으로 민감도에 있어서는 중화시험법과 nGP ELISA보다 우수하였다. 또한, 인디아나 혈청형 양성혈청에서는 모두 음성으로 판정하였기 때문에 뉴저지형 특이 진단법으로서의 유효성을 확인할 수 있었다.

표 3. 수포성구내염 바이러스 중화역가별 패널혈청에 대한 검사결과

혈청	중화시험법 (인디아나형)	중화시험법 (뉴저지형)	nGP ELISA[1] (PI, %)	rGP ELISA[2] (PI, %)
1	<8	<8	11 ± 13.8	10 ± 2.1
2	<8	<8	1 ± 2.7	8 ± 1.2
3	<8	<8	1 ± 0.7	6 ± 3.8
4	<8	64	56 ± 2.8	94 ± 0.6
5	64	<8	5 ± 3.0	23 ± 8.9
6	<8	16	18 ± 3.6	68 ± 7.6
7	32	<8	5 ± 3.9	16 ± 7.5
8	16	<8	7 ± 4.1	33 ± 12.5
9	64	<8	4 ± 4.4	13 ± 6.0
10	32	<8	3 ± 1.5	10 ± 2.5
11	<8	128	83 ± 4.4	87 ± 0.6
12	<8	64	32 ± 9.4	77 ± 8.0
13	<8	64	73 ± 1.9	77 ± 1.5
14	128	<8	2 ± 2.3	10 ± 2.0
15	64	<8	1 ± 1.3	14 ± 5.1
16	<8	32	48 ± 3.1	91 ± 2.1
17	<8	<8	3 ± 3.4	5 ± 3.8
18	<8	128	41 ± 6.0	87 ± 1.5
19	<8	<8	1 ± 1.5	3 ± 3.5
20	<8	<8	2 ± 2.4	4 ± 3.8

[1] 미국 NVSL에서 제공한 결과이며 양음성판정기준이 50%이다. 회색표시는 양성판정 결과를 나타냄.

[2] 양음성판정기준이 40%이며 3회반복실험결과를 평균수치 ± 표준오차로 표시.

Ⅳ. 종합결과

수포성구내염바이러스 중화에피톱을 보유한 당단백질을 진단항원으로 사용함으로써 중화시험법을 대체할 수 있는 신규 진단법을 보고하였기 때문에 사람에게도 감염되는 바이러스를 취급하는 것보다는 일반실험실에서도 안전하게 사용할 수 있는 진단항원을 개발하고자 곤충세포에서 수포성구내염 뉴저지형 당단백질을 발현하였다. 돼지와 소에서의 면역원성을 측정해 본 결과, 돼지에서는 BEI로 불활화한 바이러스를 접종한 것과 대등한 수준의 중화항체를 나타내었고 소에서는 기존에 보고된 중화역가 이상의 결과를 나타내었기 때문에 subunit 백신으로서의 가능성을 제시하였다. 진단항원으로서는 soluble 형태보다는 cell whole lysate로서 막에 결합된 상태의 당단백질을 진단항원으로 결정하였다. 기제작한 단일클론항체 1G11을 적용하여 rGP ELISA의 제조건을 설정하였고 반응저해도 70%를 기준으로 했을 때, 바이러스 중화역가 16배까지 양성으로 판정하여 중화시험법이나 nGP ELISA보다도 우세하였다. NVSL에서 구입한 수포성구내염 중화시험법 양성혈청 19점과 다양한 중화역가를 나타내는 표준혈청패널에서도 정확하게 판정을 하였기 때문에 screening test로서의 적합성을 확인하였다. 다만, 특이도에 있어서는 99%로서 nGP ELISA보다는 특히 소에서 다소 낮은 결과를 보였다. 향후에는 두 가지 단일클론항체를 사용한 sandwich ELIA 방식을 적용하여 이러한 비특이 현상을 극복해보고자 한다. 하지만 인디아나 혈청형 양성혈청이나 수포성구내염 유사질병인 구제역과 돼지수포병 양성혈청과도 반응성이 없는 것으로 보아 그 효용성은 매우 클 것으로 판단된다.

V. 적 요

1. 수포성구내염 뉴저지형 바이러스 당단백질을 곤충세포에서 발현하였다.

2. 유전자재조합 당단백질에 대한 면역원성을 평가하고자 소와 돼지에 접종한 결과 돼지에서는 불활화한 바이러스 접종개체와 대등한 중화역가를 나타내었고 소에서는 기존에 알려진 역가이상의 면역원성을 나타내었다.

3. 재조합 당단백질과 중화단일클론항체를 이용하여 rGP ELISA를 확립하였고 이에 따른 반응 제조건을 설정하였다.

4. 바이러스 중화시험 16배를 양성으로 판정하는 조건인 반응억제도 70%를 양음성판정기준으로 설정하여 국내에서 사육중인 소와 말 혈청을 적용한 결과, 99% 특이도를 나타내었다.

5. 수포성구내염 양성혈청 패널에서 뉴저지형 양성혈청을 정확하게 양성판정하였고, 인디아나형 양성혈청은 음성으로 판정하여 혈청형 특이 항체진단법으로서의 유효성을 확인하였다.

6. 수포성구내염과 임상증상이 유사한 구제역과 돼지수포병 양성혈청에 대해서도 음성 판정하였기 때문에 유사질병과의 감별진단법으로서의 활용가능성을 제시하였다.

