

개 디스토펜퍼 바이러스의 신속검출법 개발

김 두¹ · 안소저 · 권혁무
강원대학교 수의학과

Development of Rapid Detection Technique for Canine Distemper Virus

Doo Kim¹, So-jeo Ahn and Hyuk-moo Kwon

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

ABSTRACT : Recently many cases of canine distemper have occurred in Korea despite vaccination was carried out nationwide. This study was performed to establish rapid diagnosis of canine distemper by RT-PCR, nested PCR, and serological test. A total of 30 dogs, which were suspected canine distemper clinically, was examined. RT-PCR and nested PCR were specific for the amplification of CDV H gene and sensitive to detect 7 TCID₅₀ of Onderstepoort strain. By RT-PCR, H gene was detected in 6(20%) of 30 peripheral bloods from dogs. And H gene was detected in 10(33.3%) of 30 samples by nested PCR. H gene was detected from 1 brain of 6 years-old Beagle dog and 1 lung of 2 months-old Shih-tzu dog, in which peripheral blood H gene was not detected. Serum neutralizing antibody titer against Onderstepoort strain ranged from 4 to 1,024 in 30 patients. No correlation was observed between the results of nested PCR and titers of neutralizing antibody.

Key words : Canine distemper, H gene, RT-PCR, nested PCR.

서 론

개 디스토펜퍼는 개를 비롯한 족제비과, 너구리과 육식동물에게 전염성이 매우 높은 급성 또는 아급성의 열성 전염병이며 전세계적으로 높은 이환율과 폐사율을 나타내는 바이러스성 질병이다^{7-10,17,23}.

개 디스토펜퍼의 원인체인 개 디스토펜퍼 바이러스(canine distemper virus; CDV)의 genome은 negative single stranded RNA로서 크기는 약 16,000 bp이다⁵. CDV는 nucleocapsid와 관련된 3개의 nucleocapsid(NP) protom, phospho(P)protein 및 large(L) protein과 막과 관련된 matrix(M) protein, fusion(F) protein과 attachment(H) protein으로 구성되어 있다^{3,28}. 이중 CDV의 spike 구조인 H protein은 바이러스가 숙주세포에 적절하게 부착하는 역할을 한다⁵.

개 디스토펜퍼는 1960년 초기부터 병원성을 약화시킨 바이러스 백신에 의해 예방되어 왔으나 예방접종을

실시함에도 불구하고 최근에 유럽과 미국에서 전형적인 개 디스토펜퍼의 발생이 증가되고 있으며, 일본에서도 백신을 접종한 개와 백신을 접종하지 않은 개, 그리고 야생 너구리에서 개 디스토펜퍼 발생의 증가가 보고되었다^{6,11-13,18}. 그리고 최근 몇 년간 미국 내의 여러 동물원에서 고양이과 야생동물 사이에 지방병성의 서로 다른 유형의 CDV 감염증이 보고되었고, 탄자니아 국립동물원 내에서 폐사한 상당수의 사자들이 CDV에 감염되었음이 보고되었다^{2,16,24,26}. 또한 CDV는 육상 동물뿐만 아니라 수중 육식 동물에서도 자연적으로 감염되는 것으로 알려졌다²⁴.

다양한 임상증상을 보이는 개는 감염 초기 몇 주 동안 낮은 항체 반응을 보이지만 모체 이행항체를 갖는 강아지와 예방접종을 한 개는 높은 중화 항체역가를 보인다³. 그러므로 CDV에 대한 중화 항체 검출은 감염견의 진단에 완전한 방법이 되지 못한다²⁹. 조직 배양에 의한 CDV의 분리는 감염을 결정하는 효과적인 방법이지만 바이러스의 분리는 수일에서 수주가 소요되며 감염된 개가 급성 단계가 아니면 흔히 실패한다³. 면역형광법, 면역조직화학법과 봉입체의 염색과 같은 다른 실험실적 진단법은 아급성이나 만성 예

이 논문은 (1998)년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.

¹Corresponding author.

에서 음성으로 나타날 수 있다. 따라서 임상적으로 CDV 감염의 실험실적인 진단을 위하여 신속하고 예민한 진단법이 필요하다.

최근에 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의하여 morbillivirus의 감염이 진단되었다. Godec 등¹⁴은 measles virus의 주요 구조 단백질 유전자의 증폭에 의하여 아급성 경화성 범뇌염의 뇌 조직으로부터 measles 바이러스 유전자를 검출하였다. 그리고 다른 연구자들에 의하여 phocine distemper virus의 인단백질의 유전자도 자연감염되거나 인공감염시킨 물범의 조직에서 검출되었다¹⁴. Shin 등²⁹은 임상적으로 CDV 감염이 의심되는 환축에서 CDV의 nucleocapsid 유전자를 검출하기 위한 RT-PCR를 실시하였고 중화 항체를 조사하였다.

