

## 한타바이러스 혈청형 특이 Primer를 이용한 Nested RT-PCR 방법으로 5가지 혈청형 한타바이러스에 감염된 햄스터 조직에서 바이러스 검출

아산생명과학연구소 바이러스 연구실

주 용 규 · 이 호 왕

=Abstract=

### Discrimination of Hantaviruses from the Tissues of Infected Hamsters to 5 Different Serotype Hantaviruses by Nested RT-PCR using Hantavirus Serotype Specific Primers

Yong-Kyu Chu and Ho-Wang Lee

Asan Institute for Life Sciences, Seoul 138-040, Korea

We developed a sensitive, nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect Hantaan, Seoul, Belgrade, Puumala and Sin Nombre viruses in animal tissues. Total RNA was extracted from blood, lung or kidney samples of experimentally-infected hamsters by using the guanidine isothiocyanate buffer-acid phenol-chloroform method. Genus-reactive outer primers were derived from the consensus region of the G1 gene sequences of several hantaviruses. Serotype-specific primers were selected within the region amplified by the outer primers. To examine the sensitivity and specificity of the test, we diluted known quantities of Hantaan, Seoul, Belgrade, Puumala and Sin Nombre viruses in human or hamster immune sera before performing the nested RT-PCR. We could detect as little as 1 pfu of virus, even in the presence of high-titer neutralizing antibodies, and the serotype-specific primers amplified only homologous serotype viruses. RT-PCR with these primers demonstrated virus in the blood of experimentally-infected hamsters as early as four days to as late as 30 days after infection. A comparison of a standard immunofluorescent antibody screening test (IFAT) to nested RT-PCR with RNA extracted from lung or kidney tissues of the hamsters, demonstrated that RT-PCR to be more sensitive for identifying viruses in these tissues.

**Key Words:** Hantavirus, Serotype-specific primers, nested RT-PCR

## 서 론

분야비리대과에 속하는 한타바이러스속 바이러스들은 유라시아 대륙의 신증후출혈열 뿐 아니라 미주대륙에서 발병하는 한타바이러스 폐증

후군의 병원체이다. 매년 20만명 이상의 환자가 전세계적으로 발생하는 것으로 보고 되고 있으며, 이 중 절반 가량의 환자가 우리나라 및 중국, 극동 러시아 지역에서 발생하고 있다 [1]. 한타바이러스속의 현재까지 알려져 있는 9개 혈청형 바이러스들 중 5개의 혈청형 바이러스들이 사람

본 연구는 1995년도 과학기술처 선도기술개발사업과제 4-2-14 연구비지원에 의한 결과로 이루어 졌음.

에게 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 등줄쥐 (*Apodemus agrarius*)의 폐장조직에서 분리된 한탄바이러스 (HTNV) [2]는 한국에서 발생하는 한국형 출혈열 및 극동아시아 지역에서 발생하는 중증의 신증후출혈열의 병원체이며; 집쥐 (*Rattus norvegicus*)의 폐장조직에서 분리된 서울바이러스 (SEOV) [3]는 전세계적으로 분포하고 있으며 중간정도의 중상을 일으키는 신증후출혈열의 원인체이며; 노란목 들쥐 (*Apodemus flavicollis*)의 폐장조직에서 분리된 Dobrava 바이러스 (DOBV) [4]는 중부유럽의 발칸반도 지역에 발생하는 중증의 신증후출혈열 병원체이고; 스칸디나비아 반도의 대륙발쥐 (*Clethrionomys glareolus*)에서 분리된 푸말라바이러스 (PUUV) [5]는 유럽대륙 전역에서 발생하는 경증의 신증후출혈열 병원체이고; 미국의 사슴쥐 (*Peromyscus maniculatus*)에서 분리된 Sin Nombre 바이러스 (SNV) [6]는 미주대륙에서 발생하는 한탄바이러스 폐증후군의 병원체이다. 한탄바이러스, 서울바이러스, DOBV 푸말라바이러스 및 SNV 감염에 의한 치사율은 각각 5-15%, 1%, 10-15%, 0.1% 그리고 75%인 것으로 알려져 있다.

