大韓바이러스學會誌 : 第26卷 第1號 1996
J. of Kor. Soc. of Virology, Vol. 26, No. 1, 1996

한탄바이러스 핵단백질을 이용한 항 한타바이러스 항체 검색용 Dot Blot Assay

[1]국립보건원 신경계바이러스과, [2]가톨릭의대 미생물학교실

조해월[1] · 정연준[2] · 김정림[1] · 반상자[1] · 남재환[1] · 이형우[1] · 이유진[1] · 김은정[1]

=Abstract=

Dot Blot Assay for Screening of Anti-hantavirus Antibodies by Using Nucleocapsid Protein of Hantaan Virus

Hae Wol Cho, Yeun Jun Chung, Chung Lim Kim, Sang Ja Ban, Jae Hwan Nam, Hyeong Woo Lee, Yoo Jin Lee and Eun Jung Kim

[1]Division of Arboviruses, Korea National Institute of Health
[2]Department of Microbiology, Medical College, Catholic University

For easy and rapid screening of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) without any laboratory equipment, dot blot enzyme immunoassay was developed and tried to detect anti-hantavirus antibodies. The nucleocapsid protein of Hantaan virus was isolated by affinity chromatography and used for making the dot strip. 28 of 29 Hantaan virus infected sera showed positive signals and 21 of 22 HFRS negative sera showed no positive signals. Anti-Seoul virus monoclonal antibody also exibited positive signal but the intensity of colorization was approximately 5 fold less than that of anti-Hantaan monoclonal antibody. The sensitivity of dot blot assay was equal or superior to indirect immunofluorescent assay (IFA) or ELISA test. Overall, the screening results with dot blot assay showed 92.2 % of concordance with IFA or ELISA test. This results suggests that dot blot assay could be applied a tool for easy and rapid screening of HFRS.

Key Words: Hantaan virus, Nucleocapsid protein, Dot Blot Assay

서 론

신증후 출혈열 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)은 고열과 더불어 체내 혈관의 내벽이 손상되어 전신에 출혈성향이 높아지며 신기능 장애로 단백뇨가 생기는것을 주 증상으로하는 급성 바이러스 감염질환으로 국내에서만 매년 500-2000여명의 환자가 발생하고 있으며, 동북아시아 이외에도 중국, 러시아, 동유럽, 북유럽등 전세계에 걸쳐 연간 약 20여만명의 환자가 발생하고 있다. 사망율은 5-10%로 높으며 일단 증상이 나타나면 최소 1달 이상의 입원치료를 요하는 중증 감염병이다 [1]. 특히 최근 북미지역에서 hantavirus가 원인체로 밝혀진 감염증이 발생하여 감염자의 70%이상이 사망하는 사례들이 미국 CDC에 보고되면서 북미지역도 Hantavirus에 의한 질환에 대해 더이상 안전지역이 아님이 밝혀졌으며 hantavirus pulmonary syndrome (HPS)이라는 새로운 질환명이 제시되는 등 새로운 관심의 대상이 되고 있다 [2,3].

1976년 신증후 출혈열의 원인 바이러스가 처음 발견된 이래 [4] 이 질환에 관한 병태생리학적 연구가 많이 진행되어 사망율이 낮아지고 있지만 적절한 치료를 위해서는 조기진단 및 유사한 임상증상을 나타내는 리켓치아나 렙토스피라

이 연구는 과학기술처의 선도기술개발과제(신의약, 신농약 개발사업 4-2-63)으로 지원된 것임.

감염증들과의 감별진단이 매우 중요하다. 신증후 출혈열로 인한 사망원인 중 많은 수가 잘못 진단하거나 진단이 지연되어 치료중이나 운반중에 내부출혈이나 혈압강하로 인한 것이었다는 보고에서도 [1] 조기에 진단하여 치료방침을 정하는것의 중요성을 알 수 있다. 특히 신증후 출혈열에 노출될 가능성이 많은 집단은 실제로 산과 들에서 작업을 하는 사람들이므로 [5, 6] 이들이 이 질환으로 인해 입게되는 건강상의 손실및 노동력의 손실은 개인 뿐 아니라 사회 전체에도 영향을 끼칠 수 있다. 따라서 환자를 직접대하는 병,의원에서 직접 빠르고 간편하면서도 정확하게 진단할 수 있는 검사법의 개발은 이 질환의 사망율을 낮추고 이환기간을 단축시키는 데 절실히 요구되고 있다.