그 동안 개 디스토펜에 관한 국내 연구로는 한국산 재래견에 대한 혈청학적 조사, 백신 미접종견에서의 항체 양성율에 대한 조사보고와 야생 너구리에서의 디스토펜 감염 증상이 보고되었다^{30-32,34}. 그리고 분자 생물학적 방법을 이용한 CDV 검출 및 진단에 관한 연구로서 진도견으로부터 분리한 CDV의 H 유전자의 분자 생물학적 특성이 보고되었고, 분자 생물학적 방법을 이용한 말초 혈액 단핵구에서의 CDV의 nucleocapsid 유전자의 검출이 보고되었다^{1,31}.

국내에서 개 디스토펜 백신을 접종함에도 불구하고 최근 임상형 개 디스토펜의 발생이 증가하였다. 이에 본 연구에서는 임상적으로 CDV 감염이 의심되는 환견의 빠른 진단을 위하여 말초 혈액과 부검 조직을 이용한 CDV의 H 유전자 검출을 위한 RT-PCR 기법과 nested PCR 기법을 확립하였으며, 이들 환축의 PCR 결과와 중화 항체를 비교 검토하였다.

재료 및 방법

공시 재료

1999년 3월부터 1999년 10월까지 서울, 경기도와 강원도 지역의 동물병원에 내원한 환견 중 CDV 감염으로 추정되는 30두의 환축에서 RT-PCR에 필요한

RNA를 분리하기 위하여 말초 혈액을 채취하였고, 30두중 만성형으로 진행되어 신경증상이 나타나 축주가 치료를 포기한 7두를 안락사시켜 뇌와 폐조직을 채취하였다. 혈청 중화항체 역기는 30두의 경정맥에서 2 ml의 혈액을 채취후 혈청을 분리하여 측정하였다.

H 유전자 검출을 위한 RT-PCR

말초혈액에서 RNA 분리: 개의 말초혈액 1 ml를 heparin으로 항응고처리한 후, Blood RNA Kit[®](OMEGA BIOTEK, USA)를 이용하여 생산자가 권장하는 방법에 따라 total RNA를 분리하였다.

뇌와 폐조직에서 RNA 분리: 채취된 조직에서 RNA 분리를 위하여 뇌와 폐조직 2g을 멸균된 가위로 세절한 다음 tissue grinder에 넣고 DEPC 처리된 멸균 PBS를 2 ml 첨가, 마쇄하여 유제 처리를 하였고 유제액을 10,000×g에서 20분 동안 원심 후 상층액을 수거하였다. 상층액 500 μl에 protomase(20 mg/ml) 20 μl를 첨가한 후 70°C에서 3시간 동안 배양하였다. 동량의 phenol:chloroform(1:1)을 첨가하고 진탕한 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. Phenol:chloroform (1:1) 추출을 2회 더 반복한 다음 추출한 상층액과 동량의 chloroform을 넣은 후, 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 500 μl의 isopropanol과 20 μl의 RNA binding resin을 첨가하여 혼합하였다. 그리고 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후, 바이러스 RNA가 부착된 resin을 75%의 4°C의 ethanol로 2회 세척하고 건조한 다음 DEPC로 멸균 처리된 증류수 60 μl에 부유시켜 cDNA 합성에 사용하였다.

Oligonucleotide primer의 제조

RT-PCR에 사용한 primer 1(P1)과 primer 2(P2)는 CDV의 Convac 백신주 H 유전자에 존재하는 보전역만을 증폭시킬 수 있는 것으로 안 등³³이 설계한 것을 사용하였다. Nested PCR에 사용한 primer 3(P3)과 primer 4(P4)는 Convac 백신주의 H 유전자의 RT-PCR 생산물 내부에서 설계하였다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide primers for amplification of haemagglutinin(H) gene of canine distemper virus

Primer	Oligonucleotide	Location*	Length of fragment(bp)
P1	5'CGGGATCCAGCAATGCTCTCCTACCAA3'	14~40	1,881
P2	5'CGGGATCCTCTCACACAGTTATCATGC3'	1,878~1,897	
P3	5'AGAGCCAATTCAACCAAGC3'	69~87	1,582
P4	5'GTCCGGATTGGGTCATAAAC3'	1,632~1,651	

*Numbers of nucleotide sequences were from EMBL accession No. Z35493.

Single stranded cDNA 작성

Single stranded cDNA 합성을 위하여 바이러스 RNA 용액 15 μ l에 100 pM P1을 1 μ l 첨가한 후, 70°C에서 10분간 반응시키고 얼음에서 2분간 정치한 후, 12,000 rpm에서 5초간 원심하였다.