현재 우리나라 및 중국에서는 한탄바이러스 감염에 의한 신증후출혈열을 예방하기 위한 마우스 뇌내 증식 불활화백신이 개발되어 상용화되고 있다 [7, 8]. 그러나 한탄바이러스 유래 백신의 타 혈청형 바이러스에 대한 유효성은 인체와 유사한 증상을 나타내는 실험동물 모델의 미비로 인하여 아직 검증되지 못하고 있다. 한탄바이러스는 자연계에서 지속적으로 숙주동물인 설치류에서 감염되어 증식되고 있으며, 사람의 경우 지속감염되어 있는 설치류의 오염된 소변, 타액 및 대변과 같은 배설물이 건조되어 오염된 공기를 흡입하거나, 감염된 숙주동물에 물려서 사람에게 전파되는 것으로 알려져 있다 [9]. 한탄바이러스에 감염된 실험동물들은 젖빨이 동물을 제외하고 바이러스에 의한 병원성을 나타내지 않으므로 바이러스의 감염여부를 측정하기 위하여 감염된 실험동물의 폐장이나, 신장과 같은 장기조직중의 항원존재 유무를 간접형광항체법으로 측정하는 것이 표준화되어 있는 방법으로 알려져 있다 [1]. 그러나 간접형광항체법을 사용하여 실험동물의 바이러스 감염유무를 조사할 때, 바이러스의 숙주동물 특이성으로 인하여 감염시킨 실험동물 모두에서 바이러스 항원을 검출할

수 없으며, 민감도도 낮을 뿐 아니라 광범위한 항체의 교차반응으로 인하여 혈액 및 장기조직 중에 바이러스 항원 검출 및 원인 바이러스 판독에 어려운 점이 있었다. 또한 이 방법은 복잡한 과정을 거쳐야 하며, 결과 판독에 많은 경험과 주관적인 판단기준에 의존하는 단점이 있다.

본 연구에서는 각종 한탄바이러스에 감염된 실험동물의 혈액 및 장기 조직으로부터 바이러스 감염유무를 확인하고, 원인 바이러스를 신속하고 민감하게 특이적으로 판독할 수 있는 한탄바이러스 혈청형 특이 primer를 사용하는 역전사-중합효소 연쇄반응에 의한 진단 방법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 및 조직배양 세포

한탄바이러스 76/118 균주 [2], 서울바이러스 80/39균주 [3], Dobrava바이러스 [4], 푸말라바이러스 K27균주 [10], Sin Nombre바이러스 New York균주 [11]를 Vero E6세포 (ATCC CRL 1586)에 계대배양하였으며, 배양액으로 10% 우태아 혈청이 함유된 Eagle's minimal essential medium with Earle's salts (EMEM)을 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 감염조직에서 RNA추출

6-8주된 Syrian golden hamster를 실험동물로 사용하였으며, 1,000 PUF의 바이러스를 근육내로 접종하였다. 바이러스를 접종하여 감염된 햄스터의 혈액내 바이러스 (viremia)를 조사하기 위하여 바이러스 감염 후 일정간격으로 햄스터의 안와정맥총으로부터 150  $\mu$ l의 혈액을 채취하여 1 ml의 Trizol (Gibco BRL, Gaithersberg, MD)을 첨가하여 사용할 때 까지 영하 80도의 냉동고에 보관하였다. 감염시킨 햄스터 장기조직중의 바이러스 증식을 조사하기 위하여 바이러스 감염 한달 후 감염시킨 햄스터를 마취시킨 후 심장으로부터 전체혈을 하고 폐장조직 및 신장조직을 적출하였다. 혈액 및 장기조직으로부터 세포 및 전체 RNA를 추출하기 위하여, 채취한 혈액 및 소량의 장기조직을 1 ml의 Trizol (Gibco BRL)을 첨가하여 유리 조직분쇄기에서 분쇄한 후, microfuge tube에 옮겨 제조회사의 방법에 따라서 RNA를 추출하였다.

### 3. 간접형광항체 검사

감염조직중의 바이러스 항원 검출을 위하여, 채취한 폐장과 신장조직을 OCT freezing medium (Miles Inc, Naperville, IL)에 파묻어 얼린 후 Cryostat (IEC Inc, Needam Height, MA)를 사용하여 5  $\mu$ M 크기로 절단한 조직 절편을 glass slide에 붙인 후 아세톤으로 10분간 고정한 후 공기중에서 건조하였다. 조직절편은 신증후출혈열 또는 한타바이러스 폐증후군 회복기 환자혈청으로 섭씨 37도 30분간 반응시킨 후 인산완충용액으로 3회 세척하여 공기중에서 말린다음 FITC-conjugated anti-Human IgG (KPL, Gaithersberg, MD)으로 섭씨 37도 30분간 반응시킨 후 인산완충용액으로 3회 세척하여 공기중에서 말린다음 형광현미경하에서 관찰하였다.