현재 신증후 출혈열 항체검색에 가장 널리 쓰이고있는 방법은 간접면역형광항체법 (indirect immunofluorescent assay, IFA)이다. 이 방법은 세포나 조직에 감염되어있는 한타바이러스를 항원으로하여 환자혈청내의 항 한타바이러스 항체를 검출하는 혈청학적 방법으로서 [7] 지금까지도 민감도 (sensitivity)와 군특이성 (group specificity)이 높은방법으로 알려져있다. 초기에는 감염된 등줄쥐의 폐조직을 박편으로 만들어 사용하였으나 [4] 그 후 Vero E6세포 [8]에서 세포배양에 성공하므로서 정량화된 항원 spot을 다량으로 만들어 쓸 수 있게 되었다. 그외에 발병 초기에 보다 민감하게 항 한타바이러스항체를 검사하고자 ELISA법을 응용한 검사법도 개발되어 IgG 뿐아니라 IgM을 검출하는데에 이용되고있다 [9, 10, 11]. 한편 1989년 일본에서 항원 및 면역활성물질의 부착력이 뛰어난 고밀도입자 (high density composite particle)가 개발되었는데 [12] Tomiyama등이 이를 응용하여 mycoplasma를 이 입자에 부착하여 신속하게 응집반응 여부로 진단을 할 수있는 방법을 발표하여 실용화되었다 [13]. 국내에서도 이 고밀도입자 응집법 (high density particle agglutination, HDPA)을 이용하여 쉽게 한탄바이러스 감염여부를 검사할 수 있는 진단 Kit이 개발되므로서 [14] 최초로 보급형 신증후 출혈열 진단 Kit이 출현되게 되었다. 그외에 플라크 감소 중화항체법 (plaque reduction neutralization test, PRNT) [15], 혈구응집 저지반응 (hemagglutination inhibition, HI) [16], 면역점착 적혈구응집반응 (immune adherence hemagglutination, IAHA) [17], immunoperoxidase assay(IPA)등의 방법이 이용되고 있으나 제한적 목적으로 일부 연구실에서만 실행되고있다.

간접형광 항체법이나 ELISA법이 병, 의원들에서 신증후 출혈열 진단에 널리쓰이지 못하고 있는 이유는 두 방법 모두 고가의 장비가 있어야 결과판정이 가능하고 연구실에서 숙련된 검사요원이 아니면 판독의 정확성을 기하기 어렵기 때문이다. 이들 검사법들의 장점을 취하면서 상기한 단점들을 보완한 검사법으로 Western Blot 법이 시도된 바 있으며 연구결과 간편하면서도 민감하게 한타바이러스 항체를 검사할 수 있음이 확인되었다 [18].

본 연구에서는 이 Western Blot 방법을 보다 빠르고 간편하게 시행하며, 아울러 검사 kit를 용이하게 대량 생산할 수 있는 방법을 모색하고자 Dot Blot법을 고안하여 한타바이러스 항체를 검색하여 보았으며, 그 결과를 기존의 검사법들과 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 바이러스

Hantaan 바이러스 (strain 76-118)를 영아마우스 (suckling mouse)에 뇌내 계대하여 사용하였다. 생후 48시간 이내의 suckling mouse의 뇌에 0.02 ml씩의 한탄바이러스를 접종하고 5-8일후 사지마비 등 바이러스 감염 증상이 나타나면 뇌를 무균적으로 채취하여 PBS (pH 7.4, 0.01 M)로 10% emulsion을 만들었다. 이를 4℃에서 12,000 rpm으로 20분간 원침하여 상층액을 회수하여 항원으로 사용하였다.