상기 용액에 first strand 5 \times buffer (250 mM Tris-HCl(pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 5 μ l, 0.1M DTT 2.5 μ l, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ μ l, GIBCO BRL, USA) 5 μ l, 10 mM deoxynucleotide triphosphates (dATP, dCTP, dGTP와 dTTP; dNTP) 2 μ l, ribonuclease inhibitor (RNasin[®], Promega, USA) 0.5 μ l 를 첨가하여 45°C에서 2시간 반응시켰다.

PCR

PCR은 합성된 single stranded cDNA 10 μ l를 template로 하여 멸균된 증류수 63 μ l, 10 \times PCR buffer [20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glycerol, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P40] 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 12 μ l, 10 mM dNTPs 2 μ l, 100 pM P1 1 μ l, 100 pM P2 1 μ l, 5 unit의 *Taq* DNA polymerase(Promega) 1 μ l를 혼합하여 총 100 μ l가 되도록 조성하였다. PCR 반응액을 thermal cycler(GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 95°C에서 1분간 denaturation시킨 뒤, 94°C에서 1분간 denaturation, 50°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension하는 과정을 40회 반복하여 증폭시켜 최종적으로 72°C에서 5분간 extension시켰다. 증폭된 PCR 산물의 확인은 TBE buffer(0.1 M Tris base, 0.1 M boric acid, 1.8 mM ethylenediaminetetraacetic acid)를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, ethidium bromide 용액(10 μ g/ml)으로 염색하여 UV-transilluminator (BIO-RAD, USA)를 이용하여 1,881 bp의 PCR 생산물을 관찰하였다.

Nested PCR

Nested PCR은 RT-PCR 생산물 5 μ l를 template로 하여 멸균된 증류수 70 μ l, 10 \times PCR buffer 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 10 μ l, 10 mM dNTPs 2 μ l, 100 pM P3 1 μ l, 100 pM P4 1 μ l, 5 unit의 *Taq* DNA polymerase (Promega) 1 μ l를 혼합하여 총 100 μ l가 되도록 조성하였다. PCR 반응액을 thermal cycler를 이용하여 95°C에서 1분간 denaturation시킨 뒤, 94°C에서 1분간 denaturation, 38°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분

간 extension하는 과정을 35회 반복하여 증폭시킨 후, 최종적으로 72°C에서 5분간 extension시켰다. 증폭된 PCR 산물의 확인은 TBE buffer를 전해질로 사용한 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후, ethidium bromide 용액(10 μ g/ml)으로 30분간 염색한 뒤, UV-transilluminator를 이용하여 1,582 bp의 PCR 생산물을 관찰하였다.

RT-PCR과 nested PCR의 특이성 검사

CDV의 H 유전자의 검출을 위한 RT-PCR의 특이성을 확인하기 위하여, CDV의 표준 바이러스인 Onderstepoort주와 개에서 문제시되는 canine influenza virus, canine coronavirus, canine parvovirus, canine adenovirus type 1을 국립수의과학검역원에서 분양받아 대조 바이러스로 사용하였다.

상기 바이러스 조직배양 상층액에서 Blood RNA Kit[®]를 사용하여 RNA를 순수분리하였고, PCR 반응의 음성 대조를 위하여 template 만을 제외한 동일한 조건으로 RT-PCR과 nested PCR을 실시한 다음 1% agarose gel에서 전기영동하여 CDV의 H 유전자의 특이적인 증폭산물인 1,881 bp와 1,582 bp의 band의 존재 여부를 확인하였다.

RT-PCR과 nested PCR의 민감성 검사

RT-PCR에 의하여 검출 가능한 CDV RNA의 최소량을 조사하기 위해서, 표준 바이러스인 Onderstepoort주를 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7 그리고 3TCID₅₀을 함유하는 배양 상층액에서 RNA를 순수분리하여 P1과 P2를 이용한 RT-PCR과 P3과 P4를 이용한 nested PCR을 위와 같은 방법으로 실시하였다.

혈청 중화항체가 조사

CDV에 대한 중화항체의 보유와 발병, PCR과의 상관 관계를 조사하기 위하여, 96 well plate에 vero cell을 10% fetal bovine serum을 첨가한 Eagle's MEM으로 배양하였다. 56°C에서 30분간 비동화시킨 혈청을 1:2,560까지 PBS로 2배 단계희석하였고, 동량의 100 TCID₅₀을 함유하는 Onderstepoort strain을 동량의 희석된 혈청과 혼합한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하였다.

혼합액을 96 well plate에 4일간 배양하여 단층이 형성된 vero cell에 접종한 후 1주일 동안 매일 개 디스토포 바이러스에 의하여 유발된 세포 변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 확인하여 CPE가 50% 억제되는 최대 희석배수의 역수를 항체 역가로 결정하였다.