### 4. Primer

Nested RT-PCR에 사용한 primer들의 nucleotide sequence는 표1과 같다. 역전사과정에 사용한 primer와 1차 PCR에 사용한 MOF103, MOR204 primer들은 한타바이러스속의 3분절 유전자중 G1 당단백질의 유전정보를 가지는 M분절에서 유래되었으며, 현재까지 발표된 한타바이러스속 에 속하는 바이러스들의 염기서열 중 보존이 잘 되어있어 모든 한타바이러스에서 상보성이 가장 높은 부위에서 선택하였다. nested PCR에 사용한 한쌍의 내부 혈청형-특이 primer들은 현재까지 발표되어 있는 각종 한타바이러스의 nucleotide sequence 중 1차 PCR에 의하여 증폭된 상보 DNA내에서 각 혈청형별로 보존이 잘 되어 있는 부위에서 선택하였다. 한탄혈청형-특이 primer들은 한탄혈청형 바이러스에 속하는 HTNV 76/118, Lee, HoJo, A9 균주들의 nucleotide sequence를 참고하였으며 [12, 13], 서울혈청형-특이 primer들은 SEOV 80/39, SR11, R22 균주의 nucleotide sequence를 참고하였으며 [14, 15, 16], Belgrade혈청형-특이 primer들은 Belgrade 1, Dobrava 균주의 nucleotide sequence를 참고하였고 [17], 푸말라혈청형 바이러스-특이 primer들은 PUUV K27, Sotkamo, Hallnas B1 균주의 nucleotide sequence를 참고하였고 [18, 19, 20], Sin Nombre 혈청형 바이러스-특이 primer들은 SNV cc107, New York 균주의 nucleotide sequence를 참고하여 [6, 21] 혈청형 별로 특이 primer들을 합성하였다.

### 5. 역전사-연쇄효소증합반응

Vero E6 조직배양세포에서 배양한 한타바이러스 배양액 및 감염된 햄스터로부터 채취한 소량의 장기조직, 혈액에서 추출한 전체 RNA를 10  $\mu$ l의 DEPC처리한 증류수에 용해시킨 후 1  $\mu$ l (1 pmol)의 primer MOF 103 (표 1)과 잘 섞은 다음 섭씨 72도로 10분간 가열처리하여 불활화시켰다. 그후 섭씨 40도로 식혀 바이러스의 RNA와 primer를 annealing시킨 다음 1  $\mu$ l (10 units)의 placental ribonuclease inhibitor, 2  $\mu$ l의 2.5 mM dNTP mixture, 4  $\mu$ l의 5x superscript reaction buffer, 2  $\mu$ l의 0.1 M dithiothreitol, 1  $\mu$ l (200 units)의 Superscript reverse transcriptase (Gibco-BRL)를 첨가하여 잘 혼합한 후 섭씨 40도에서 1시간 동안 반응시키고 섭씨 95도에서 3분간 가열하여 총 20  $\mu$ l의 한타바이러스 상보 DNA를 합성하였다. 10  $\mu$ l의 상보 DNA에 5  $\mu$ l의 10X PCR reaction buffer, 2  $\mu$ l의 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ l의 2.5 mM dNTP mixture, 1  $\mu$ l (50 pmol)씩의 MOF103, MOR 204 primer쌍과 28.75  $\mu$ l의 DEPC 처리한 증류수, 그리고 0.25  $\mu$ l (1.25 units)의 Taq DNA polymerase를 첨가한 후 Thermo cycler에서 30회 반응시켰다. 각각의 cycle은 섭씨 94도 30초, 섭씨 50도 30초, 그리고 섭씨 72도 2분간의 스텝으로 구성하였다.

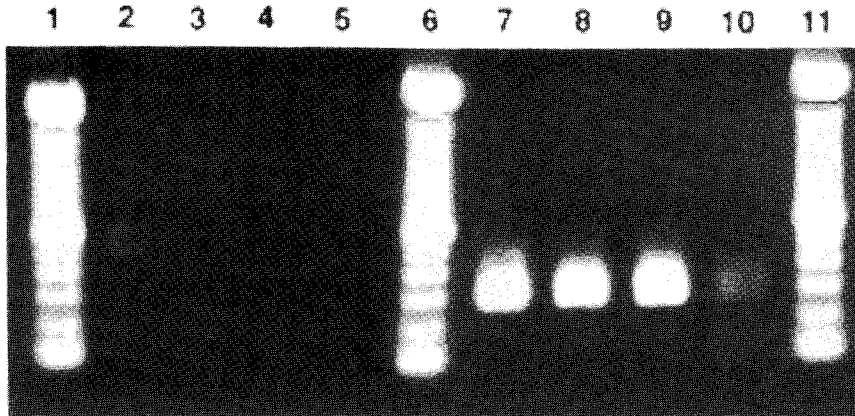
### 6. DNA sequencing

Nested RT-PCR을 하여 얻은 상보 DNA를 TA cloning vector (Invitrogen, Netherland)를 사용하여 클론을 만들었다. 증폭된 PCR산물의 염기서열을 분석하기 위하여 [ $\alpha$ -S<sup>35</sup>]dATP (DuPont NEN, Boston, MA)와 T7 sequencing kit (Pharmacia, Sweden)를 사용하였다. 방사성동위원소로 표식된 DNA를 6% urea-polyacrylamide gel상에서 전기영동한 다음 autoradiography를 실시하였다. 염기서열 분석은 DNASIS (Pharmacia) 프로그램을 사용하여 이미 알려진 한타바이러스 M분절의 염기서열과 비교하였다.