2. 한타바이러스 항혈청

1) 환자혈청

1995년도에 국립보건원 신경계바이러스과에 의뢰된 혈청들 중 간접형광항체법에의해 한타바이러스 항체 양성으로 판명된 3례의 혈청과 2명의 정상인 혈청을 사용하였다.

2) 단클론 항체

국립보건원 신경계바이러스과 및 가톨릭의대 미생물학교실에서 제조한 한타바이러스 핵단백질에 대한 단클론 항체를 사용하여 핵단백질 분리를 위한 affinity column 제조 및 Dot Blot assay의 control로 사용하였다. 사용한 한탄바이러스

단클론항체는 HE9, 7B1 이었고, 서울바이러스 단클론항체는 3F5 였다 [19, 20].

3) 기니픽 혈청

한탄바이러스를 감염시킨 29종의 기니픽 혈청 및 리켓치아 (*R. tsutsugamushi*), 렙토스피라 (*L. interrogans, serova lai*), 일본뇌염 바이러스 (Nakayama strain), Hepatitis 바이러스 (헤파박스, 녹십자)로 각각 면역시킨 기니픽과 정상 기니픽의 혈청들을 사용하였다.

3. 한탄바이러스 핵단백질 단클론 항체의 정제

Protein-A Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech, Sweden)를 100 mM Tris-Cl buffer (pH 8.0)로 equilibreate 시킨후 여기에 1/10 부피의 항체를 흘려 통과시켰다. 그후 약 10배 부피의 100 mM Tris와 10 mM Tris buffer를 흘려준 뒤 100 mM glycin buffer(pH3)로 항체를 추출하였다. 추출후 잔여 단백질은 3 M urea, 1 M LiCl, 100 mM glycine, 100 mM Tris buffer를 차례로 흘려주어 제거하였다. 받아낸 분획에 대해 OD 280에서 흡광도를 측정하여 얻어진 IgG의 양을 확인하였다.

4. Affinity Chromatography에 의한 핵단백질 분리

CNBr activated Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Sweden)를 1mM HCl buffer에서 swelling 시켰다. 이를 coupling buffer (0.1M $NaHCO_3$,pH 8.3, 0.5M NaCl)로 eqilibriate 한뒤 원침하고 여기에 coupling buffer에 녹인 항체 (5 mg/ml) 약 2ml 을 첨가하였다. 상온에서 2시간동안 반응시킨뒤 원침하고 침사에 blocking buffer (0.2 M glycine, pH 8.0)를 첨가하고 다시 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 그후 coupling buffer 및 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)로 세척하고 최종적으로 항체가 coupled된 Sepharose 4B를 column에 packing하였다. 준비된 한탄바이러스 (strain 76-118) 상청액에 NP40을 0.1 % 되게 첨가하고 5분간 sonicate (Vibra Cell, Sonics and Materials Inc., USA) 한뒤 원침하여 상청을 회수한 후 이를 한탄바이러스 핵단백질 affinity column에 통과시켰다. 그후 0.1 M acetic acid buffer(pH 2.6)로 핵단백질을 추출하였다.

5. Dot Blot 검사용 strip의 제조

추출한 한탄바이러스 핵단백질의 양을 변형된 Lowry법으로 측정한뒤 (Protein Assay kit, Sigma, USA) slot blotter (Hoeffer Scientific Instrument, USA)를 이용하여 well당 10 ug의 핵단백질을 nitrocellulose membrane에 점적하였다.

6. Enzyme Immunoassay

준비된 nitrocellulose dot strip을 5% skim milk (Difco, USA)가 포함된 PBS에서 2시간동안 blocking시킨뒤 각각의 strip에 검체희석액 (1 % bovine serum albumin in PBS)으로 희석된 검사혈청을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 각 Dot strip들을 Tween 20이 0.05 % 함유된 PBS로 1분씩 5회 세척하고 검체희석액으로 1:1000으로 희석한 HRP-conjugated goat anti-Human IgG (Cappel)와 상온에서 15분간 반응시켰다. 0.05% Tween 20 PBS로 1분씩 5회 세척한뒤 Diaminobenzidine (Sigma, USA) 0.04 %, H_2O_2 0.01 %가 함유된 PBS에서 발색 반응시켰다. 반응이 충분히 이루어진 후 strip을 증류수로 세척하여 반응을 정지시켰다.