결 과

CDV 감염의 신속 진단을 위하여 1999년 3월부터 1999년 10월까지 서울, 경기도 그리고 강원도에서 임상적으로 CDV 감염으로 추정되는 30두의 환축으로부터 채취한 말초혈액과 조직을 대상으로 RT-PCR과 nested PCR을 실시하였으며 이들 환축의 중화 항체가를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

RT-PCR과 nested PCR의 특이성

CDV의 H 유전자 검출을 위한 RT-PCR과 nested PCR의 특이성을 확인하기 위하여, CDV의 표준 바이러스 주인 Onderstepoort주와 개에서 문제시되는 canine influenza virus, canine coronavirus, canine parvovirus, canine adenovirus type 1에서 순수 분리한

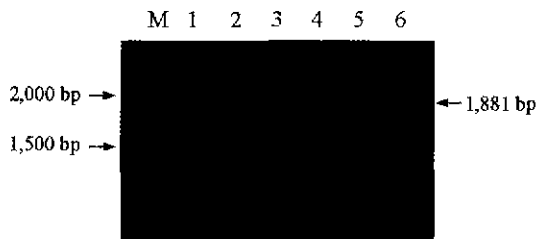


Fig 1. Specificity of RT-PCR for amplification of H gene of CDV. Lane M, DNA size standard(Amplisize, BIO-RAD); lane 1, Onderstepoort strain of CDV; lane 2, canine parainfluenza virus; lane 3, canine coronavirus; lane 4, canine parvovirus; lane 5, canine adenovirus type 1; lane 6, negative control. The numbers at left indicate size of DNA marker. The number at right indicates the expected size of PCR product.

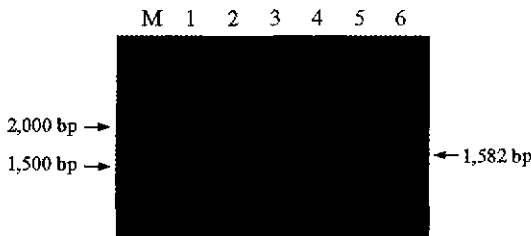


Fig 2. Specificity of nested PCR for amplification of H gene of CDV. Lane M, 1 Kb ladder(BIOTOOLS, Spain); lane 1, Onderstepoort strain of CDV; lane 2, canine parainfluenza virus, lane 3, canine coronavirus, lane 4, canine parvovirus; lane 5, canine adenovirus type 1, lane 6, negative control. The numbers at left indicate size of DNA marker The number at right indicates the expected size of PCR product

DNA와 RNA를 template로 사용하여 RT-PCR로 H 유전자를 증폭시켜 확인한 결과 표준 바이러스인 Onderstepoort주에서만 예측하였던 1,881 bp의 특이 band가 확인되었고, 기타의 바이러스에서는 증폭산물이 확인되지 않았다(Fig 1).

상기 바이러스의 RT-PCR 증폭 산물을 template로 사용한 nested PCR 결과 표준 바이러스인 Onderstepoort주에서만 예측하였던 1,582 bp의 특이 band가 확인되었고 기타의 바이러스에서는 증폭산물이 확인 되지 않았다(Fig 2)

RT-PCR과 nested PCR의 민감성

RT-PCR에 의하여 검출 가능한 개 디스토펙 바이러스의 최소량을 조사하기 위하여, Onderstepoort주를 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7 그리고 3TCID₅₀을 함유하는 배양 상층액에서 RNA를 순수 분리하여 RT-PCR과 nested PCR을 실시한 결과 RT-PCR에서는 30 TCID₅₀까지 1,881 bp의 특이 band가 확인되었고(Fig 3), nested PCR에서는 7 TCID₅₀까지 1,582 bp의 특이 band가 확인되었다(Fig 4).

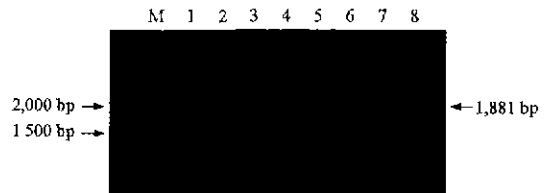


Fig 3. Sensitivity of the RT-PCR for amplification of H gene of CDV. Lane M, 1 Kb ladder (BIOTOOLS); lane 1 to 8, 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7 and 3 TCID₅₀ of Onderstepoort strain. The numbers at left and right indicate the size of DNA marker and expected size of PCR product, respectively.

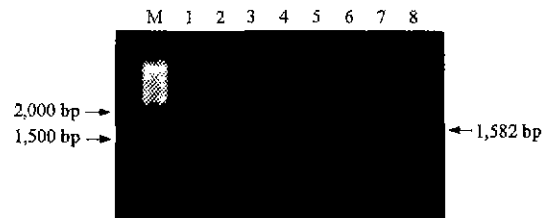


Fig. 4. Sensitivity of the nested PCR for amplification of H gene of CDV. Lane M, 1Kb ladder (BIOTOOLS), lane 1 to 8, 500, 250, 125, 60, 30, 15, 7 and 3 TCID₅₀ of Onderstepoort strain, respectively. The numbers at left are size of DNA marker. The number at right indicates the expected size of PCR product.