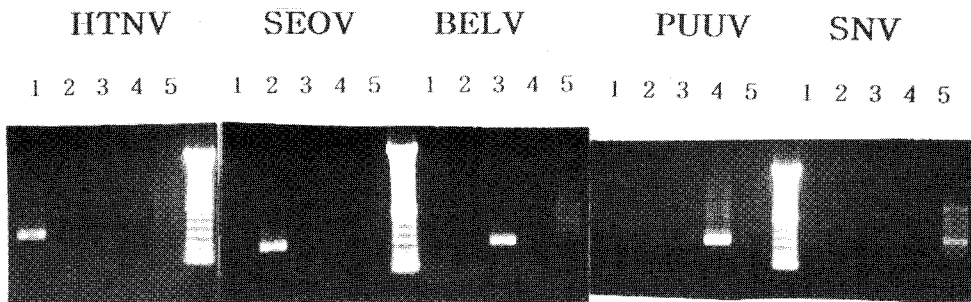
## 결과 및 성적

### 1. nested RT-PCR의 민감도

실험에 사용한 각각의 한타바이러스를 일정량으로 계단희석하여 6 well plate에 접종한 7-10일 후 neutral red로 염색하는 plaque assay방법으로



**Fig. 1.** Sensitivity of the nested RT-PCR. Agarose gel electrophoresis of nested RT-PCR products was performed in 1.2% agarose and TAE buffer. Lanes 1, 6 and 11 contain 100bp DNA ladder size marker (BRL). Lanes 2 to 5 show RT-PCR products produced by outer generic primers MOF 103 and MOR 204, when 1,000 PFU to 1 PFU of HTNV76-118 virus were added to the patient's convalescent sera. Lanes 7 to 10 display nested PCR products generated with HTNV serotype-specific primers, from the first round products. This result demonstrated that nested PCR products can be obtained when as little as 1 PFU of virus is present.



**Fig. 2.** Specificity of nested RT-PCR. Agarose gel electrophoresis of PCR products was performed in 1.2% agarose. Shown are nested RT-PCR products obtained from 5 different serotype viruses RNA amplified by using HTN (lane 1), SEO (lane 2), BEL (lane 3), PUU (lane 4) and SN (lane 5) serotype-specific primers. PCR products are shown in comparison to 100-bp DNA ladders (BRL).

바이러스의 plaque forming units (PFU)를 산출하였다. 1 PFU에서 1,000 PFU 되도록 중화항체역가가 높은 신증후출혈열 회복기 환자혈청 및 햄스터 항혈청에 바이러스를 회석하여 4도에서 일주 야시킨 다음 바이러스의 RNA 핵산을 추출하였다. MOF103 primer를 사용한 역전사방법으로 상보 DNA를 합성한 후 MOF103과 MOR204 primer를 사용하여 1차 PCR을 실시하였다. 증폭된 상보 DNA 2  $\mu$ l를 주형으로 각각의 바이러스 특이 primer를 사용하여 nested PCR을 실시한 결과 그림 1에서와 같이 1차 PCR을 실시하였을 때 1,000 PFU 미만의 바이러스를 검출할 수 없었으나, 혈청형 특이 primers를 사용한 nested RT-PCR을 실시하여 1 PFU의 바이러스를 검출할 수 있어 상

당히 높은 민감도를 나타내는 것을 볼 수 있었으며, 실험에 사용한 각각의 서로다른 혈청형 한타바이러스 모두에서 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

## 2. 혈청형-특이 primer 쌍의 특이성

1차로 증폭된 각각의 서로 다른 혈청형바이러스에 대한 상보 DNA를 주형으로 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라, Sin Nombre 혈청형 바이러스-특이 primer쌍을 사용하여 nested PCR을 실시한 결과 그림 2에서와 같이 각각의 혈청형 특이 primer쌍은 같은 혈청형에 속하는 바이러스의 핵산을 증폭시킬 뿐 다른 혈청형 바이러스의 핵산은 증폭시키지 않음을 알 수 있었다.