7. IFA and ELISA

Dot Blot assay에서 검사한 모든 혈청들에대해 간접형광항체법과 ELISA법에의한 검사도 병행하여 이의 결과와 Dot Blot assay의 결과를 비교하였다. 간접형광항체법은 Lee등의 보고에 따라서 실시하였으며 [7], ELISA는 GENEDIA Hantaan Ab EIA Kit(녹십자)를 이용하여 이 Kit의 사용법에 준하여 실시하였다.

결 과

1. Affinity Chromatography에 의한 핵단백질 분리

한탄바이러스 구성성분중 가장 항원성이 강한 핵단백질을 순수 분리하기 위하여 항 한탄바이러스 핵단백질 단클론항체를 이용한 affinity chromatography를 실시하였다. 5 ml의 한탄바이러스 항원액을 통과시켜 분획을 받은 결과 단일 peak의 핵단백질 분획을 얻어내었으며 그 양은 약 700 ug이었다.

2. Dot Blot Assay의 특이성 검사

Dot Blot assay에 의한 항 한타바이러스 항체검색의 특이성을 확인하기 위하여 제조한 Dot strip을 한탄바이러스 핵단백질에 대한 단클론항

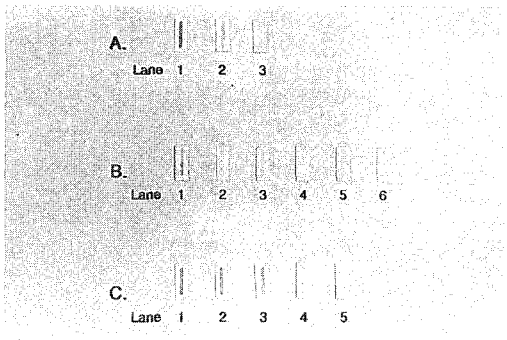

Fig. 1. Specificity of the dot blot assay for screening anti-Hantavirus antibodies. **A)** lane 1; anti-Hantaan virus monoclonal antibody, lane 2; anti-Seoul virus monoclonal antibody, and lane 3; normal mouse serum. **B)** lane 1; anti-Hantaan virus GP serum, lane 2; Rickettsia serum, lane 3; Leptospira serum, lane 4; Japaneses encephalitis virus serum, lane 5; Hepatitis B serum, and lane 6; normal GP serum. **C)** lane, lane 2, lane 3; Human positive serum, lane 4, lane 5; Human negative serum.

체, 서울바이러스 핵단백질에 대한 단클론항체 및 정상 마우스항체와 각각 반응시켜보았다 (그림 1A). 이때 각 단클론항체들은 간접형광항체법으로 한탄 및 서울바이러스에 대해서 동일한 titer를 갖도록 희석한뒤 다시 이를 1/50로 희석하여 반응시켰다. 그 결과 한탄 및 서울바이러스 단클론 항체들은 뚜렷한 양성반응이 관찰되었으며 정상혈청은 관찰되지 않았다. 흥미롭게도 서울바이러스에 대한 단클론 항체는 한탄바이러스 단클론 항체에비해 dot의 강도가 약 1/5정도로 약했다. 그외에 기니픽에 대해 한탄바이러스를 감염시킨 29종의 혈청과 10례의 리켓치아 (*R. tsutsugamushi*) 감작혈청, 1례의 렙토스피라 (*L. interrogans, serova lai*) 감작혈청, 1례의 일본뇌염 바이러스 감작혈청, 3례의 Hepatitis B 바이러스백신 감작혈청 및 7례의 정상 기니픽혈청을 준비하여 본 Dot Blot Assay에 적용시켜 보았다 (그림 1B, 표1). 그 결과 한탄바이러스를 감염시킨군에서는 29례중 28례에서 양성 signal을 보였으며 그외의 다른 군에서는 양성반응이 나타나지 않았다. 다만 렙토스피라 감작혈청에서는 약한 교차반응이 관찰되었다. 인혈청에 대한 반응도 예상대로 환자혈청과 정상혈청의 결과가 뚜렷이 구별되었다 (그림 1C, 표 1).