말초 혈액에서 개 디스토펙퍼 바이러스의 H 유전자 검출

임상적으로 개 디스토펙퍼로 추정되는 개의 말초 혈액에서 분리한 RNA로 RT-PCR과 nested PCR을 실

시한 결과, RT-PCR에서는 30두의 말초 혈액중 6두에서 1,881 bp의 특이 band가 확인되었으며 nested PCR에서는 30두의 말초 혈액 중 10두에서 1,582 bp의 특이 band가 확인되었다(Table 2).

Table 2. Result of RT-PCR and nested PCR in blood of 30 canine distemper suspected dogs

Reaction	Peripheral blood (30)*		Organs (7)*	
	RT-PCR	Nested PCR	RT-PCR	Nested PCR
Positive	6 (20%)	10 (33.3%)	0 (0%)	2**(28.6%)
Negative	24 (80%)	20 (66.6%)	7 (100%)	5 (71.4%)

*, Numbers in parenthesis indicate the number of tested samples.

장기 조직에서 개 디스토펙퍼 바이러스의 H 유전자 검출

말초 혈액에서 RT-PCR과 nested PCR에서 음성이었으나 안락사시켜 부검을 실시한 7두의 뇌와 폐조직에서 RNA를 분리하여 RT-PCR과 nested PCR을 실시한 결과, RT-PCR에서는 모두 음성으로 확인되었으나, nested PCR에서는 2개의 재료, 즉 6세의 Beagle

Table 3. Clinical history, neutralizing antibody titer of canine distemper virus, and detection of H gene with PCR in 30 canine distemper-suspected dogs

No.	Breed	Major symptom	Age (month)	No. of vaccination	Antibody titer	PCR
1	Mongrel	cough, fever	3	1	128	+
2	Y.Terrier	anorexia, cough, fever	7	3	32	-
3	Mongrel	vomiting, pneumonia, tic	6	3	8	-
4	Maltese	cough, diarrhea	3	2	16	-
5	Y.Terrier	fever,vomiting, anorexia	1	1	8	-
6	Maltese	anorexia, circling, diarrhea	2	1	128	+
7	Mongrel	tic	7	2	512	+
8	Poodle	diarrhea, tic	36	2	46	-
9	Pug	fever, seizure	2	1	4	-
10	Setter	fever,cough,anorexia	48	2	128	-
11	Jindo	ataxia, tic	3	U*	128	-
12	Maltese	pneumonia	6	3	32	-
13	Maltese	fever,vomiting, diarrhea	4	2	32	-
14	ShihTzu	fever, anorexia	3	2	16	-
15	Mongrel	fever, cough, dyspnea	4	1	16	+
16	Mongrel	fever, anorexia, circling	1	U*	16	+
17	ShiTzu	anorexia, diarrhea	6	2	4	-
18	Chihuahua	fever, anorexia	2	1	4	+
19	Beagle	seizure	72	2	256	+
20	ShihTzu	fever, anorexia, diarrhea	3	1	16	-
21	Maltese	tic, paraparesis	6	2	4	-
22	Pointer	fever, anorexia, diarrhea	3	1	64	-
23	Poodle	cough,nasal discharge	3	1	64	-
24	Mongrel	vomiting, diarrhea	7	2	1,024	-
25	Mongrel	cough, diarrhea	9	2	16	+
26	ShihTzu	dysbasia, ataxia	3	1	4	+
27	ShihTzu	dysbasia	2	1	4	+
28	Mini-pin	fever, anorexia	3	1	1,024	+
29	ShihTzu	dysbasia	2	1	16	-
30	Y.Terrier	vomiting, diarrhea	4	2	32	+

U*: Unknown.

의 뇌조직과 2개월령의 ShihTzu의 폐조직에서 각각 1,582 bp의 특이 band가 확인되었다(Table 2).

혈청 중화항체가의 분석

CDV의 Onderstepoort주에 대한 30두의 혈청 중화 항체 역가는 4에서 1,024 수준까지 나타났다(Table 3). 1회 이상 백신을 접종한 28두의 혈청 중화항체 역가는 4에서 1,024 수준까지 나타났고, PCR 결과가 양성인 12두의 혈청 중화 항체가도 4에서 1,024 수준까지 다양하게 나타났다.