Ⅵ. 인용문헌

1. Rodriguez LL. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. Virus Res 2002;85(2):211-9.
2. Letchworth GJ, Rodriguez LL, Del cbarrera J. Vesicular stomatitis. Vet J 1999;157(3):239-60.
3. Rainwater-Lovett K, Pauszek SJ, Kelley WN, Rodriguez LL. Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004-2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains. J Gen Virol 2007;88:2042-51.
4. Martinez I, Barrera JC, Rodriguez LL, Wertz GW. Recombinant vesicular stomatitis (Indiana) virus expressingNew Jersey and Indiana glycoproteins induces neutralizing antibodies to each serotype in swine, a natural host. Vaccine 2004;22(29-30):4035-43.
5. Martinez I, Wertz GW. Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity. J Virol 2005;79(6):3578-85.
6. Ferris NP, Donaldson AI. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antigen. Vet Microbiol 1988;18(3-4):243-58.
7. Katz JB, Shafer AL, Eernisse KA. Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. J Virol Methods 1995;54(2-3):145-57.
8. Kweon CH, Kwon BJ, Kim IJ, Lee SY, Ko YJ. Development of monoclonal antibody-linked ELISA for sero-diagnosis of vesicular stomatitis virus (VSV-IN) using baculovirus expressed glycoprotein. J Virol Methods 2005;130(1-2):7-14.
9. Vernon SD, Webb PA. Recent vesicular stomatitis virus infection detected by immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay.

J Clin Microbiol 1985;22(4):582-6.

10. Zhou EM, Riva J, Clavijo A. Development of an immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of equine and swine IgM antibodies to vesicular stomatitis virus. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8(3):475-81.
11. Alvarado JF, Dolz G, Herrero MV, McCluskey B, Salman M. Comparison of the serum neutralization test and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to vesicular stomatitis virus New Jersey and vesicular stomatitis virus Indiana. J Vet Diagn Invest 2002;14(3):240-2.
12. Allende R, Sepulveda L, Mendes da Silva A, Martins M, Sondahl MS, Alonso A. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. Prev Vet Med 1992;14(3-4):293-301.
13. Ahmad S, Bassiri M, Banerjee AK, Yilma T. Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in Spodoptera exigua larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. Virology 1993;192(1):207-16.
14. Afshar A, Shakarchi NH, Dulac GC. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine, ovine, porcine, and equine antibodies to vesicular stomatitis virus. J Clin Microbiol 1993;31(7):1860-5.
15. Afshar A, Dulac GC, Wright PF, Martin D. Application of indirect ELISA for detection of bovine antibodies against vesicular stomatitis viruses. J Vet Diagn Invest 1993;5(1):26-32.
16. Lee H-S, Heo E-J, Jeoung H-Y, Ko H-R, Kweon C-H, Youn H-J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using glycoprotein and monoclonal antibody for detecting antibodies to vesicular stomatitis virus serotype New Jersey. Clin Vaccine Immunology 2009;16(5):in press.
17. Roche S, Bressanelli S, Rey FA, Gaudin Y. Crystal structure of the

low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. Science 2006;313(5784):187-91.

18. Bailey MJ, McLeod DA, Kang CY, Bishop DH. Glycosylation is not required for the fusion activity of the G protein of vesicular stomatitis virus in insect cells. Virology 1989;169(2):323-31.
19. Roche S, Albertini AA, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. Cell Mol Life Sci 2008;65(11):1716-28.
20. Carneiro FA, Ferradosa AS, Da Poian AT. Low pH-induced conformational changes in vesicular stomatitis virus glycoprotein involve dramatic structure reorganization. J Biol Chem 2001;276(1):62-7.
21. White J, Matlin K, Helenius A. Cell fusion by Semliki Forest, influenza, and vesicular stomatitis viruses. J Cell Biol 1981;89(3):674-9.
22. Gallione CJ, Rose JK. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the entire glycoprotein from the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus. J Virol 198346(1):162-9.
23. Mathieu ME, Grigera PR, Helenius A, Wagner RR. Folding, unfolding, and refolding of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. Biochemistry 1996;35(13):4084-93.
24. Prehaud C, Takehara K, Flamand A, Bishop DH. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. Virology 1989;173(2):390-9.
25. Grigera PR, Mathieu ME, Wagner RR. Effect of glycosylation on the conformational epitopes of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype). Virology 1991;180(1):1-9.
26. Pinschewer DD, Perez M, Jeetendra E, Bachi T, Horvath E, Hengartner H, et al. Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. J Clin Invest 2004;114(7):988-93.
27. Kelley JM, Emerson SU, Wagner RR. The glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing

antibody. J Virol 1972;10(6):1231-5.

28. Cantlon JD, Gordy PW, Bowen RA. Immune responses in mice, cattle and horses to a DNA vaccine for vesicular stomatitis. Vaccine 2000;18(22):2368-74.
29. Yilma T, Breeze RG, Ristow S, Gorham JR, Leib SR. Immune responses of cattle and mice to the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus. Adv Exp Med Biol 1985;185:101-15.
30. Dietzschold B, Wiktor TJ, Wunner WH, Varrichio A. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. Virology 1983;124(2):330-7.
31. Zhang S, Liu Y, Zhang F, Hu R. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs. Vaccine 2009;27(15):2108-13.