3. Dot Blot Assay의 민감도 검사

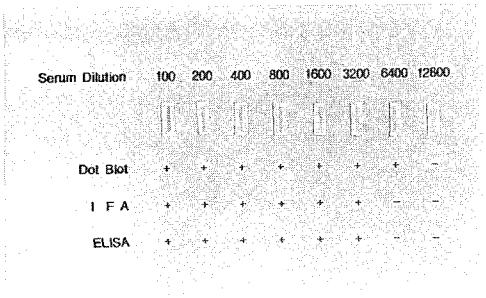

Fig. 2. Comparison with Dot blot, IFA and ELISA test for sensitivity. +: Positive, —: Negative.

Dot Blot assay의 민감도를 확인하기 위하여 항 한탄바이러스 항체를 계단 희석하여 검사하여 보았으며 동시에 동일 검사시료에 대해 IFA와 ELISA검사를 병행하여 본 assay의 민감도를 기존의 방법들과 비교하여 보았다(그림 2). 그림에서 보는바와 같이 Dot Blot assay로는 1:6400까지 양성으로 나왔으나 IFA와 ELISA는 이보다 한단계 낮은 1:3200까지만 양성으로 판정되었다. 따라서 본 방법이 IFA나 ELISA에 비해 동등하거나 약간더 민감하게 항 한탄바이러스 항체를 검색할 수 있음을 확인하였다.

4. Dot Blot, IFA, ELISA법의 비교

상기한 세가지 방법에 의한 검사결과를 총괄한 결과는 표1과 같다. Dot Blot assay는 IFA나 ELISA의 결과와 92.2 %의 일치도를 나타내었다. 일치하지않은 4 case중 한 예에서는 IFA와 ELISA에서 양성이나 Dot assay에서는 음성이었고, 두 예에서는 Dot assay에서 양성이나 IFA 혹은 ELISA에서 음성이었다. 렙토스피라 혈청은 IFA와 ELISA에서는 음성이었으나 Dot assay에서는 약한 교차반응이 있었다.

고 찰

신증후출혈열에대한 확실한 치료법은 아직 알려지지 않으나 병태생리학적 연구가 지속되면서 이 질환으로 인한 사망율은 낮아지고 있다. 그러나 신증후출혈열에 걸리면 최소 한달이상의 치료를 요하게 되므로, 조기에 진단하여 이환기간을 줄이는것이 국민보건과 국가경제상 매우 중요하다. 신증후 출혈열의 진단은 환자의 임상증

Table 1. Comparison of dot blot, IFA and ELISA tests for screening anti-Hantavirus antibodies

Samples	Dot Blot	IFA	ELISA	Samples	Dot Blot	IFA	ELISA
GHT1	+	+	+	GR1	—	—	—
GHT2	+	+	+	GR2	—	—	—
GHT3	+	+	+	GR3	—	—	—
GHT4	+	+	+	GR4	—	—	—
GHT5	+	+	+	GR5	—	—	—
GHT6	—	+	+	GR6	—	—	—
GHT7	+(w*)	+	+	GR7	—	—	—
GHT8	+	+	+	GR8	—	—	—
GHT9	+	+	+	GR9	—	—	—
GHT10	+	—	—	GR10	—	—	—
GHT11	+	+	+				
GHT12	+	+	+	GL1	±(w*)	±(w*)	—
GHT13	+	—	—				
GHT14	+	+	+	GJ1	—	—	—
GHT15	+	+	+		—	—	—
GHT16	+	+	+	GHB1	—	—	—
GHT17	+	+	+	GHB2	—	—	—
GHT18	+	+	+	GHB3	—	—	—
GHT19	+	+	+				
GHT20	+	+	+	GN1	—	—	—
GHT21	+	+	+	GN2	—	—	—
GHT22	+	—	+	GN3	—	—	—
GHT23	+	+	+	GN4	—	—	—
GHT24	+	+	+	GN5	—	—	—
GHT25	+	+	+	GN6	—	—	—
GHT26	+	+	+	GN7	—	—	—
GHT27	+	+	+				
GHT28	+	+	+				
GHT29	+	+	+				
Total	28/29	26/29	27/29	Total	1/22	1/22	0/22
	(no. of positive/no. of tested)				(no. of positive/no. of tested)		