고 찰

RT-PCR은 특정 RNA수가 1에서 100 copy와 같이 적은 양도 검출할 수 있는 민감한 방법이며 nested PCR은 RT-PCR 산물의 내부 일부분을 재증폭시켜 PCR 산물의 양을 증가시키므로 민감도를 증가시키고 증폭 산물의 특이성을 확인 할 수 있는 기법이다^{4,19,27}. 본 연구에서 Kovamees 등²¹이 보고한 Onderstepoort 주의 H gene에 존재하는 보존역만을 증폭시킬 수 있는 1쌍의 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과, 안 등³³이 생산한 PCR 산물과 동일한 크기의 1,881 bp의 특이 band가 생성되었다. 그리고 본 연구에서 설계하여 nested PCR에 사용한 primer는 예측하였던 1,582 bp의 특이적 band를 증폭시켜 CDV의 H 유전자를 특이적으로 증폭시켰다. 또한 본 연구에서 실시한 RT-PCR에서는 표준 바이러스주인 Onderstepoort주를 30 TCID₅₀까지 검출하였으며 nested PCR에서는 7 TCID₅₀까지 검출이 가능하였다. 이같은 결과는 RT-PCR 보다 nested PCR이 높은 민감도를 나타낸다는 Belyavsky 등⁴의 결과와 동일하였다.

본 연구에서 임상적으로 CDV 감염이 의심되는 환견 30두의 말초 혈액에서 RT-PCR을 실시한 결과 30두 중 6두(20%)에서 1,881 bp의 특이 band를 확인 할 수 있었고, nested PCR을 실시한 결과, 30두 중 10두(33.3%)에서 1,582 bp의 특이 band를 확인할 수 있었다. 본 연구의 CDV 검출률은 An 등¹이 임상적으로 CDV 감염으로 의심되는 19두의 말초 혈액에서 nucleocapsid 유전자에 대한 RT-PCR을 실시하여 19두 중 14두(73.5%)가 양성인 결과와 Shm 등²⁹이 nucleocapsid 유전자에 대한 두 가지 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시하여 32두 중 17두(53.1%)가 양성인 결과와 비교시 낮은 양성률을 보였으나, Kim 등²⁰이 말초 혈액에서 nucleocapsid 유전자를 검출하기 위한 RT-PCR과 nested PCR을 실시하여 91두 중 36두(39.6%)

를 검출한 결과와 유사하게 나타났다. 이와 같이 H 유전자에 대한 검출률이 nucleocapsid 유전자의 검출률 보다 낮은 이유는 RT-PCR에서 nucleocapsid 유전자의 증폭산물은 500 bp의 미만이었으나 H 유전자의 증폭 산물은 1,881 bp로서 PCR에서 증폭산물의 크기가 클수록 검출률이 낮아지는 때문으로 생각되었다.

본 연구에서 임상적으로 CDV 감염이 의심되었으나 말초 혈액에서 H 유전자가 검출되지 않은 7두 중 2두의 뇌와 폐의 조직에서 nested PCR에서 H 유전자가 각각 검출되었다. 이는 CDV가 바이러스 혈증의 초기 감염기를 거쳐 만성화되면 신경계를 비롯한 각종 상피조직으로 잠복하는 병태 생리를 갖기 때문에 검출된 것으로 생각되었다²².

본 연구에서 임상적으로 CDV 감염이 의심되는 30두 환견에서 PCR 양성인 12두 중 10두(83.3%)가 1회 이상 백신접종을 한 것으로 조사되었다. RT-PCR에서 백신 바이러스의 검출 가능성을 조사하기 위하여 Shm 등²⁹은 SPF 개 3마리에게 백신 접종한 후 7일마다 말초혈액을 채취하여 RT-PCR로 백신 바이러스의 검출을 시도한 결과 백신 접종 14일 이후에는 nucleocapsid 유전자를 탐지할 수 없었기 때문에 백신 바이러스는 말초 혈액내에 3주 이상 존재하지 않는다고 보고하였다. 본 연구에서 말초혈액의 PCR 결과가 양성인 10두는 백신 접종한 후 최소 20일 이상 경과 되었으므로 백신 접종으로 인한 양성은 아니라고 여겨졌다.

본 연구에서 임상적으로 CDV 감염이 의심되는 30두의 나이는 1개월령부터 6세까지 다양하였으나 말초 혈액의 PCR에서 양성인 10두의 나이는 1~7개월령으로 1세 미만이었다. Shin 등²⁹의 연구에서 연구 대상 32두의 나이는 2개월령부터 13세까지였으며 PCR 양성인 17두의 나이는 2개월령부터 13세로 다양하게 나타나 본 연구와는 차이를 보였다.