**Table 1.** Nucleotide sequence of Hantavirus genus-reactive and serotype specific primers

Name	Nucleotide position	Primer sequence	Sense	Function	Products (bps)	
Genus-specific	MOF103	1190-1212	5'>GGACCAGGTGCAGCTTGTGAAGC<3'	+	cDNA synthesis and downstream primer	490bp
	MOR204	1661-1680	5'>ACCTCACAAACCATTGAACC<3'	-	1' PCR upstream primer	
HTNV	HTN G1F	1343-1362	5'>TGCAACGGGCAGAGGAAAGT<3'	+	nested PCR downstream primer	285bp
	HTN G1R	1604-1625	5'>GTACTGATTTTAGCCTATTCTC<3'	-	nested PCR upstream primer	
SEOV	SEO G1F	1343-1362	5'>TGTAATGGTCAGAAAAAGAC<3'	+	nested PCR downstream primer	289bp
	SEO G1R	1607-1629	5'>CGTAGAATGGCTTTGAATCGGTT<3'	-	nested PCR upstream primer	
BELV	BEL G1F	1308-1327	5'>ATGCCAGCGAGTCGACCAA<3'	+	nested PCR downstream primer	293bp
	BEL G1R	1580-1599	5'>GAGCTATTATGTAAGATTGC<3'	-	nested PCR upstream primer	
PUUV	PUU G1F	1296-1315	5'>GTGTCCAGAGATTCCGTGGT<3'	+	nested PCR downstream primer	327bp
	PUU G1R	1599-1620	5'>GAACATAAGTATGCGAATGCAA<3'	-	nested PCR upstream primer	
SNV	SN G1F	1291-1312	5'>GTCCAAAAATTTAGAGGTTTCAG<3'	+	nested PCR downstream primer	333bp
	SN G1R	1600-1621	5'>AATAGTGCAGCATGAGAAGGT<3'	-	nested PCR upstream primer	

### 3. Nested RT-PCR로 증폭된 바이러스 핵산의 염기서열 분석

한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라, Sin Nombre 혈청형 바이러스 특이 primer쌍을 사용하여 nested PCR을 실시하여 얻은 상보 DNA를 TA PCR cloning vector에 넣어 클론을 사용하여 핵산염기서열을 분석하여 보았다. 핵산염기서열 분석에 사용한 primer는 TA vector plasmid의 universal primer와 reverse primer를 사용하여 삽입된 상보 DNA의 염기서열을 분석하였으며, 이것이 바이러스로부터 유래된 상보 DNA인지 확인하였다. 혈청형 특이 primer쌍을 사용하여 얻은 각각 285bp, 289bp, 293bp, 327bp, 333bp크기의 한탄, 서울, 벨그레이드, 푸말라, Sin Nombre 혈청형 바이러스 상보 DNA는 기존에 발표된 각각의 바이러스 염기서열과 동일한 것임을 확인할 수 있었다.

### 4. 감염시킨 실험동물 혈액중의 바이러스 검출

5가지 혈청형 한타바이러스들인 HTNV 76/118, SEOV 80/39, BELV 1, PUUV K27, SNV CC107바이러스들을 각각 1,000 PFU씩 실험동물 햄스터의 근육내로 접종한 후부터 4일 간격으로 안와 정맥총에서 100  $\mu$ l의 혈액을 채혈하여 Trizol™ 1 ml에 잘 섞은 다음 실험에 사용할 때 까지 영하 80도의 냉동고에 저장하였다. 채취한 혈액으로부터 전체 RNA를 추출한 다음 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR로 검출한 결과 표2에서와 같이 각각의 혈청형바이러스에 감염된 실험동물 햄스터의 혈액으로부터 바이러스 접종후 8일된 혈액으로부터 바이러스가 검출되기 시작하였으며, 접종 후 2주 된 혈액으로부터 바이러스를 검출할 수 있었다.

### 5. 감염된 실험동물 조직중의 바이러스 검출

5가지 혈청형 한타바이러스들인 HTNV 76/118,

## 고 찰

SEOV 80/39, BELV 1, PUUV K27, SNV CC107 바이러스들을 각각 1,000 PUF씩 실험동물 햄스터의 근육내로 접종 30일후에 감염된 햄스터로부터 폐장조직 및 신장조직을 채취하였다. 채취한 조직의 일부는 5 마이크론의 두께로 냉동절편을 만들어 형광항체법으로 조직중의 바이러스 항원을 조사한 결과 표3에서와 같이 한탄바이러스와 푸말라바이러스를 접종한 햄스터에서 바이러스 항원을 검출하였으나, 서울바이러스와 벨그레이드 바이러스 및 미국의 SNV CC107 바이러스를 접종한 햄스터의 조직으로 부터는 바이러스항원을 검출할 수 없었다. 조직의 일부는 멸균한 이쑤시개로 소량을 떼어내어 Trizol™ 1 ml에 넣은 후 유리 조직분쇄기를 사용하여 조직부유액을 만든 다음 조직중의 전체 RNA를 추출하였다. 그 후 혈청형 특이 primer를 사용한 nested RT-PCR로 조직중의 바이러스 핵산을 검출한 결과 표3에서와 같이 각각의 혈청형 바이러스에 감염된 실험동물 햄스터의 폐장조직과 신장조직에서 바이러스 핵산을 검출할 수 있었다.