GHT1-29; ginia pig anti-hantaan virus antiserum, GR1-10; ginia pig anti-rickettsiae (*R. tsutsugamushi*) antiserum, GL1; ginia pig anti-leptospira (serova *lai*) antiserum, GJ1; ginia pig anti-jananese encephalitis virus (Nakayama strain) antiserum, and GN1-7; mornal ginia pig serum. *; w-weak positive.

상과 환자혈청에서 항 한타바이러스 항체검사 결과를 종합하여 하게된다. 현재 국내에서 항 한타바이러스 항체검사는 몇몇 의과대학 연구실과 국립보건원 등 매우 제한된 숫자의 연구기관에서만 실시되고있다. 따라서 일선 의료기관에서 급성 출혈열성 환자에 대해 신증후 출혈열 여부를 검색하기에 많은 시간이 소요되고 있다. 또한 대부분의 신증후 출혈열 백신 접종자들은 접종 후 자신에게 한타바이러스에 대한 충분한 정도의 항체가 생성되었는지 확인하지 못하고 있는 실정이다. 이러한 점들을 개선하기 위해서는 일선 의료기관이나 검사소에서 개개의 혈청에대해 필요시 즉시 항 한타바이러스 항체를 검사할 수 있어야한다. 따라서 본 연구에서는 아무런 특수 검사기구가 없는 개개의 의료기관에서 간편하고 빠르게 항 한타바이러스 항체를 검사할 수 있는 방법으로는 enzyme immunoblot방법이 적합하다고 판단 하였고 이중에서도 특히 dot blot법이 검사 kit의 대량 생산에 용이하기에 dot blot방법을 이용한 항 한타바이러스 검사법을 시도하여 보았다.

Hantaan virus는 L (전사효소), G1/G2 (envelpoe glycoprotein), N (nucleocapsid protein)으로 이루어져 있다 [26]. 이들 항원들 중 핵단백질은 hantavirus의 군특이 (group specific) 항원이며 [27] G1, G2 당단백질은 형특이 (type specific) 항원으로 중화항체의 작용부위 및 혈구응집반응부위가 포함되있다고 보고된 바있다 [27,28,29]. 한편 Lee, Kim, Ban등은 한탄 및 서울 바이러스 핵단백질에대한 단클론 항체및 다클론 항체에 대한 연구결과 핵

단백질도 각 혈청형들을 구별할 수 있는 형특이 항원성을 가지고 있다고 보고하였다 [18,19,20]. 본 연구에서는 한탄바이러스의 핵단백질을 이용하여 항 한타바이러스 항체를 간편하게 검출해 내는 즉, 신증후 출혈열과의 감별을 요하는 급성 발열성 질환들과 신증후 출혈열을 빠르게 감별할 수 있는 방법을 시도하여 보았다. 또한 이 dot strip으로 항 한탄 바이러스 항체와 항 서울 바이러스 항체를 반응하여 봄으로서 핵단백질을 이용하여 한타바이러스 혈청형도 구별 할 수 있는지의 가능성을 확인하였다.