Shin 등²⁹은 대상견의 Onderstepoort주에 대한 중화항체가가 RT-PCR에서 양성인 경우 10에서 1,280까지 다양하게 나타나 RT-PCR의 결과와 중화항체 역가 사이에 상관 관계가 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서도 전체 30두에 대한 Onderstepoort주에 대한 중화항체가는 4에서부터 1,024 수준까지 다양하게 나타났으며 이중 PCR 결과가 양성인 경우의 중화 항체가도 4부터 1,024 수준까지 다양하게 나타나 Shin 등²⁹의 연구와 유사하게 나타났다. McCaw 등²⁵은 CDV에 대한 방어 가능한 항체가는 64 이상이라고 보고하였으나 본 연구에서는 이 보다 높은 항체가를 가진 10두 중 5두(50%)에서 PCR 양성으로 나타났다. 이와

같은 결과는 Shin 등²⁹의 보고에서 개 디스토펙 바이러스에 대한 방어 가능한 항체가 64보다 높은 17두 중 9두(52.9%)에서 PCR 양성반응이 나타난 것과 유사하였다. 이는 안 등³³의 연구에서 개 디스토펙에 이환된 진도견에서 분리된 CDV는 백신주들보다는 일본에서 분리된 야의 분리주들과 유사성이 더 높았으며 H 유전자에 대한 N-linked glycosylation site에서 백신주와 야의 분리주 사이에 H 단백질의 항원성에 차이가 있을 것으로 분석되어 백신주에 의하여 형성된 항체가 야의 분리주의 방어에 기여하기 못할 가능성이 제기되었다. 본 연구에서 높은 중화 항체를 가지는 일부의 개에서 개 디스토펙이 발생하는 것으로 확인되어, 국내에서도 백신주와 다른 항원성을 갖는 야외주가 CDV 발생에 관여하는 것으로 생각되었다.

아직까지 국내의 동물병원에서는 디스토펙에 대한 정확한 실험실적 진단이 이루어지지 못하고 단순히 임상증상으로만 진단하고 있는 실정이므로 임상적으로 CDV 감염이 의심스러운 개의 정확한 진단을 위하여 신속하고 예민한 진단법이 필요하였다. 그러므로 본 연구에서 확립한 RT-PCR 및 nested PCR과 함께 다른 실험실 검사를 활용한다면 개 디스토펙의 조기 확진과 환경의 효율적 관리에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되었다. 그리고 개 디스토펙의 효율적인 예방관리를 위하여 CDV의 국내 분리주에 대한 분자생물학적 특성과 병원성에 대한 추후의 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

결 론

개 디스토펙 바이러스 감염의 신속 진단을 위하여 1999년 3월부터 1999년 10월까지 서울, 경기도, 강원도 지역의 임상적으로 개 디스토펙이 의심되는 30두에서 말초혈액과 조직을 대상으로 개 디스토펙 바이러스의 H 유전자에 대한 RT-PCR, nested PCR과 혈청 중화항체 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 본 연구에서 확립한 RT-PCR과 nested PCR은 CDV의 H 유전자를 특이적으로 검출하였다.
2. RT-PCR은 Onderstepoort주를 30 TCID₅₀까지 검출가능하였으며 nested PCR은 7 TCID₅₀까지 검출이 가능하여 높은 민감도를 나타내었다.
3. CDV 감염이 의심되는 30두의 말초 혈액을 대상으로 실시한 RT-PCR에서는 20%(6두)의 검출률을 보였고, nested PCR에서는 33.3%(10두)의 검출률을 보였다.

4. 말초 혈액에서 CDV의 H 유전자를 검출할 수 없었던 7두의 뇌와 폐 조직의 nested PCR에서 각각 다른 1두의 뇌조직과 1두의 폐 조직에서 H 유전자가 검출되었다.

5. Nested PCR에 의하여 CDV의 H 유전자가 검출된 10두의 Onderstepoort주에 대한 혈청 중화항체는 4에서 1,024로서, 중화 항체가 높은 일부의 개에서 CDV에 대한 감염이 이루어졌다.

참 고 문 헌

1. An DJ, Song JY, Lee JB, Park JH, Shin JH, Kim YH, An SH. Strain differentiation of canine distemper virus by reverse transcriptase polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Korean J Vet Res* 1999; 39: 778-785
2. Appel MJG, Yates RA, Foley GL, Bernstein JJ, Santnell S, Spelman LH, Miller LD, Arp LH, Anderson M, Barr M, Pearce-Kelling S, Summers BA. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 277-288.
3. Appel MJG. Canine distemper virus. In: *Virus infections of carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1987: 133-159.
4. Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2919-2932.
5. Bernard NF, David NK, Peter MH. *Fields virology*, 3rd ed. Philadelphia Lippincott Raven Publishers. 1996: 1177-1204.
6. Blitxkrone-Moller M, Svansson V, Have P, Örvell C, Appel M, Pedersen IR, Dietz H, Henriksen P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet Microbiol* 1993; 37: 163-173.
7. Budd J, Davise JW, Karstad LH, Tramer DO. Distemper. In: *Infectious disease of wild mammals*, 2nd ed. Ames, Iowa: Iowa state university press. 1981: 31-44
8. Bush M, Montali RJ, Brownstein D, James AE, Appel MJG. Vaccine-induced canine distemper in Lesser Panda. *JAVMA* 1976; 169: 959-960.
9. Dungworth DL, Jubb JVF, Kennedy PC, Palmer N. *The respiratory system in pathology of domestic animal*, 4th ed. London: Academic Press. 1995: 617-624.
10. Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White OO. Canine distemper. In: *Veterinary virology*, 2nd ed. London: Academic Press. 1993:

- 483-485.
11. Gemma T, Watari T, Akiyama K, Miyashita N, Shin YS, Iwatsuki K, Kai C, Mikami T. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J Vet Med Sci* 1996; 58: 547-550.
 12. Gemma T, Miyashita N, Shin YS, Okita M, Mori T, Iwatsuki K, Mikami T, Kai C. Serological survey of canine distemper virus infection using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 761-763.
 13. Glardon O, Stöckli R. Staupepidemie in der Schweiz: epidemiologie und impfanamnese. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 1985; 127: 707-716.
 14. Godec MS, Asher DM, Swolveland PT. Detection of measles virus genomic sequences in SSPE brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1990; 30: 237-244.
 15. Haas L, Subbarao SM, Harder T. Detection of phocid distemper virus RNA in seal tissues using slot hybridization and the polymerase chain reaction amplification assay: genetic evidence that the virus is distinct from canine distemper virus. *J Gen Virol* 1991; 72: 825-832.
 16. Harder TC, Kenter M, Appel MJG, Roelke-Parker ME, Barrett T, Osterhaus ADME. Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine* 1995; 13: 521-523.
 17. Jubb KVF, Kennedy PC, Parmer N. Canine distemper virus. In: *Pathology of domestic animals*, 4th ed. London: Academic press. 1993: 617-624.
 18. Kai C, Ochikubo F, Okita M, Linuma T, Mikami T, Kobune F, Yamanouchi K. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 1067-1070.
 19. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 85: 5698-5702.
 20. Kim YH, Youn HY, Shin IS, Han HR. Detection of canine distemper virus(CDV) in canine peripheral blood mononuclear cell(PBMC) by one step RT-PCR and nested PCR. *Korean J Vet Res* 1999; 39: 82.
 21. Kövamees J, Blixenkron-Möller M, Sharma B, Örvell C, Norrby E. The nucleotide sequence and deduced amino acid composition of the haemagglutinin and fusion proteins of the morbillivirus phocid distemper virus. *J Gen virol* 1991; 72: 2959-2966.
 22. Leib MS, Monroe WE. *Practical small animal internal medicine*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunder Co. 1997: 874-877.
 23. Machida NK, Kuryu K, Ohushi E, Kanda E, Izumusawa N, Nakamura T. Pathology and epidemiology of canine distemper in raccon dogs(*Nyctereutes procyonoides*). *J Comp Pathol* 1993; 108: 383-392.
 24. Mamaev LV, Denikina NN, Belikov SI, Volchikov VE, Visser IKG, Fleming M, Kai C, Harder TC, Liess B, Osterhaus ADME, Barrett T. Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals. *Vet Microbiol* 1995; 44: 251-259.
 25. McCaw DL, Thompson M, Tate D, Bonderer A, Chen YJ. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. *JAVMA* 1998; 231: 72-75.
 26. Morell V. New virus variant killed Serengeti cats. *Science* 1994; 264: 1664.
 27. Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241: 708-712.
 28. Rima BK. The proteins of Morbilliviruses. *J Gen virol* 1983; 64: 1205-1219.
 29. Shin YS, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 439-445.
 30. 강병직, 이현수, 권혁진. 한국전에 있어서의 디스토펜퍼의 분포와 생독면역에 대하여. *농사시험연구보고* 1964; 7: 35-41.
 31. 김두희, 신전호, 박준철, 이재진, 위성환, 강영배, 김종만, 정석찬, 김지숙, 이태욱, 오철수. 한국 진도견 질병조사 연구. *농사시험연구(가축위생편)* 1991; 33: 61-68.
 32. 김재훈, 황의경, 박수원, 손현주, 서일복, 김대용, 배유찬, 최상호. 너구리의 개디스토펜퍼 感染 病例 報告. *농업논문집* 1996; 38: 864-869.
 33. 안동준, 송재영, 박종현, 이중복, 현방훈, 김재훈, 배영대, 최갑철, 인수환. 珍島犬에서 분리된 개 디스토펜퍼바이러스 H遺傳子의 分子生物學的 特性. *수의과학 논문집* 1998; 40: 3-47.
 34. 윤기복, 강문일, 박남용, 한동운. 간접형광항체법에 의한 개의 마이리우스-canine distemper virus, canine parvovirus, canine coronavirus, canine adenovirus type-2, canine parainfluenza- 항체분포조사. *대한수의학회지* 1995; 35: 75-85.