**Table 2.** Detection of virus RNA from blood of each serotype hantavirus infected hamsters by nested RT-PCR

Virus	Virus detection days after infection on					
	D-4	D-8	D-12	D-16	D-23	D-30
HTNV	4/5	1/5	0/5	0/5	2/5	1/5
SEOV	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	1/5
BELV	0/5	3/5	2/5	0/5	1/5	2/5
PUUV	3/5	2/5	0/5	1/5	0/5	2/5
SNV	0/5	4/5	3/5	0/5	2/5	2/5
Mock	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

한타바이러스에 의한 질환은 신증후출혈열의 경우 바이러스에 감염된 후 감기와 비슷한 증상이 나타나지만 곧이어 돌발적인 고열을 동반하면서 오한, 두통 등의 전신증상이 나타난다. 질병이 점차 진행하면서 온몸에 출혈성 반점이 생기고 심한 경우 코와 입으로 출혈을 하며 신장의 기능이 상실되어 결국 쇼크를 일으켜 사망하게 된다 [3]. 최근 미주대륙에서 발병하는 한타바이러스 폐증후군은 신장의 질환이 아닌 비심장성 폐부종 (non-cardiogenic pulmonary edema)을 일으켜 사망하게 된다 [6].

우리나라의 경우 한탄바이러스와 서울바이러스를 병원체로 하는 신증후출혈열이 년 1,000명 정도 발생하고 있는 것으로 보고되고 있으며 [22], 출혈열 발생지역에 서식하는 등줄쥐와 집쥐에서 원인바이러스가 분리된 바 있다. 그러나 최근의 미발표보고에 의하면 우리나라에서 발생하는 환자의 혈청진단결과 유럽에서 주로 발생하는 경증의 신증후출혈열 병원체인 푸말라바이러스에 높은 항체가를 나타내거나, 이 바이러스에만 항체반응을 나타내는 환자가 있음이 알려지고 있으나 아직 원인바이러스와 이 바이러스의 숙주동물이 보고된 바 없으며, 또한 미주대륙에서 발생하는 한타바이러스 폐증후군과 유사한 임상 증상을 나타내는 환자 발생은 보고된 바 없다. 우리나라에서 발생하는 원인불명의 한타바이러스를 조사하기 위하여 본 연구에서 개발한 민감하고 각각의 혈청형 바이러스에 특이적으로 반응하는 혈청형-특이 primer쌍들을 사용한 nested RT-PCR을 이용하여 한타바이러스 숙주동물인

**Table 3.** Detection of virus RNA from the lung and kidney tissues of each hantavirus infected hamsters by nested RT-PCR

Virus	Antigen detection in			
	Lung		Kidney	
	IFA	Nested RT-PCR	IFA	Nested RT-PCR
HTNV HW	5/5	5/5	5/5	5/5
SEOV 80/39	0/5	5/5	0/5	5/5
BELV Belgrade 1	0/5	5/5	0/5	5/5
PUUV K27	0/5	5/5	0/5	5/5
SNV NY	0/5	5/5	0/5	5/5
Uninfected	0/5	0/5	0/5	0/5

설치류의 조직을 검사하여 조사할 수 있을 것이다. 또한 분리된 바이러스의 혈청형을 조사하기 위하여 사용하는 플라크 감소 중화시험법은 살아있는 바이러스를 직접 배양하여야 하므로 실험자의 감염위험으로부터 안전을 도모하기 위하여, BL3시설이 갖추어진 실험실이 필요할 뿐만 아니라 중화실험을 위하여 많은 시간과 노력이 필요한 방법이다. 따라서 바이러스 감염위험으로부터 안전한 실험과 분리된 바이러스의 간편하고 신속한 감별진단을 위하여 본 연구에 사용된 혈청형 특이 primer를 사용할 수 있을 것이다.