Affinity chromatography로 핵단백질을 분리한 결과 5 ml의 한탄바이러스액에서 70회의 검사를 할 수 있는 약 700 ug의 핵단백질을 분리하였다. 따라서 약 100마리의 영아마우스의 뇌를 추출하면 약 4000 test분의 핵단백질을 얻을 수 있음을 확인하였다. 항체검색용 Dot strip의 제조는 단지 일정량의 항원을 넣어 suction blotter로 N-C filter에 묻혀주기만하면 되므로 용이하게 준비할 수 있었다. 이 strip을 이용하여 항 한타바이러스 항체를 검색한 결과 특이도와 민감도가 우수한 방법임이 확인되었다. 한탄바이러스로 감염된 혈청에서는 강한 양성반응이 나왔으며 정상혈청에서는 발색반응이 거의 없었다. 또한 신증후 출혈열과 발생시기 및 임상증상이 유사한 리켓치아 및 렙토스피라증 혈청과도 반응이 없었다. 그외에 일본뇌염 및 B형간염백신접종 혈청도 음성으로 나타났다 (그림 1). 그리고 한탄바이러스 단클론항체에 대해 적용해본 결과 동일한 간접형광항체 titer를 나타내는 서울바이러스 단클론항체보다 약 5배더 강하게 반응하였다. 이는 한타바이러스의 핵단백질로도 한타바이러스 형청형들을 구분할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 다만 렙토스피라증 항체가 약한 교차반응을 나타내었는데 본연구에서는 단지 한시료에 대해서만 검사하였으므로 이 약한 교차반응의 원인을 명확히 규명하기는 어려웠고 앞으로 더 많은 렙토스피라 양성혈청과의 교차반응 실험이 필요하리라 판단되었다. 전체적으로 dot blot assay의 결과와 IFA, ELISA의 결과를 비교해 본 결과 92.2 %에서 세가지 방법의 검사 결과가 일치하였다. 또한 본 연구에서는 검색결과의 재현성을 높이고 필요시 언제나 검사를 할 수 있도록 하기위해 시행에 소요되는 과정과 시간을 줄이고자 하였다. 그 결과 검사에 소요되는 총 시간을 40분으로 단축시켰는데, 이때 반응의 민감도 및 특이도에 문제가 없었다. 그리고 검사용 strip의 보관기간을 확인하여 보기 위해 제조 후 냉장고에서 6개월간 보관한 strip과 바로 준비한 strip을 동일 혈청과 반응시켜본 결과 발색에 차이가 없었다 (data not shown).

이상의 연구 결과들을 종합해볼 때 dot blot assay는 항 한타바이러스항체 검색에있어 IFA나 ELISA test등과 같이 유용한 방법으로 판단되며, 특히 이러한 검사법을 이용하여 별도의 실험실 장비가 없는 일선 병의원이나 검사소 등에서 신증후 출혈열 증세를 보이는 환자들에 대해 간편하게 신증후 출혈열 여부를 확인해볼 수 있고 신증후 출혈열 예방접종자들에 대해 항한타바이러스 항체가 성공적으로 생성되었는지 검사하는데 사용할 수 있으리라 기대한다.

참 고 문 헌

1. Lee HW and Dalrymple JM : Manual of Hemorrhagic fever with renal syndrome. WHO Collaborating center for virus reference and research (hemorrhagic fever with renal syndrome), Institute of viral diseases, Korea University, 1989.
2. Jenison S, Yamada T, Morris C, Anderson B, Torrez-Martinez N, Keller N, Hjelle B: Charcterization of Human Antibody Responses to Four Corners Hantavirus Infections among Patients with Hantavirus Pulmonary Syndrome. J Virol 68:3000-3006, 1994.
3. Morzunov SP, Feldmann H, Spiropoulou CF, Semenova VA, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nicol ST : A New Recognized Virus Associated with a Fatal Case of Hantavirus Pulmonary Syndrome in Louisiana. J Virol 69: 1980-1983, 1995.
4. Lee HW, Lee PW : Korean Hemorrhagic fever. Demonstration of causative Antigen and Antibodies. Korean J Intern Med 19:371-394, 1976.
5. Shin YT : Clinical and laboratory findings of hemorrhagic fever with renal syndrome. Med Postgraduates 21:218-225. 1993.
6. 장우현, 이범구, 김금용 : 1986년부터 1988년

사이에 우리나라에서 발생한 신증후출혈열의 혈청학적 조사. 대한미생물학회지 24:497-510, 1989.