현재까지 한타바이러스에 감염된 실험동물에서 사람의 경우에서와 같은 동일한 임상증상을 나타내는 실험동물 모델을 알려진 바 없다. 태어난지 48시간 이내의 새끼 마우스나 햄스터를 한탄바이러스의 병원성 분석을 위하여 종종 사용되어 왔다. 바이러스를 접종한 새끼 설치류는 뇌, 폐장, 간장 등의 조직에서 광범위한 염증과 조직괴사를 일으켜 접종 2-3주 후에 폐사하는 것으로 알려져 있다 [23]. 또한 개발된 항바이러스제 및 백신의 유효성을 검증하기 위하여는 한타바이러스 혈청형에 따른 숙주동물의 차이로 인하여 혈청형바이러스에 따라 실험동물을 달리하여야 하는 어려움이 있다. 등줄쥐를 숙주동물로 하는 한탄바이러스를 햄스터 또는 실험용 랫트에 접종하였을 때, 햄스터의 폐장 및 신장조직으로부터 바이러스 항원을 형광항체법으로 검출할 수 있으나, 랫트의 조직으로부터는 검출할 수 없었다. 또한 집쥐를 숙주동물로 하는 서울혈청형 바이러스를 한탄혈청형바이러스가 잘 증식하는 등줄쥐 또는 햄스터에 감염시켰을 때, 두 동물 모두 높은 항체역가를 나타내나 조직으로부터 형광항체법으로 바이러스항원을 검출할 수 없었다. 푸말라혈청형 바이러스의 경우에서도 마찬가지로 *Clethrionomys glareolus*를 사용하여 형광항체법에 의하여 바이러스 항원을 검출할 수 있다 [24, 25, 26, 27]. 그러나 본 연구에서는 5가지의 서로다른 혈청형 바이러스로 감염시킨 햄스터 조직 중의 바이러스를 혈청형 특이 primer쌍을 이용하여 nested RT-PCR로 검사하였을 때 높은 율로 바이러스를 검출할 수 있었다. 따라서 혈청형 특이 primer쌍을 이용한 nested RT-PCR방법을 사용함으로써 바이러스의 혈청형에 따라 실험동물을 달리하여야 하는 불편함을 해소할 수 있으며, 감염된 바이러스의 항원을 검출하는

데 있어 기존의 간접형광항체법에 의한 검사를 대신할 수 있을 것으로 사려된다. 또한 감염된 실험동물 및 환자의 혈액중의 한타바이러스를 검출하며 바이러스를 분리배양하기 위하여는 백혈구 및 림프구를 별도 분리하여야 하는 등 바이러스 분리배양에 많은 어려운 점이 있었다. 그러나 혈청형 특이 primer쌍을 이용한 nested RT-PCR방법을 사용함으로써 신증후출혈열에 감염된 초기환자의 혈액 및 감염된 실험동물로부터 채취한 혈액으로부터 원인 바이러스를 신속하게 감별진단 할 수 있을 것으로 사려된다.

## 결 론

각종 한타바이러스에 감염된 실험동물의 혈액 및 장기조직으로부터 바이러스 감염유무를 신속하고 민감하게 특이적으로 확인할 수 있는 한타바이러스 혈청형 특이 primer를 사용하는 역전사-중합효소 연쇄반응에 의한 진단방법을 개발하였다. 한타바이러스속에 공통으로 작용하는 한쌍의 외곽 primer는 M 절편의 G1 당단백질 부위의 보존이 잘되어 있는 부위에서 선택되었으며, 내부의 혈청형 특이 primer쌍들은 각각의 혈청형 바이러스별로 보존이 잘되어 있는 부위에서 선택되었다. 이들 혈청형 특이 primer를 사용하는 역전사-중합효소 연쇄반응으로 1 PFU의 바이러스를 확인할 수 있는 민감도를 나타내었으며, 타혈청형에 속하는 바이러스들에는 반응을 하지않는 특이성을 나타내었다. 기존의 형광항체법으로는 검출할 수 없었던 조직중의 바이러스항원을 새로이 개발된 역전사-중합효소 연쇄반응법으로 검출할 수 있어 한타바이러스 혈청형에 따라 실험동물을 달리 사용하여야 하는 불편함을 제거할 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. Lee HW, van der Groen G: Hemorrhagic fever with renal syndrome. Prog Med Virol 36: 62-102, 1989.
2. Lee HW, Lee PW, Johnson KM: Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. J Infect Dis 137: 298-308, 1978.
3. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM: Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean

- hemorrhagic fever from wild urban rats. *J Infect Dis* 146: 638-644, 1982.
4. Avisic-Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, Gligic A, van der Groen, LeDuc JW: Characterization of Dobrava virus: hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol* 38: 132-137, 1992.
  5. Niklasson B, LeDuc JW: Isolation of the nephropathia epidemica agent in Sweden. *Lancet* I: 1012-1013, 1984.
  6. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morznov S, Rollin PE, Ksaizek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ: Genetic identification of a novel hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern United States. *Science* 262: 914-917, 1993.
  7. Lee HW, Ahn CN, Song JW, Baek LJ, Seo TJ, Park SC: Field trial of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. *Arch Virol* 1990 (Suppl. 1): 35-47, 1990.
  8. Song G, Hang CS, Huang YC, Hou FY: Preliminary trials of inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Lancet* 337: 801 (Letter) 1991.
  9. Lee HW, Lee PW, Baek LJ, Song CK, Seong IW: Intra-specific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am Soc Trop Med Hyg* 30: 1106-1112, 1981.
  10. Tkachenko EA, Bashkirtsev VN, van der Groen G, Dzagurova TK, Ivanov AP, Ryltseva EV: Isolation in Vero-E6 cells of Hantavirus from *Clethrionomys glareolus* captured in the Bashkiria area of the U.S.S.R. *Annales de la Societe belge de médecine tropicale* 64: 425-426, 1984.
  11. Song JW, Baek LJ, Gajdusek DC, Yanagihara R, Gavrillovskaya I, Luft BJ, Mackow ER, Hjelle B: Isolation of pathogenic hantavirus from white footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Lancet* 344: 1637, 1994.
  12. Schmaljohn CS, Schmaljohn AL, Dalrymple JM: Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology* 157: 31-39, 1987.
  13. Schmaljohn CS, Arikawa J, Hasty SE, Ramussen L, Lee HW, Lee PW, Dalrymple JM: Conservation of antigenic properties and sequences encoding the envelope proteins of prototype Hantaan virus and two virus isolates from Korean haemorrhagic fever patients. *J Gen Virol* 69: 1949-1955, 1988.
  14. Antic D, Lim BU, Kang CY: Molecular characterization of the M genomic segment of the Seoul 80-39 virus: Nucleotide and amino acid sequence comparisons with other hantaviruses reveal the evolutionary pathway. *Virus Res* 19: 47-58, 1991.
  15. Arikawa J, Lapenotiere HF, Iacono-Connors L, Wang M, Schmaljohn CS: Coding properties of the S and the M genome segments of Sapporo rat virus: comparison to other causative agents of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Virology* 176: 114-125, 1990.
  16. Xu X, Ruo SL, Tang Y, Fisher-Hoch SP, McCormick JB: Molecular characterization and expression of glycoprotein gene of Hantavirus R22 strain isolated from *Rattus norvegicus* in China. *Virus Res* 21: 35-42, 1991.
  17. Avisic-Zupanc T, Toney A, Anderson K, Chu YK, Schmaljohn CS: Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the *Hantavirus* genus, family *Bunyaviridae*. *J Gen Virol* 76: 2801-2808, 1995.
  18. Giebel L, Stohwasser R, Zoller L, Bautz E, Darai G: Determination of coding capacity of the M genome segment of nephropathia epidemica virus strain Hallnas B1 by molecular cloning and nucleotide sequence analysis. *Virology* 172: 498-505, 1989.
  19. Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Salonen EM, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A: Cloning and sequencing of Puumala virus Sotkamo strain S and M segments: evidence for strain variation in hantaviruses and expression of the nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 73: 829-838, 1992.
  20. Xiao SY, Spik KW, Li D, Schmaljohn CS: Nucleotide and deduced amino acid sequences of the M and S genome segments of two Puumala



- virus isolates from Russia. *Virus Res* 30: 97-103, 1993.
21. Hjelle B, Lee SW, Song WM, Torrez-Martinez N, Song JW, Yanagihara R, Gavrilovskaya I, Mackow E: Molecular linkage of Hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: Genetic characterization of the M genome of New York virus. *J Virol* 69: 8137-8141, 1995.
  22. Lee HW: Hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Rev. Infect. Dis. Suppl* 2: 864, 1989.
  23. Kim GR, McKee KT, Jr: Pathogenesis of hantaan virus infection in suckling mice: clinical, virologic and serologic observations. *Am J Trop Med Hyg* 344: 388-395, 1985.
  24. Chu YK, Jennings GB, Schmaljohn CS: A vaccinia virus-vectored hantaan virus vaccine protects hamsters from challenge with hantaan and seoul viruses but not puumala virus. *J Virol* 69: 6417-6423, 1995.
  25. Lundvist A, Kallio-Kokko H, Sjölander KB, Lankinen H, Niklasson B, Vaheri A, Vapalahti O: Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: Identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. *J Virol* 70: 2163-2169, 1996.
  26. Yamanouchi T, Domae K, Tanishita O, Takahashi M, Yamanishi K, Takahashi M, Kurata T: Experimental infection in newborn mice and rats by hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus. *Microbiol Immunol* 28: 1345-1353, 1984.
  27. Yu Y, Yiao X, Dong G: Comparative studies of the immunogenicity of different types of HFRS inactivated vaccines made in China. *JEHFRS Bull* 3: 64-68, 1989.
-