7. Lee PW, Amyx HL, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Lee HW : Propagation of Korean hemorrhagic fever virus in laboratory rats. Infection and Immunity 31: 334-338, 1981.
8. McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP : Morphological identification of the agent of Korean hemorrhagic fever(Hantaan virus)as a member of the Bunyavirdae. Lancet 1: 765-768, 1982.
9. Goldgaber D, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Svedmyr A : Definition of three serotypes of Hantaviruses by a double sandwich ELISA with biotin avidin amplification system. J Gen Virol 66:1733-1740, 1985.
10. Chen LL, Wang HX, Gu Xs, Chen SZ, Qin GM, Xu FQ, Li CM, Yang SQ: Early diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome by IgM ELISA technique. Chin Med J 100: 402-405, 1987.
11. 조해월, 반상자, 남재환, 정연준, 허주연 : 신증후출혈열 병인론에관한 연구(II) - 단클론항체를 이용한 고감도 조기진단법 개발. 국립보건원보 30(1): 112-121, 1993.
12. Mitani K : 신소재를 이용한 면역학적 응집반응 . 화학과 생물 27: 216-217,1989.
13. Nakamura Y, Shimada S, Tanba A, Aoki Y: 고비중입자응집 반응(HDPA)의한 항 mycoplasma항체가의 근속측정에 관한 검토. 임상과 위생물 16:87-90. 1989.
14. Tomiyama T, Lee HW: Rapid serodiagnosis of Hantavirus infections using high density particle agglutination. Arch Virol (Suppl 1): 29-33, 1990.
15. Lee PW, Gibbs CJ. Jr, Gajdusek DC, Yanagihara R: Serotypic Classification of Hantaviruses by indirect immunofluorscent antibody and plaque reduction neutralization test. J Clin Microbiol 22;940-944, 1985.
16. Okuno Y, Yamanishi K, Takahashi Y, Tanishita O, Nagai T, Dantas JR, Okamoto Y, Tadano M, Takahashi M : Haemagglutination-inhibition test for hemorrhagic fever with renal syndrome using virus antigen prepared from infected tissue culture fluid. J Gen Virol 67: 149-156, 1986.
17. Sugiyama K, Matsuure Y, Morita C, Shiga S, Akao Y, Komatsu T, Kitamura T : An immune adherence assay for discrimination between etiologic agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. J Infect Dis 149:67-73, 1984.
18. Lee PW, Lee HW : Use of Western blotting for detection of anti-Hantavirus antibodies and differential diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. J Kor Soc Virol 19: 91-99, 1989.
19. Ban SJ, LEE HS, Park SH, Cho HW : Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Hantaan virus and Seoul virus. J Kor Soc Virol. 25: 59-71, 1995.
20. Kim TG : Production and characterization of monoclonal antibodies to Hantaan Virus. J Cath Med Col. 43:1119-1131. 1990.
21. Elliot LH, Kiley MP and McCormick JB : Hantaan virus: Identification of virion proteins. J Gen Virol 69: 1285-1293, 1984.
22. Yamanishi K, Dantas JR, Takahashi M, Domae K, Takahashi Y, Tanishita O : Antigenic differences between two viruses, isolated in Japan and Korea, that cause hemorrhagic fever with renal syndrome. J Virol 52: 231-237, 1984.
23. Dantas JR, Okuno Tr Y, Assada H, Tamura M, Takahashi M, Tanishita O, Takahashi Y, Kurata T, and Yamanishi K : Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome. Virol 151: 379-384, 1986.
24. Arikawa J, Schmaljohn AL, Dalrymple JM and Scmaljohn CS : Caracreization of Hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies. J Gen Virol 70: 615-624, 1989.